

Programa de Pós-Graduação em

**BIOTECNOLOGIA &
BIOCIÊNCIAS**

mestrado & doutorado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA

**ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES ASSOCIADOS AO
TRANSPORTE E AO ESTRESSE OXIDATIVO EM
MACRÓFAGOS HUMANOS INFECTADOS COM *Leishmania*
braziliensis E TRATADOS COM GLUCANTIME**

JAIR ALEXANDER TELLEZ MENESES

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: prof. Dr. Alvaro José Romanha
Co-orientador: prof. Dr. Mario Steindel

FLORIANÓPOLIS-SC
2014

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

Meneses, Jair Alexander Téllez

Análise funcional de genes associados ao transporte e ao estresse oxidativo em macrófagos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com Glucantime / Jair Alexander Téllez Meneses ; orientador, Alvaro José Romanha ; coorientador, Mario Steindel. - Florianópolis, SC, 2014. 182 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Hospedeiro-patógeno. 3. Leishmanioses. 4. Glucantime. 5. Detoxificação. I. Romanha, Alvaro José. II. Steindel, Mario. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

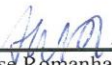
“Análise funcional de genes associados ao transporte e ao estresse oxidativo em macrófagos humanos infectados com Leishmania braziliensis e tratados com Glucantime”

por

Jair Alexander Téllez Meneses

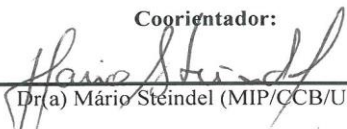
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (Port. 22/PPGBTC/2014) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC, composta pelos Professores Doutores:

Orientador:




Dr(a) Alvaro José Romanha (MIP/CCB/UFSC)

Coorientador:



Dr(a) Mário Steindel (MIP/CCB/UFSC)

Banca Examinadora:



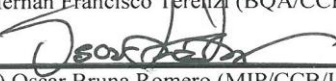
Dr(a) Omar Triana Chávez (Universidad de Antioquia, Medellín - Colombia)



Dr(a) Cynthia Demicheli (UFMG)



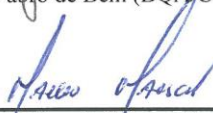
Dr(a) Hernán Francisco Terenzi (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Oscar Bruna Romero (MIP/CCB/UFSC)



Dr(a) Andreza Fabro de Bem (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Marcelo Maraschin

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Florianópolis, 02 de outubro de 2014

*À minha esposa e
minha filha, à minha
mãe e meu pai, à meus
irmãos, meus amores.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e permitir que eu desenvolvesse este trabalho, que possa, em algum momento, melhorar a vida das pessoas que sofrem com a Leishmaniose.

À minha família, que se manteve presente em todos os momentos, me dando apoio incondicional. À minha mãe, Aurora e meu pai Jaime que são o pilar da família. Aos meus irmãos, Claudia, Alonso e Yuli pelo amor e carinho, que me apoiaram e incentivaram a seguir em frente.

Às minhas sobrinhas, Violeta e Alejandra, que com seus lindos sorrisos, mesmo que pelo SKYPE, me faziam esquecer de todas as preocupações.

A meus sogros, Maria Antônia e David de Jesus, que ao se disponibilizarem a estar conosco em Florianópolis ajudaram-nos a nos sentir em casa. Obrigada pelo amor e o grande carinho que dispensam a Luisa e a mim.

Aos meus orientadores, Prof. Dr. Álvaro José Romanha e Prof. Dr. Mário Steindel minha gratidão, admiração e respeito por compartilharem seus conhecimentos e além de tudo, pelo apoio durante as “ites” da família Téllez Romero.

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, que foi nosso primeiro contato e que nos abriu as portas do Laboratório de Protozoologia. Obrigado pelo apoio, por estar sempre disposto a nos ajudar a nos sentirmos como em casa e, igualmente, pela força durante nossas “ites”.

A todos os membros do Laboratório de Protozoologia por todos os momentos compartilhados, incluindo os bate papos e risadas durante estes quatro anos de doutorado.

A minhas amigas Celina Yamanaka, Mariel Marlow e Ingrid Botelho pelos momentos tão especiais fora do laboratório. Vocês sempre estarão no meu coração.

Ao “casal vinte” Ingrid Botelho e Maurício e sua família, João Gabriel e Isadora, obrigado! Vocês sempre terão as portas de nosso lar abertas para recebê-los, onde quer que estivermos.

A meus grandes chefes durante meu desenvolvimento profissional, principalmente a Dra. Nancy Saravia, um grande exemplo de amor à ciência, disciplina e rigor científico e a quem admiro sinceramente.

Ao Dr. Maurílio José Soares, chefe do Laboratório de Biologia Celular do Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ Paraná, minha gratidão e admiração, não só pela sua ajuda valiosa no estabelecimento dos ensaios de localização celular, mas também pela sua amizade ao permitir que conhecesse seu lar e a grande pessoa que é.

Aos voluntários sadios que participaram deste estudo.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário (HU) da UFSC pelas análises dos hemogramas. Um agradecimento especial para Cyda Cunha, técnica laboratorial, pela coleta das amostras de sangue dos voluntários sadios.

Ao Laboratório de Hematologia do HU e ao HEMOSC, em especial a bioquímica Rosemere Amaral de Oliveira e a Dra. Andréa Petry, por fornecerem os soros AB utilizados neste estudo.

Aos membros do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia I - LAMEB I do Centro de Ciências Biológicas da UFSC, Vanessa Silva da Silva, Denis Dall Agnold e Bibiana Sgorla de Almeida por toda a sua ajuda durante o uso dos equipamentos deste laboratório.

As entidades financeiras CAPES, pela bolsa de doutorado e ao CNPq, pelo seu apoio para a realização deste estudo segundo processo 479356/2011-4, além do programa da pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC.

À minha esposa Ibeth e minha filha Luisa, por todo seu amor e por estarem sempre comigo, sendo minhas guias, luz e inspiração. Amo vocês! .

“He aprendido que el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada”, Gabriel García Márquez.

RESUMO

As Leishmanioses afetam cerca de 15 milhões de pessoas e constiuem um importante problema de saúde pública mundial. O controle da parasitose baseia-se principalmente na quimioterapia, usando como medicamento de primeira escolha o antimônio pentavalente Sb^V (Glucantime®). O surgimento de resistência aos fármacos de uso clínico, a ausência de vacinas eficazes, a propagação de vetores resistentes aos inseticidas tornam o controle das Leishmanioses difícil e complexo. Para entender melhor o papel dos macrófagos na Leishmaniose humana e estabelecer estratégias para prevenir os efeitos nocivos da *Leishmania*, dados sobre os padrões de expressão de genes e proteínas, em Macrófagos Derivados de Monócitos de Humanos (MDM) infectados com *Leishmania* sob condições de tratamento, são essenciais. Neste estudo, foram analisadas as alterações nos níveis de expressão de genes e proteínas de macrófagos humanos, durante a infecção *in vitro* por *Leishmania braziliensis* e tratamento com Glucantime usando qPCR-arrays, ensaios de Western blot, microscopia confocal e ensaios de inibição usando siRNA. Os resultados indicam que a infecção com *L. braziliensis* e o tratamento Sb^V conjuntamente, modulam a expressão de genes em macrófagos, em particular aqueles envolvidos na via de biossíntese da glutatona. Análises de correlação permitiram determinar superexpressão dos marcadores GSTP1, GCLM, GSR, GSS, TRX e ABCB5 tanto nos níveis do mRNA quanto das proteínas, em MDM de humanos infectados e tratados quando comparados ao grupo controle. O estudo da localização subcelular mostrou que o transportador ABCB5 apresenta uma localização predominantemente fagolisossomal, indicando que essa proteína poderia estar envolvida no transporte de Glucantime. Nos ensaios de inibição selectiva o silenciamento dos genes *gstp1*, *gss* e *abcb5* aumentaram o efeito leishmanicida *in vitro* do Sb^V induzindo uma redução da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em macrófagos THP-1. Essa resposta foi igualmente confirmada para o gene *gstp1* onde os resultados de tempo e concentração dependente mostraram que a redução da sobrevivência intracelular era observada 24h após exposição ao Sb^V e a uma dose menor. Nossos resultados sugerem que há uma ativação de genes envolvidos na defesa antioxidante em macrófagos humanos como resposta a infecção com *L. braziliensis* e o tratamento com Glucantime, potencializando a detoxificação do fármaco. Conclui-se que as proteínas GSTP1, GSS e ABCB5 seriam potenciais alvos

candidatos para intervenção terapêutica mediante a inibição seletiva destes marcadores.

Palavras chaves: Interação hospedeiro-patógeno, Leishmanioses, *Leishmania braziliensis*, Transportadores de fármacos, defesa antioxidante, detoxificação, GSTP1, GSS, ABCB5, Glucantime.

ABSTRACT

Leishmaniasis affects millions of people worldwide and represents a major public health problem. Leishmaniasis control relies primarily on chemotherapy, with the mainstay being pentavalent antimony (Sb^{V}) complexed to carbohydrates in the form of sodium stibogluconate (Pentostam[®]) or meglumine antimoniate (Glucantime[®]). Due to the emergence of drug resistance, the absence of effective vaccines and the spread of insecticide-resistant vectors, Leishmaniasis control is becoming extremely difficult and complex. To better understand the role of macrophages in human Leishmaniasis and to advance in new strategies to prevent the harmful effects of *Leishmania* parasites, information about the protein expression patterns in the context of *Leishmania*-infected human monocyte-derived macrophages (MDM) under drug treatment conditions are essential. In this study, we analyzed the changes in the expression levels of human MDM proteins during *in vitro* infection by *Leishmania braziliensis* and treatment with Glucantime using qPCR arrays, Western blot, confocal microscopy and siRNA inhibition assays. The results indicate that *L. braziliensis* infection/ Sb^{V} treatment modulated the host gene expression, particularly in the glutathione biosynthesis pathway. Comparing results from gene transcription and protein expression analysis, allowed to determine that GSTP1, GCLM, GSR, GSS, TXN, and ABCB5 were strongly up-regulated at both mRNA and protein levels when compared to the control group. Subcellular localization studies showed mostly fagolissosomal location of the ABCB5 transporters, indicating that this protein may be involved in the transport of Glucantime. Selective inhibition assays by gene silencing siRNA assays of *gstp1*, *gss* and *abcb5* showed an increased *in vitro* leishmanicidal effect to Sb exposure inducing a decrease in intracellular survival of *L. braziliensis* in THP-1 macrophages. This response was also confirmed for *gstp1* gene in which the results showed a time and dose-dependent effect in the reduction of intracellular survival where even at 24 hours of exposure to Sb^{V} and a lower dose of 8 mg/mL significant intracellular leishmanicidal effects were found. These analyses suggest that, modulations of human MDM by *L. braziliensis* infection and Glucantime treatment raise the activation of genes participating in antioxidant defense enhancing the drug detoxification. Therefore we concluded that GSTP1, GSS and ABCB5 proteins could be potential targets for therapeutic interventions by selective inhibition of these markers.

Key words: Human-Leishmaniasis; host-pathogen interaction; *Leishmania braziliensis*; GSTP1; GSS; ABCB5, Glucantime.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manifestações clínicas da Leishmaniose.....	34
Figura 2. Ciclo biológico e de transmissão de <i>Leishmania spp</i>.....	36
Figura 3. Estrutura dos antimonials pentavalentes.....	38
Figura 4. Dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação do antimonial pentavalente sobre <i>Leishmania spp</i>.....	46
Figura 5. Esquema dos mecanismos de ação e resistência ao antimônio.....	49
Figura 6. Comparação das vias de transporte e detoxificação de arsênico e antimônio em diferentes organismos.....	54
Figura 7. Sensibilidade de <i>Leishmania braziliensis</i> ao Glucantime (Sb^V) em MDM de humanos.....	70
Figura 8. Gráfico de Venn apresentando o número de transcritos regulados positiva e negativamente em MDM de humanos.....	72
Figura 9. Gráfico de Venn apresentando os transcritos regulados positiva ou negativamente em MDM de humanos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Glucantime (Verde), macrófagos THP1 infectados com <i>T. cruzi</i> clone CLBrener e tratados com Benzonidazol (Amarelo) ou em macrófagos THP1 infectados com <i>T. cruzi</i> cepa Colombiana e tratados com BZ (Roxo).....	77
Figura 10. Expressão de proteínas GSTP1, GCLM, GSS e GSR em MDM de humanos.....	80
Figura 11. Expressão de proteínas CAT, GPX1/2, SOD3 e TRX em MDM de humanos.....	81

Figura 12. Expressão de proteínas transportadoras de fármacos ABCB5, ABCB6, ABCB11/BSEP e SLC22A1/OCT1 em MDM de humanos.....	83
Figura 13. Correlação dos níveis de expressão do mRNA e proteínas em MDM de humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>, tratados com Glucantime e em ambas as condições, infectados e tratados com Glucantime.....	84
Figura 14. Imunolocalização por microscopia confocal do transportador ABCB5 em macrófagos de humanos.....	86
Figura 15. Células humanas THP1 diferenciadas em MΦ transfectadas com o controle negativo <i>AllStars</i> siRNA AF488 (QIAGEN).....	87
Figura 16. Silenciamento do gene humano <i>gstp1</i> e sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1.....	90
Figure 17. Silenciamento do gene humano <i>gss</i> e sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1.....	94
Figura 18. Efeito do tempo e da concentração de Sb^V sobre a expressão da proteína GSTP1 em MΦ THP-1 infectados com <i>L. braziliensis</i>.....	99
Figura 19. Efeito do tempo de tratamento e da concentração de Sb^V na sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> em MΦ THP1 silenciados e não silenciados para o gene humano <i>gstp1</i>.....	102
Figura 20. Efeito do silenciamento do gene <i>gstp1</i> e do tratamento com Sb^V em MΦ THP-1 sobre a viabilidade de <i>L. braziliensis</i> super-expressando CS e CβS.....	105
Figura 21. Modelo proposto de detoxificação de Glucantime em macrófagos humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>.....	118

Figura S1. Expressão dos genes <i>mt3</i>, <i>aqp9</i>, <i>pgp</i> e <i>mrp1</i> em macrófagos humanos.....	152
Figure S2. Silenciamento do gene humano <i>abcb5</i> aumentou a sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1.....	177
Figure S3. Silenciamento do gene humano <i>trx</i> favoreceu a sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1.....	179
Figure S4. O silenciamento do gene humano da <i>β-actina</i> não induz nenhum efeito na sensibilidade intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> ao tratamento com Sb^V em MΦ THP1.....	181
Figure S5. Efeito do silenciamento dos genes humanos da defesa antioxidante e do transporte de fármacos na carga parasitaria intracelular de amastigotas de <i>L. braziliensis</i> em MΦ THP1.....	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação simplificada entre as espécies de <i>Leishmania</i> e as principais formas clínicas em humanos.....	31
Tabela 2. Tratamento atual para as Leishmanioses.....	41
Tabela 3. Modulação dos genes envolvidos na biossíntese da Glutathiona, defesa antioxidante e no transporte de fármacos em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDM) infectados com <i>L. braziliensis</i>, tratados com Glucantime® (Sb^V) e infectados e tratados.....	74
Tabela S1. Triagem de voluntários sadios para a obtenção de MDM de humanos.....	151
Tabela S2. Agrupamento funcional da matriz de Estresse Oxidativo.....	153
Tabela S3. Agrupamento funcional da matriz de transportadores de fármacos.....	157
Tabela S4 Sequencias dos siRNA de genes envolvidos na defesa antioxidante para fazer as análises de inibição em macrófagos humanos.....	161
Tabela S5. Iniciadores usados para confirmar o <i>knockdown</i> da expressão dos genes inibidos.....	162
Tabela S6. Modulação dos níveis de expressão gênica de genes de estresse oxidativo em MDM de humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>, tratados com Glucantime® (Sb^V) ou em ambas as condições.....	163
Tabela S7. Modulação dos níveis de expressão gênica de genes transportadores de fármacos em MDM de humanos infectados com <i>L. braziliensis</i>, tratados com Glucantime® (Sb^V) ou em ambas as condições.....	168

LISTA MÉTODO SUPLEMENTAR

Métodos suplementar 1. Infecção de macrófagos com cepas de <i>T. cruzi</i> e tratamento com Benzonidazol.....	178
--	------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	ATP-binding cassette
ACR	Enzima redutase de antimoniato
AF488	<i>AlexaFluor 488</i>
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
ANOVA	Análise de variância
AQP	aquagliceroporinas
ATP	Adenosina trifosfato
As	Arsênico
BSA	Albumina sérica bovina
BZ	Benzonidazol
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CHO	células de ovário de hamster chinês
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% dos parasitos
DALYs	<i>Disability Adjusted Life Years</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
D-PBS	<i>Dulbecco's buffered saline solution</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EP	Erro padrão
ER	Retículo Endoplasmático
GLC4	Linhagem celular cancerosa humana
GlpF	<i>Glycerol diffusion facilitator gene</i>
γ -GCS	<i>Glutamate Cysteine Ligase ou gamma-glutamylcysteine synthetase</i>
GSH	Glutathiona reduzida
GTP	Guanosina trifosfato
Fps1p	<i>Glycerol uptake/efflux facilitator protein</i>
HepG2	Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano
IC	Intervalo de confiança
IP	Índice Parasitário
K562	Linhagem celular leucêmica humana

kDNA	DNA do cinetoplasto
Lb	<i>Leishmania braziliensis</i>
LC	Leishmanioses Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LDPC	Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar
LMC	Leishmanioses Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmanioses Visceral
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MΦ	Macrófagos
MDM	Macrófagos derivados de monócitos
MDR	<i>Multidrug resistance</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MRP	Proteínas de multiresistência a fármacos
MT	Metaloproteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
OMS	Organização mundial da saúde
PBMC's	Células mononucleadas do sangue periférico
PBS	Tampão Salino Fosfato
Pg-P	Glicoproteína-P
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PI	Percentual de inibição
PKC	Proteína quinase C
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
P38	<i>p38 Mitogen-activated protein kinases</i>
qPCR-arrays	Reação em cadeia da polimerase quantitativa por matrizes
Ras	<i>Membrane-associated guanine nucleotide-binding protein</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
RNA	Ácido ribonucléico

RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1650
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SAG	<i>Sodium Antimony Gluconate</i>
SBF	Soro bovino fetal
Sb	Antimônio
Sb ^{III}	Antimonial trivalente
Sb ^V	Antimonial pentavalente
siRNA	<i>Short interfering RNA</i> ou <i>small interfering RNA</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre Esclarecido
TDR	Enzima redutase dependente de Tiol
THP-1	Linhagem de células humanas de leucemia monocítica aguda
Tm	Temperatura de dissociação
UV	Ultravioleta
Ycf1p	<i>Yeast cadmium factor 1</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

CO ₂	Dióxido de Carbono
<i>g</i>	Gravidade
kDa	KiloDalton
Kg	Kilograma
M	Molar
mg	Miligramma
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pH	Potencial hidrogeniônico
UI	Unidade internacional
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
µg	Microgramma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	31
1.1	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	34
1.2	Tratamento quimioterápico da Leishmaniose.....	36
1.3	Mecanismo de ação dos compostos antimoniais.....	44
1.4	Resistência aos compostos antimoniais.....	47
1.5	Estresse oxidativo produzido por compostos antimoniais.....	50
1.6	Transporte de compostos antimoniais.....	53
2	JUSTIFICATIVA.....	57
3	OBJETIVOS:.....	59
3.1	OBJETIVO GERAL:.....	59
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	59
3.2.1	Determinar a expressão diferencial de genes envolvidos no estresse oxidativo e no transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com Glucantime.....	59
3.2.2	Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na defesa antioxidante e no transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com <i>Leishmania</i> e expostos ao Glucantime.....	59
3.2.3	Determinar o papel funcional de genes envolvidos na defesa antioxidante e no transporte de fármacos sobre a sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>L. braziliensis</i> em macrófagos humanos infectados e tratados com Glucantime.....	59
4	METODOLOGIA.....	61
4.1	Parasitas, cultivos celulares, seleção de doadores e isolamento de monócitos de sangue periférico.....	61
4.1.1	Parasitas.....	61
4.1.2	Linhagem Celular THP-1.....	61
4.1.3	Isolamento e cultura de macrófagos humanos derivados de monócitos de sangue periférico (MDMs).....	61
4.2	Infecção de macrófagos com <i>L. braziliensis</i> e tratamento com Glucantime.....	62
4.3	Extração de RNA e síntese de cDNA.....	63
4.4	Ensaio de expressão de genes de estresse oxidativo e de transportadores de medicamento em MDM de humanos.....	63
4.4.1	Análise da expressão gênica de <i>mt3</i> , <i>aqp-9</i> , <i>mdr-1</i> (<i>pgp</i>) e <i>mrp-1</i> em macrófagos humanos por RT-qPCR.....	63
4.4.2	Análise de <i>Arrays</i> em MDM de humanos.....	64
4.5	Análises de expressão de proteínas de estresse oxidativo e de transporte de fármacos em MDM.....	65

4.6	Análise da função de genes associados à defesa antioxidante em macrófagos THP-1 humanos.....	66
4.6.1	Localização celular do Transportador ABCB5.....	66
4.6.2	Estudos de inibição específica dos genes <i>gstp1</i> , <i>gss</i> , <i>trx</i> e <i>abcb5</i> em resposta a infecção com <i>L. braziliensis</i> e o tratamento com Glucantime® em macrófagos THP-1 humanos.	67
4.7	Análises de Dados.	68
5	RESULTADOS.....	69
6	DISCUSSÃO.....	107
7	CONCLUSÕES.....	121
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
9	MATERIAL SUPLEMENTAR	151

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), são parasitos intracelulares obrigatórios de importância para a saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. Os parasitos do gênero *Leishmania* spp. causam um amplo espectro de doenças denominadas Leishmanioses que, dependendo da espécie infectante do parasito e do status imunológico do hospedeiro, podem se manifestar em uma variedade de condições clínicas com envolvimento cutâneo (LC), mucocutâneo (LMC) ou visceral (LV). As formas cutâneas simples podem ser auto-resolutivas em cerca de 25% dos casos ou evoluir para formas desfigurantes como a mucocutânea ou fatais como a visceral (HERWALDT, 1999; ANTINORI, SCHIFANELLA e CORBELLINO, 2012). Botão do oriente, ferida brava, úlcera de Baurú, uta e úlcera dechiclero são alguns dos nomes populares de lesões associadas à Leishmaniose tegumentar. Uma relação simplificada das espécies de *Leishmania* e as principais formas clínicas em humanos se resume na Tabela 1.

Tabela 1 Relação simplificada entre as espécies de *Leishmania* e as principais formas clínicas em humanos.
Fonte: (FRÉZARD e DEMICHELI, 2010)

Manifestações clínicas	Distribuição geográfica	Subgênero	Espécies
Leishmaniose cutânea (LC)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (Leishmania) major</i>
			<i>L. (L.) tropica</i>
			<i>L. (L.) aethiopica</i>
	Novo mundo		<i>L. (L.) mexicana</i>
			<i>L. (L.) amazonensis</i>
Leishmaniose tegumentar e mucocutânea (LTA e LM)	Novo mundo	<i>Viannia</i>	<i>L. (Viannia) braziliensis</i>
			<i>L. (V.) colombiensis</i>
			<i>L. (V.) guyanensis</i>
			<i>L. (V.) panamensis</i>
			<i>L. (V.) peruviana</i>
			<i>L. (V.) lainsoni</i>
			<i>L. (V.) naiffi</i>
			<i>L. (V.) shawi</i>
			<i>L. (V.) lindenbergi</i>
Leishmaniose visceral (LV)	Velho Mundo	<i>Leishmania</i>	<i>L. (Leishmania) donovani</i>
	Novo mundo		<i>L. (L.) infantum</i>
			<i>L. (L.) infantum</i>

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma dermatrópica da doença, sendo também a mais comum, caracterizada por provocar úlceras nas partes expostas do corpo, deixando cicatrizes para toda a vida e pode gerar alguma incapacidade. Cerca do 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, Mediterrâneo, Médio Oriente e Ásia Central. Dois terços dos novos casos da LC ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a República Árabe da Síria. Estima-se que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente (WHO, 2014). Após um período de incubação de 2 semanas a 3 meses, aparece uma pequena pápula indolor bem delimitada, que evolui para uma úlcera de bordos elevados e fundo granuloso, acompanhada de prurido e linfonodomegalia local (Figura 1A). Esta lesão pode se curar espontaneamente após meses ou anos de infecção, deixando uma cicatriz hipopigmentada ou evoluir para outras formas da doença como as múltiplas lesões metastáticas em áreas não contíguas do corpo (REITHINGER et al., 2007; AMEEN, 2010). Em casos de recidiva após a remissão clínica, novas lesões podem surgir nas bordas ou mesmo sobre a cicatriz de lesões resolvidas há meses ou anos (GOTO e LAULETTA LINDOSO, 2012). No velho mundo (Hemisfério Oriental), os agentes etiológicos incluem as espécies de *Leishmania tropica*, *L. major*, e *L. aethiopica*, como também *L. infantum* e *L. donovani*. Dentre as principais espécies no novo mundo (Hemisfério Ocidental) encontram-se as espécies do complexo de *L. mexicana* (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. venezuelensis*) ou as do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*). O subgênero *Viannia* também é referido como o complexo de espécies de *L. (V.) braziliensis*.

Uma variante importante da LC é a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), que produz nódulos não ulcerados disseminados por todo o corpo. A disseminação supostamente ocorre devido à anergia imunológica de alguns indivíduos aos antígenos do parasito (AMEEN, 2010; GOTO e LAULETTA LINDOSO, 2012).

Na Leishmaniose Mucocutânea (LMC), ou espúndia, as manifestações iniciais geralmente são sintomas persistentes, nasais incomuns (como congestão ou sangramento), embora os sintomas da cavidade oral ou da faringe alguns vezes sejam notados em primeiro lugar. Se não tratada, a doença pode progredir para a destruição ulcerativa da mucosa naso-faríngea com perfuração do septo nasal (Figura 1B). A LMC tradicionalmente se refere a uma seqüela metastática da infecção cutânea das espécies de *Leishmania* do Novo

Mundo, que resulta da disseminação dos parasitos e que evolui lentamente (3 anos em média) e não cura espontaneamente. As espécies mais comuns neste caso são *L. braziliensis* e *L. panamensis*. A LMC geralmente torna-se clinicamente evidente dentro de alguns anos (às vezes décadas) das lesões cutâneas originais, que normalmente não foram tratadas ou foram tratados insatisfatoriamente. No entanto, lesões nas mucosas e pele podem ser notadas concomitantemente (Leishmaniose Tegumentar Americana, LTA), e em alguns pacientes a infecção cutânea pode ser subclínica. Embora a LC em suas diversas subclassificações e a LMC não sejam fatais, as cicatrizes causam estigma e morbidade comprometendo a qualidade de vida do indivíduo acometido (GOTO e LAULETTA LINDOSO, 2012).

A forma mais grave das Leishmanioses é a visceral (LV), conhecida na Índia como kala-azar, devido à cor escura da pele dos acometidos, usualmente causada pelas espécies de *L. donovani* e *L. infantum*. A LV é altamente endêmica no subcontinente indiano e na África Oriental. Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de LV ocorrem no mundo a cada ano. Mais de 90% dos novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul. A LV é uma doença sistêmica, fatal que afeta o fígado, o baço e a medula óssea (Figura 1C). Os sinais e sintomas caracterizam-se por surtos de febre irregular, perda de peso substancial, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. O período de incubação varia de 3 semanas (excepcionais) a mais de 2 anos, com uma média de 4 a 6 meses. Em alguns casos o indivíduo pode permanecer assintomático por décadas. Devido ao comprometimento do sistema imunológico, as co-infecções bacterianas e virais (principalmente HIV), são relativamente frequentes e podem ocasionar quadros graves da doença. A LV sintomática é fatal em 100% dos casos quando não tratada. O óbito ocorre pelas co-infecções, sangramento massivo ou anemia severa (CHAPPUIS et al., 2007; WHO, 2014).

A Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma complicação da LV principalmente nas áreas endêmicas para *L. donovani*. Caracteriza-se por uma erupção macular, papular ou nodular, geralmente no rosto, braços, troncos e outras partes do corpo. 5-10% dos pacientes com calazar ao leste da África e 50% no subcontinente indiano, desenvolvem essa condição clínica. A LDPC, geralmente aparece entre 6 meses e um ou mais anos após a cura clínica aparente da LV. Portadores de LDPC crônica podem servir como hospedeiros reservatórios importantes de infecção e por tanto considerados como

uma fonte potencial da infecção por kala-azar (ZIJLSTRA et al., 2003; WHO, 2014).

Figura 1. Manifestações clínicas da Leishmaniose. A= Leishmaniose cutânea, B= Leishmaniose Mucocutânea e C = Leishmaniose Visceral.



Fonte: WHO, 2014.

Entre as espécies de *Leishmania* que causam a Leishmaniose Tegumentar no "novo mundo", aquelas pertencentes ao subgênero *Viannia* (*L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) panamensis*) são os principais agentes etiológicos da Leishmaniose na América do Sul. A grande diversidade genética do complexo *L. Viannia*, suas características de transmissão e a baixa patogenicidade em modelos murinos retardou o progresso nos estudos e consequentemente, nas estratégias de controle. Em face, a ausência de uma vacina eficaz e de medidas sustentáveis de controle vetorial devido à natureza silvestre, doméstica e peridoméstica do inseto vetor, priorizar a investigação focada na compreensão das relações hospedeiro-parasito e na otimização do tratamento é, portanto, imperativo.

1.1 Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

As *Leishmania* são protozoários heteroxenos que durante seu ciclo biológico assumem duas formas evolutivas distintas: promastigota no flebotomíneo (inseto vetor) e amastigota no hospedeiro mamífero. Fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) são os vetores mais importantes responsáveis pela transmissão da doença. Das mais de 700 espécies de flebotomíneos conhecidas, cerca de 30 tem sido incriminadas como vetores do parasito (HERWALDT, 1999). O ciclo de vida da *Leishmania* começa com o repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos que ingerem amastigotas que se transformam em promastigotas flagelados móveis e se multiplicam por divisão binária no trato digestivo do vetor, onde se diferenciam para formas infectantes

denominadas promastigotas metacíclicos. Estes se acumulam nas porções anteriores da hipofaringe do inseto e durante um novo repasto sanguíneo são regurgitados no tecido do hospedeiro e rapidamente fagocitadas principalmente pelos macrófagos, onde no interior do fagolisossomo se transformam em amastigotas intracelulares que proliferam através de divisão binária (KAYE e SCOTT, 2011; McCONVILLE e NADERER, 2011). Após a lise celular causada pela replicação das formas amastigotas, estas podem infectar outros fagócitos e/ou serem sugadas pela fêmea do vetor em um novo repasto, completando o ciclo (SACKS e KAMHAWI, 2001; MURRAY et al., 2005). A transmissão dos parasitos de *Leishmania* é antroponótica (humano-vetor-humano) no subcontinente indiano e Ásia, enquanto que na África, Europa e as Américas, é zoonótica (animal-vetor-humano), onde roedores, edentados e cães tem um importante papel como reservatório (REITHINGER et al., 2007; POSTIGO, 2010; KUMAR e ENGWERDA, 2014) (Figura 2).

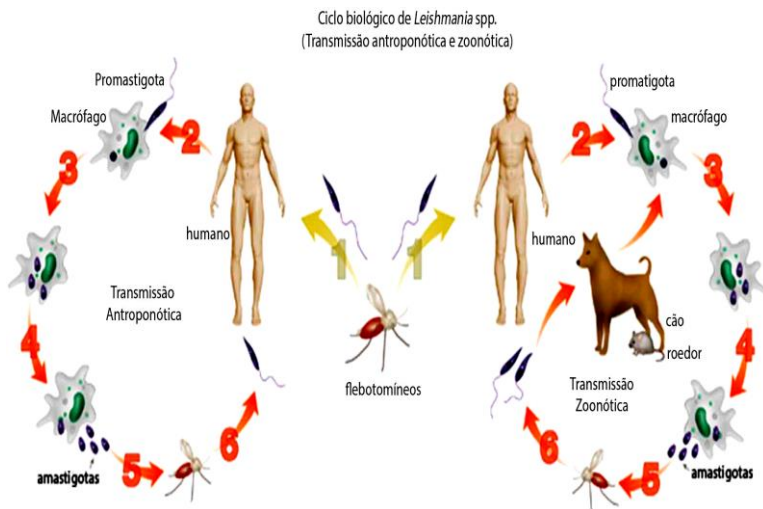


Figura 2. Ciclo biológico e de transmissão de *Leishmania* spp. A forma promastigota dos parasitos responsáveis pela doença humana são regurgitadas na pele do hospedeiro durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo fêmea (1), e são captadas pelos macrófagos do hospedeiro (2). Os promastigotas se convertem na forma não-flagelada, amastigota dentro dos macrófagos (3), e depois se multiplicam por divisão binária (4). As amastigotas são liberadas pela ruptura dos macrófagos (5), e são sugadas durante outro repasto sanguíneo de outro inseto vetor. A forma amastigota se converte agora na forma promastigota no intestino médio do flebotomíneo e, em seguida, pode voltar a ser transmitida para outra pessoa (transmissão antroponótica) ou para animais que atuam como reservatórios (transmissão zoonótica) (6). Fonte: (KUMAR e ENGWERDA, 2014).

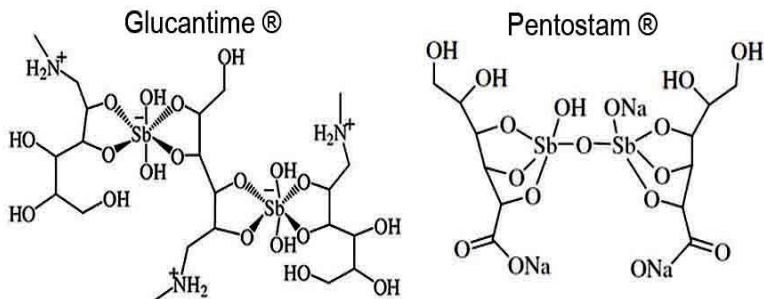
1.2 Tratamento quimioterápico da Leishmaniose.

Atualmente o controle da Leishmaniose depende de evitar a exposição ao inseto vetor mediante a proteção individual ou coletiva, o uso de inseticidas ou materiais tratados com inseticidas e do tratamento quimioterápico. A subnotificação de casos, os efeitos colaterais ao fármaco e os casos comuns de resistência do parasito ameaçam esta estratégia de controle da doença (LIRA et al., 1999; CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006; FRÉZARD e DEMICHELII, 2010). O arsenal terapêutico disponível para tratamento da Leishmaníase é reduzido e

precário. O tratamento básico da doença consiste na administração dos compostos antimoniais pentavalentes (Sb^V) como antimoniato de meglumina (Glucantime®, Sanofi Aventis Farmacêutica Ltda), disponível no Sul da Europa e América Latina e estibogluconato de sódio (Pentostam®, GlaxoSmithKline UK) disponível nos países de língua Inglesa (Figura 3). Estes substituíram os Antimoniais Trivalentes (Sb^{III}), moléculas altamente tóxicas introduzidas como tratamento da LC em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna e posteriormente usado para a LV em 1915 na Sicília, Índia e Itália (CROFT e YARDLEY, 2002; LAINSON, 2010).

Os antimoniais pentavalentes continuam sendo os fármacos de primeira linha para o tratamento de todas as formas de Leishmanioses humana há mais de 60 anos nas Américas, norte de África, Turquia, Bangladesh, Nepal e Índia (salvo Bihar), apresentando várias limitações (CROFT e YARDLEY, 2002; MURRAY et al., 2005). Os antimoniais pentavalentes devem ser administrados por via parenteral, diariamente, durante um longo período de tratamento de pelo menos 3 semanas (tipicamente, de 20 mg de Sb^V /(kg dia) durante 20 - 30 dias). A terapia com antimônio está muitas vezes acompanhada de dor local e desconforto associados às aplicações, e efeitos colaterais sistêmicos, os quais exigem supervisão médica cuidadosa e que geralmente dificultam a adesão do paciente levando ao abandono do tratamento, principalmente nas áreas rurais. Efeitos colaterais comuns incluem náuseas, vômitos, fraqueza e mialgia, cólicas abdominais, diarreia, erupções cutâneas, hepatotoxicidade e pancreatite e cardiotoxicidade como o efeito colateral mais grave. Estudos recentes com antimônio pentavalente revelaram também a sua eficácia em modelos experimentais de câncer, hepatite C e AIDS (DUFFIN e CAMPLING, 2002; YAN, JIN e SUN, 2005). Isso pode explicar o renovado interesse na bioquímica e nos mecanismos de ação destes medicamentos antigos e o crescente interesse de desenvolvimento inovador de novas formulações dos Sb.

Figura 3. Estrutura dos antimoniais pentavalentes.



Fonte: (FRÉZARD et al., 2008; FRÉZARD et al., 2013).

Além dos antimoniais, outros fármacos têm sido empregados no tratamento das Leishmanioses, entre os quais se destacam a anfotericina B, pentamidina, paromomicina e a miltefosina. Em conjunto estes fármacos são considerados como os quimioterápicos de segunda linha, e são particularmente úteis em casos de não resposta ao tratamento com antimoniais ou em pacientes que apresentam hipersensibilidade ao antimônio (CROFT e OLLIARO, 2011).

A anfotericina B, um macrolídeo poliênico, é um antibiótico antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo utilizado para o tratamento da Leishmaniose a partir de 1960, mas apenas como um fármaco de segunda linha. Este fármaco apresenta uma excelente atividade leishmanicida com mais de 90% de taxa de cura. Devido a que o composto puro desencadeia efeitos colaterais graves e requer um tratamento prolongado e monitorização extensa, a aplicação lipossomal intravenosa da anfotericina B é utilizada no momento, resultando em taxas de cura de 100% em tratamentos de 1-5 dias (SUNDAR et al., 2010; CROFT e OLLIARO, 2011; STAUCH et al., 2012). Entretanto, o elevado custo da anfotericina lipossomal impede o seu uso em larga escala (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2013). O modo de ação pode ser explicado com base na sua estrutura química. O macrolídeo poliênico complexa-se selectivamente com o ergosterol, um dos principais esteróis das membranas da *Leishmania* (CROFT e COOMBS, 2003). A interferência com esta molécula resulta no aumento da permeabilidade da membrana celular que conduz à morte do parasito. Além disso, há alguma evidência de que a anfotericina B tem um efeito sobre a resposta oxidativa dos macrófagos (MUKHERJEE et al., 2010). No entanto, estudos adicionais são necessários para elucidar os mecanismos de ação deste fármaco.

A paramonicina (aminosidina) é um antibiótico de amplo espectro obtido da bactéria *Streptomyces rimosus* variante paromomycinus. É ativo contra diversos parasitos e no ano 2006 foi introduzido pela primeira vez como um fármaco anti-leishmania na forma de sulfato de paramonicina (SUNDAR, JHA, et al., 2007). O baixo custo, a apresentação de menos efeitos colaterais, maior eficácia e menor tempo de administração do fármaco está sendo reavaliada a possibilidade de seu uso como terapia de primeira linha para pacientes com LV (OLLIARO et al., 2005; SUNDAR et al., 2009). Porém estudos recentes tem demonstrado que esquemas de tratamento a concentrações altas de 20 mg/kg/dia durante 21 dias apresentaram maior eficácia no tratamento que o esquema padrão de 15 mg/kg/dia durante 21 dias, e que a combinação de tratamento de paramonicina com os compostos antimonias revelou um bom perfil de segurança e uma eficácia comparável com o esquema de tratamento padrão de 30 dias dos compostos antimonias, sugerindo seu uso para o tratamento da LV na África Oriental (MUSA et al., 2010; MUSA et al., 2012). Adicionalmente, uma meta-análise de 14 ensaios clínicos randomizados controlados com placebo mostrou que, a paramonicina tópica parece ter atividade terapêutica contra as Leishmanioses do Velho Mundo e do Novo Mundo (KIM et al., 2009). A paramonicina por pertencer ao grupo de antibióticos aminoglicosídeos, seu possível mecanismo de ação envolve a inibição da síntese de proteínas (JHINGRAN et al., 2009).

A descoberta da atividade quimioterápica das substâncias do grupo das diamidas, do qual faz parte a pentamidina, foi inteiramente fortuita. A pentamidina, além de ser relativamente eficaz na terapia da leishmaniose, é eficaz no tratamento de casos incipientes de tripanossomíase africana (DOUA et al., 1996). A pentamidina como o sal de isotionato é comercializada sob o nome de (Pentacarinat) ou como sal de metilsulfonato (Lomidine) têm sido usada no tratamento alternativo tanto para a LC como para a LV desde 1952, e como um tratamento primário da LDC produzida por *L. aethiopica*, sendo usada com sucesso, em séries de 15 a 20 doses de 2-4 mg/kg/dia. A segunda série, administrada após intervalo de 1 a 2 semanas, pode ser necessária em áreas onde se sabe que não há resposta ao tratamento (DAS et al., 2001; DAS et al., 2009). A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o seu uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e, até mesmo, morte repentina foram descritas (BALAÑA-FOUCE et al., 1998; LOISEAU e BORIES, 2006).

A Miltefosina (Impavido®, Zentaris), é uma hexadecilfosfocolina originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer, é atualmente o primeiro e único fármaco administrado por via oral para o tratamento das Leishmanioses disponível na Alemanha, Bolívia, Colômbia, Estados Unidos e Índia. O fármaco é administrado em dose de 2,5 mg/kg/dia (não superior a 100 mg/dia) durante 28 dias. A administração da Miltefosina não exige que o paciente seja internado para acompanhamento, mas é contra-indicado durante a gravidez. No entanto, apesar das taxas de cura de até 98% (SUNDAR et al., 2012), o fármaco revela graves efeitos colaterais como vômitos, diarreia e pode causar desenvolvimento fisiológico anormal do feto. Além disso, a droga tem uma meia vida relativamente longa de cerca de 150 horas (SEIFERT et al., 2007; MALTEZOU, 2010) o que poderia levar ao rápido desenvolvimento de resistência. Devido ao seu uso recente, o mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado, mas em células tumorais o fármaco induz apoptose e altera as vias de sinalização celular mediada por lipídios (ARTHUR e BITTMAN, 1998). Um estudo demonstrou a indução de apoptose celular em promastigotas de *L. (L.) donovani* (VERMA e DEY, 2004) e *L. (L.) amazonensis* (MARINHO et al., 2011). Em outros estudos é sugerido que a miltefosina apresenta propriedades imunomoduladoras (VEHMEYER et al., 1991; HOCHHUTH et al., 1992; EUE, ZEISIG e ARNDT, 1995). Outra hipótese seria a atuação sobre o metabolismo de lipídios alquil e na biossíntese de fosfolípidos (LUX et al., 2000; RAKOTOMANGA, LOISEAU e SAINT-PIERRE-CHAZALET, 2004; SAINT-PIERRE-CHAZALET et al., 2009).

Os possíveis mecanismos de ação dos principais fármacos antileishmania usados no tratamento das Leishmanioses são resumidos na Tabela 2.

Tabela 2. Tratamento atual para as Leishmanioses: fármacos anti-*Leishmania*, seu modo (s) de ação sobre o parasito, dosagem, eficácia, vantagens e limitações

Fármaco	Modo(s) de ação	Dossagem	Eficácia (%)	Vantagens	Limitações	Referência
Antimoniato de meglumina (Glucantime) e estibo gluconato de sódio (Pentostam)	Não esclarecido, provavelmente atua como pró-droga, convertido à forma trivalente ativa dentro do amastigota/macrófago. O Sb ^{III} inibe a tripanotona redutase do parasito e o expõe ao estresse oxidativo do hospedeiro	20 mg/kg/dia (i.m ou i.v) por 20–30 dias	80–90 (<50% em Bihar, Índia)	Baixo custo e facilmente disponível em área endêmica	Pancreatite, arritmias cardíacas, resistência adquirida na Índia	(Singh, Singh e Sundar, 2003; Croft, Sundar e Fairlamb, 2006; Croft e Olliaro, 2011),
Anfotericina B (Antibiótico de polieno)	Forma complexos que se ligam ao ergosterol na membrana do parasito alterando a permeabilidade da membrana, o balanço iônico aumentando a morte celular; também atua como um inibidor da biossíntese do ergosterol	0,75–1,0mg/kg por 5–20 infusão diária ou alternada (i.v)	>95%	Eficaz em regiões onde há resistência do parasito ao antimônio, resistência primária desconhecida	Alto custo e necessidade de hospitalização prolongada, monitoramento, complicações renais hipocalemia	(Sundar et al., 2006; Sundar, Chakravarty et al., 2007; Croft e Olliaro, 2011)

Continua na página seguinte.

Continuação Tabela 2

<p>Anfotericina B Liposomal (AmBisome)</p>	<p>Entrega do fármaco direcionada para os macrófagos infectados e o mecanismo de ação é o mesmo que para a anfotericina convencional</p>	<p>3.0 mg/kg/dia por 5 dias (total 15mg) ou 10mg/kg como doses únicas, (i.v)</p>	<p>>96%</p>	<p>Altamente efectivo, baixa toxicidade, resistência no documentada</p>	<p>(Sundar et al., 2010)</p> <p>Alto custo</p>
<p>Paromomicina (antibiótico aminoglicósido), também conhecido como aminosidina</p>	<p>Mecanismo exato não é conhecido. Em bactérias, inibe a síntese de proteínas, mas em <i>Leishmania</i>, diminui o potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. donovani</i></p>	<p>1-1-15 mg/kg de base/dia por 21 dias (i.m)</p>	<p>95%</p>	<p>Atia em sinergia com os antimoniais, eficaz, bem tolerada, é a droga de mais baixo custo para a LV</p>	<p>(Sundar, Jha, et al., 2007; Sundar e Chakravarty, 2008; Jhingran et al., 2009)</p> <p>Nefrototoxicidade, Hepatotoxicidade, ototoxicidade reversível, carencia de eficácia no Leste de Africa</p>
<p>Pentamidina (Lomidina)</p>	<p>Acumula-se na mitocôndria do parasito e inibe a topoisomerase II mitocondrial ligando-se aos locais AT-ricos no sulco menor do DNA seguido a inibição de processo de transcrição</p>	<p>2-4 mg/kg/dia por três vezes semanalmente por 15-20 doses (i.m ou i.v)</p>	<p>70-80%</p>	<p>Baixa eficácia, tóxica. Pode ser usada em combinação com outros fármacos</p>	<p>Efeitos colaterais gastrointestinais, cardíacos, arritmias, hipotensão, pancreatite, e causa diabetes mellitus insulina-dependente irreversível</p> <p>(Das et al., 2001; Das et al., 2009)</p>

Continuação Tabela 2

Miltefosina (hexadecil-fosfo- colina)	Interage com a membrana celular do parasito por modulação dos receptores da superfície celular, metabolismo do inositol, e ativação das fosfolipases, induzindo morte celular por apoptose	50 mg/dia para adultos <25 kg e 100mg/dia em adultos >50 kg (oral)	85–95%	Primeiro medicamento oral para o tratamento das Leishmanioses. Medicamento de primeira linha no subcontinente indiano	Potencialmente teratogênico, vômitos e diarreia com toxicidade hepática e renal ocasional	(Sundar et al., 2006; Sundar et al., 2012)
---	--	--	--------	---	---	--

I.M= Intramuscular, I.V= Intravenoso. Adaptado com modificações de (Singh e Sundar, 2014).

1.3 Mecanismo de ação dos compostos antimoniais.

O metabolismo e mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes usados na terapia contra as Leishmanioses permanece pouco conhecido (FRÉZARD e DEMICHELI, 2010). No entanto, há dois modelos principais propostos para explicar esse mecanismo de ação. De acordo com o primeiro modelo, é predominantemente aceito que a forma ativa do Sb é sua forma oxidada +3 (antimônio trivalente Sb^{III}). Assim, o Sb^V funciona como um pró-fármaco que requer a redução biológica a Sb^{III} , para que ocorra a atividade leishmanicida. O local desta redução, se dentro do parasito (forma amastigota) ou no macrófago e o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) permanece controverso na literatura (JEDDI, PIARROUX e MARY, 2011; FRÉZARD et al., 2013). Esta hipótese de redução/ativação foi apresentada pela primeira vez em 1924 por Bramachari e colaboradores que trabalharam com o composto Sb^V uréia estibamina (BRAHMACHARI et al., 1924). Este estudo pioneiro feito em humanos demonstrou que além da baixa toxicidade da forma pentavalente do Sb em relação a sua forma trivalente, em parte pode ser atribuída às altas taxas de excreção renal do Sb^V quando comparado ao Sb^{III} . Neste estudo foi demonstrado que, a uréia estibamina Sb^V era convertida no interior do corpo na sua forma Sb^{III} devido a uma taxa de excreção bifásica do fármaco na sua forma Sb^V , cuja fase tardia era idêntica à taxa de excreção renal observada para o Sb^{III} . Essa baixa toxicidade Sb^V e sua redução para Sb^{III} no corpo foi posteriormente confirmada analiticamente por Goodwin e Page em 1943 (GOODWIN e PAGE, 1943).

A hipótese de redução/ativação é apoiada pelo fato de que Sb^{III} é consideravelmente mais potente contra o parasito do que Sb^V *in vitro*, tanto para promastigotas (MOTTRAM e COOMBS, 1985), como para amastigotas no interior de macrófagos (SERENO, ROY, et al., 2001), ou para culturas de amastigotas axênicos (amastigotas cultivadas sem macrófagos) (CALLAHAN et al., 1997; EPHROS, WALDMAN e ZILBERSTEIN, 1997; EPHROS et al., 1999; GOYARD et al., 2003). No entanto, o local da redução de Sb^V continua sob debate (FRÉZARD et al., 2013).

Uma série de estudos demonstraram que o Sb^V foi ineficaz contra amastigotas axênicos em cultivo em concentrações clinicamente relevantes, mas que teve um efeito sobre amastigotas intracelulares (ROBERTS e RAINEY, 1993; SERENO et al., 1998; SERENO, ROY, et al., 2001), sugerindo que a redução do Sb^V tem lugar no macrófago.

Em contraste, outros estudos mostraram que o Sb^V foi igualmente ativo tanto em amastigotas axênicos como em amastigotas intracelulares cultivados em concentrações semelhantes, sugerindo que a redução de Sb^V para Sb^{III} ocorre dentro do próprio parasito (CALLAHAN et al., 1997; EPHROS et al., 1999; SHAKED-MISHAN et al., 2001). Estas hipóteses não são incompatíveis, uma vez que é possível que a redução ocorra tanto no parasito como na célula hospedeira.

Considerando a hipótese de que o Sb^V é reduzido a Sb^{III} na célula, estudos recentes indicam que pelo menos quatro diferentes tiois podem agir como agentes redutores não enzimáticos nessa conversão: a glutatona, o tiol predominante no citosol de células de mamíferos; a cisteína e a cisteinil-glicina, os principais tiois presentes em lisossomos, e a tripanotona, o tiol predominante no citosol de *Leishmania* (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003). Vale ressaltar ainda que duas enzimas parasitárias, nominadas redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2), mostraram-se capazes de converter Sb^V a Sb^{III} dentro da célula, sugerindo a possível participação de enzimas do parasito nesse processo de redução enzimática (DENTON, MCGREGOR e COOMBS, 2004; ZHOU et al., 2004).

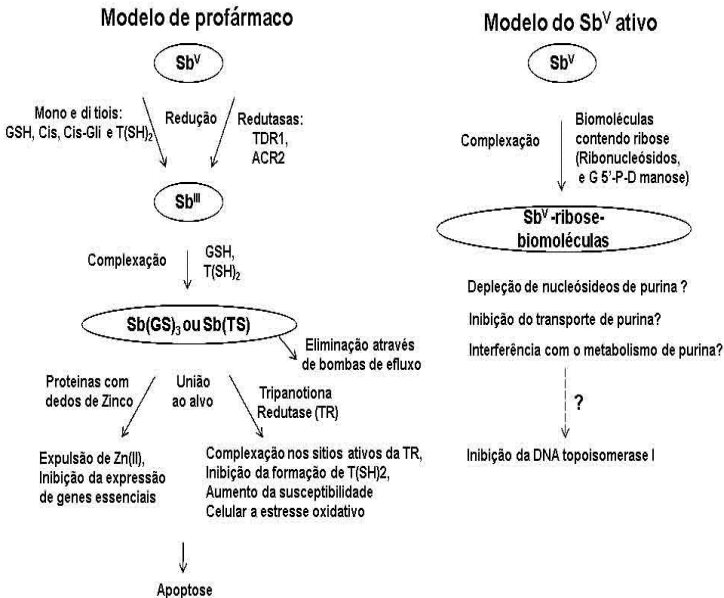
Por sua vez, os alvos de ação do Sb^{III} também são amplamente debatidos. Tem sido sugerido que o Sb^{III} pode destruir ou inibir enzimas ou proteínas através da ligação com os grupos sulfidrila (ROBERTS, BERMAN e RAINEY, 1995; YAN et al., 2003; CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006). Estas possíveis enzimas poderiam ser a glutatona redutase ou a tripanotona redutase (WYLLIE, CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 2004; YAN, JIN e SUN, 2005). A inibição destas enzimas causa distúrbios no potencial redox do parasito promovendo o efluxo dos tiois glutatona e tripanotona, levando à morte celular (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; WYLLIE, CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 2004).

Estudos da década de 1985 sugerem que o Sb^V inibe a biossíntese de outras macromoléculas em amastigotas (BERMAN, WADDELL e HANSON, 1985), possivelmente via perturbação do metabolismo energético, devido à inibição de glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (BERMAN, GALLALEE e BEST, 1987). Entretanto, os alvos específicos nessas vias não estão bem identificados. Estudos mais recentes têm relatado apoptose em amastigotas tratados com Sb^{III} , envolvendo fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina na superfície da membrana plasmática (SERENO, HOLZMULLER, et al., 2001; SUDHANDIRAN e SHAHA, 2003). Entretanto, esses efeitos

não envolvem a via clássica mediada por caspase e, portanto, não correspondem à mais rigorosa definição de apoptose (SERENO, HOLZMULLER, et al., 2001; JIANG e WANG, 2004).

Por outro lado, um segundo modelo propõe que há uma atividade intrínseca do antimônio contra a *Leishmania*, onde o mecanismo de ação do fármaco pode estar associado à formação de complexos estáveis entre o Sb^V e os ribonucleosídeos, o que pode inibir o transporte de purinas e gerar a depleção dos níveis de ATP e GTP intracelular resultando em posterior inibição da ação da topoisomerase do tipo I, ou também, o Sb^V pode interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito (LUCUMI et al., 1998; DEMICHELI et al., 2002). A figura 4 ilustra as hipóteses descritas acima.

Figura 4. Dois modelos principais propostos para o mecanismo de ação do antimonial pentavalente sobre *Leishmania* spp. De acordo com o "modelo profármaco", Sb^V é reduzido para Sb^{III} , a fim de exercer uma atividade leishmanicida. De acordo com o "modelo do Sb^V ativo", Sb^V apresenta uma atividade intrínseca leishmanicida.



Fonte: (FRÉZARD, DEMICHELI e RIBEIRO, 2009).

1.4 Resistência aos compostos antimoniais.

A fórmula ideal para o controle de uma infecção é prevenir a sua ocorrência. No entanto, apesar dos esforços, ainda não existe uma vacina para seres humanos contra parasitas patogênicos. A prevenção e o controle de vetores muitas vezes difíceis ou inviáveis fazem do tratamento medicamentoso uma das poucas opções racionais para o combate a infecções parasitárias.

A seleção de patógenos resistentes a drogas é uma ameaça bem conhecida no tratamento de diversas infecções e origens: bacteriana, viral, fúngica e parasitária. Em geral, o efeito primário na morte celular do patógeno induzida após tratamento envolve a interação do fármaco com um ou mais fatores que irão ativar uma cascata de reações. Como a quantidade do fármaco no sítio de ação é extremamente relevante, vários mecanismos tais como, a diminuição no influxo e/ou o aumento do efluxo da droga e sua inativação por diferentes vias metabólicas podem ser acionados para gerar fenótipos de resistência aos fármacos (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006).

A existência de efeitos colaterais e o fenômeno de resistência tanto natural quanto adquirida têm-se tornado um desafio cada vez maior (JACKSON et al., 1990; FARAUT-GAMBARELLI et al., 1997; LIRA et al., 1999). Cepas de *Leishmania* com diversos graus de resistência têm sido isoladas no Novo Mundo, sendo que *L. (V.) braziliensis* frequentemente apresenta resistência a tratamentos de curta duração ou em doses baixas (MOREIRA, ANACLETO e PETRILLO-PEIXOTO, 1998). No Velho Mundo, cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao glucantime têm sido isoladas de pacientes principalmente na Índia (SUNDAR et al., 2001). As principais causas para o aparecimento desta resistência incluem: uso indiscriminado do Glucantime nestas áreas, tratamento médico inadequado com doses baixas e descontínuas (SINGH e SUNDAR, 1995). Recentemente, Perry e colaboradores, sugeriram que a resistência de *L. donovani* ao antimonial observada na Índia pode ser atribuída, pelo menos em parte, ao aumento da contaminação da água potável por arsênico. Estes resultados destacam como fatores ambientais podem contribuir para o surgimento de resistência a fármacos antimicrobianos e as implicações que podem ter para o desenvolvimento de medicamentos (PERRY et al., 2013).

A resistência a fármacos é um grande impedimento para o sucesso do tratamento das leishmanioses (SUNDAR et al., 2000; GUERIN et al., 2002; SUNDAR, SINGH e SINGH, 2014). Infelizmente, a análise dos mecanismos de resistência em isolados naturais tem ficado de lado para

estúdios dos mecanismos de resistência em parasitos mutantes resistentes induzidos no laboratório. Para a geração de linhas celulares resistentes induzidas no laboratório, os parasitos de *Leishmania* spp. são expostos a concentrações crescentes do Sb^{III} , molécula ativa, por conseguinte, os mecanismos de resistência envolvidos baseiam-se principalmente na determinação da diminuição da concentração do fármaco dentro do parasito (ASHUTOSH, SUNDAR e GOYAL, 2007). Nestos modelos de estudo, a diminuição da concentração pode ser explicada pela diminuição na captação do Sb^{III} , mediante a diminuição da expressão de AQP1 (canal de captação de fármacos) ou pelo aumento do efluxo/sequestro da droga ativa em complexação com os tióis, mediante um aumento nos níveis de tióis e por amplificação dos transportadores do fármaco. Estes mecanismos têm sido demonstrados em vários mutantes resistentes laboratoriais (GRONDIN et al., 1997; LÉGARÉ et al., 1997; HAIMEUR et al., 2000; EL FADILI et al., 2005; MARQUIS et al., 2005) (Figura 5A).

Na resistência natural ao antimônio, os parasitos estão expostos a Sb^V , o que sugere uma etapa extra do mecanismo de resistência que envolve a diminuição da conversão da pró-droga Sb^V para Sb^{III} , tanto a nível da célula hospedeira quanto no parasito (Figura 5B). Com base em alguns estudos realizados com isolados naturais, foi demonstrado que os parasitos resistentes modulam a expressão de γ -GCS no macrófago (CARTER et al., 2006), diminuindo assim a concentração de GSH e também alterando a conversão do Sb^V para Sb^{III} mediada pelas células no hospedeiro. Por sua vez, o parasito também regula negativamente a expressão de enzimas-chaves para a síntese de GSH e T(SH)₂ (DECUYPERE et al., 2005), reduzindo assim a ativação do fármaco mediada pelos tióis do parasito. Além disso, também restringe a entrada de Sb^{III} no parasito através de uma redução da expressão de AQP1 (GOURBAL et al., 2004; OUELLETTE, DRUMMELSMITH e PAPAPOPOULOU, 2004). Por fim, o Sb^{III} que entra o parasito pode ser eliminado da célula por sequestro ou por efluxo dos complexos tiol- Sb^{III} . No entanto, essas etapas ainda precisam ser confirmadas com mais estudos. Assim, o mecanismo de resistência ao antimônio em parasitos naturalmente resistentes é multifatorial e pode diferir de resistência descrita dos parasitos induzidos a resistência no laboratório como se mostra na Figura 5A e 5B (ASHUTOSH, SUNDAR e GOYAL, 2007).

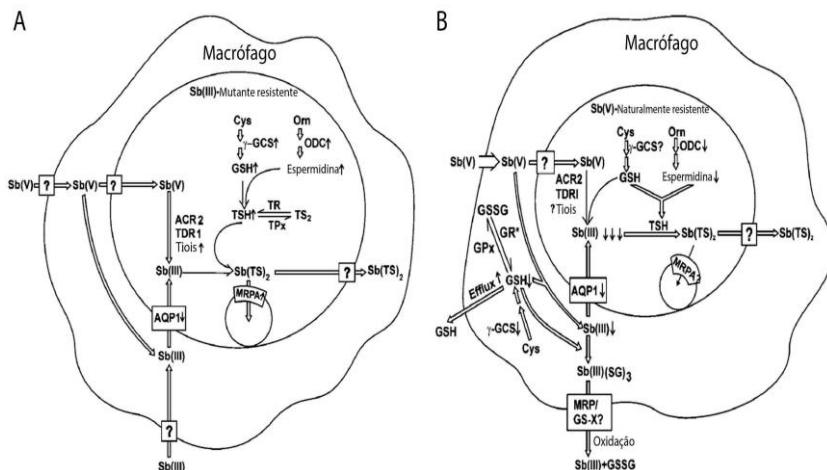


Figura 5. Esquema dos mecanismos de ação e resistência ao antimônio. A) Mutante resistente ao Sb^{III} gerado em laboratório. B) Cepa naturalmente resistente ao Sb^V de isolado clínico. A entrada do Sb^V no parasito ocorre por um transportador desconhecido, e Sb^{III} através da aquagliceroforina (AQP1). Em A) o nível de tripanotona (TSH) é aumentado devido ao aumento da atividade da ornitina descarboxilase (ODC) e γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GCS), enzimas limitantes para a biossíntese de tiol. A via de detoxificação inclui formação de complexos de Sb^{III} com o sequestro de TSH e subsequente sequestro via MRPA amplificado e/ou por bombas de efluxo desconhecidas. Em B) uma menor expressão de ODC levaria a uma menor biossíntese de tiol, inibindo a ativação de Sb^V . A diminuição da expressão de AQP1 também restringe a entrada de Sb^{III} para o parasito. Sb^{III} intracelular pode estar envolvido no sequestro ou no efluxo de conjugados Sb^{III} -Tiol, enquanto que em macrófagos é conjugado com GSH e eliminado por transportadores ABC. Fonte: (ASHUTOSH, SUNDAR e GOYAL, 2007).

1.5 Estresse oxidativo produzido por compostos antimoniais

O estresse oxidativo é a consequência inevitável do metabolismo aeróbico, espécies reativas de oxigênio (ROS) são amplamente definidas como substâncias químicas que contêm oxigênio com propriedades reativas. Estes ROS incluem a superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e os radicais livres de hidroxilo (HO^{\bullet}), bem como moléculas não-radicaais, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Estas moléculas são principalmente derivadas do oxigênio, que é consumido em várias reações metabólicas que ocorrem principalmente nas mitocôndrias, peroxissomas e no retículo endoplasmático (ER). Estima-se que cerca de 2% do oxigênio consumido pela mitocôndria é reduzido para formar superóxido; portanto, as mitocôndrias são consideradas como fontes importantes de ROS (FINKEL, 2012; HANDY e LOSCALZO, 2012). Por sua vez, os peroxissomas estão envolvidos tanto na eliminação de ROS (decomposição de H_2O_2 mediada pela catalase) como na produção de ROS (através da β -oxidação de ácidos graxos e da atividade da flavina oxidase) (SCHRADER e FAHIMI, 2006). O ER constitui um ambiente oxidante que favorece a formação de ligações dissulfeto e dobramento de proteínas, e aumenta os níveis de ROS através da oxidação das proteínas (MALHOTRA e KAUFMAN, 2007). ROS são constantemente produzidas por reações enzimáticas e não enzimáticas. As reações catalisadas por enzimas que geram ROS incluem aquelas que envolvem a NADPH oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase endotelial desacoplada (eNOS), ácido araquidônico e enzimas metabólicas, tais como as enzimas do citocromo P450, lipoxigenase e ciclooxigenase. A cadeia respiratória mitocondrial é uma fonte de não-enzimática de ROS (FINKEL, 2012).

Além disso, os agentes ambientais, como a radiação ionizante e radiação UV ou exposição a produtos xenobióticos pode gerar ROS intracelular (Henkler, Brinkmann e Luch, 2010; Gorrini, Harris e Mak, 2013). Este é o caso dos compostos de antimoniais, onde, por exemplo, Rais e colaboradores 2000, sugeriram que o Sb^V prepara os macrófagos para gerar ROS em resposta a vários estímulos e aumenta a atividade da NADPH-oxidase, enzima envolvida na produção de superóxido (RAIS et al., 2000). Em outro estudo, também tem sido demonstrado que o Sb^V induz a produção de ROS (principalmente H_2O_2) em macrófagos infectados por *Leishmania* através das vias de fosforilação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase C (PKC), ativação de Ras e sinal-extracelular quinase regulada (ERK) e o óxido nítrico

(NO) pelas vias PI3K e p38 proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Estes ROS/RNS posteriormente podem reagir diretamente com biomoléculas (por exemplo, proteínas, lipídios ou DNA), o que resulta em a geração de estresse oxidativo (MOOKERJEE BASU et al., 2006).

Portanto, a inibição dessas enzimas ou a adição de um quelante de radicais livres como N-acetilcisteína, inibe a morte mediada por antimônio de amastigotas intracelulares, reforçando a contribuição de ROS na atividade parasitária mediada por antimônio (MOOKERJEE BASU et al., 2006). Assim, é evidente que a eficácia de antimônio, como agente anti-leishmania depende da sua capacidade de gerar ROS/RNS dentro do parasito e/ou nos fagolisossomos de macrófagos infectados. Seria racional sugerir que as cepas de *Leishmania* com maior quantidade de tióis também possuem uma maior capacidade de eliminar os radicais livres e, portanto são mais propensos a não responder ao antimônio (MANDAL et al., 2007). Por sua vez, na célula hospedeira se tem observado um aumento na concentração de GSH oxidada (GSSG) intracelular, provavelmente devido à inibição da enzima glutationa redutase pelo Sb^{III} (CUNNINGHAM, ZVELEBIL e FAIRLAMB, 1994; WYLLIE, CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 2004; WYLLIE e FAIRLAMB, 2006). Consequentemente o acúmulo de GSSG, combinado com a perda de glutationa reduzida (GSH) através de efluxo de Sb^{III} , resulta em uma alteração significativa do potencial de óxido redução (redox), aumento da produção de ROS e na indução de apoptose nas células tratadas com Sb^{III} (WYLLIE e FAIRLAMB, 2006).

É bem conhecido que a exposição aos compostos Sb^V pode causar lesão celular e tecidal, em particular no coração, pulmão, fígado e rins. No entanto, é geralmente aceito que Sb^{III} , se apresente como resíduo nas formulações dos compostos antimoniais pentavalentes (SALAÜN e FRÉZARD, 2013) ou produzido nos tecidos por meio de redução do Sb^V (BRAHMACHARI et al., 1924; GOODWIN e PAGE, 1943; CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006; HANSEN et al., 2011), pode ser o responsável tanto por estes efeitos colaterais como pelo efeito leishmanicida da ação do fármaco, porém a natureza exata dos mecanismos subjacentes nestes processos não estão bem compreendidos (FRÉZARD, DEMICHELI e RIBEIRO, 2009).

Para manter a homeostase redox e eliminar os ROS, os organismos aeróbios estão equipados com antioxidantes enzimáticos/não-enzimáticos e proteínas sequestrantes de metais para prevenir ou interceptar a formação de oxidantes. Além disso, os mecanismos de

defesa antioxidantes são ativos para reparar e substituir macromoléculas danificadas. Assim, existem três principais sistemas tiol/dissulfeto envolvidos no controle do estado redox da célula para protegê-la contra potenciais agentes tóxicos ou químicos que causam estresse oxidativo (HADDAD, 2002). O primeiro deles é o sistema redox glutationa/glutaciona oxidada (GSH/GSSG), o qual representa o melhor determinante da capacidade antioxidante em células de mamíferos. Estudos da inibição da produção de GSH causam efeitos tóxicos nas células e, portanto esta estratégia tem sido utilizada para aumentar a sensibilidade de organismos patogênicos ou de células cancerosas para certas drogas ou para modular a resposta imune (GRIFFITH, 1999; LU, 2009). O segundo sistema redox inclui o sítio ativo das tioredoxinas ditiol/dissulfeto (Trxred/Trxox) que interagem com um subconjunto diferente de proteínas, sendo assim um sistema redox distinto ao sistema da GSH, mas complementar (JONES e GO, 2010). O último sistema redox tiol/dissulfeto, é a tripanotiona (N^1 , N^8 bis (glutacionilo) espermidina ($T[SH]_2$)/dissulfeto tripanotiona ($T[S]_2$) que é essencial na regulação da homeostase redox, bem como na defesa contra agentes químicos e estresse oxidativo em tripanossomatídeos (FAIRLAMB E CERAMI, 1992; FLOHÉ, HECHT e STEINERT, 1999; IRSCH e KRAUTH-SIEGEL, 2004; VICKERS e FAIRLAMB, 2004; IRIGOÍN et al., 2008)

Em resumo, os compostos antimoniais estimulam os macrófagos infectados para gerar um estresse oxidativo/nitrosativo sobre os parasitos intracelulares (RAIS et al., 2000; MOOKERJEE BASU et al., 2006). Igualmente, a forma reduzida do fármaco Sb^{III} , age diretamente sobre o parasito e a célula hospedeira perturbando o balanço redox (WYLLIE, CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 2004; MEHTA e SHAHA, 2006; BAIOTTO et al., 2009). Esta perturbação pode gerar o efeito citotóxico no hospedeiro e a ação leishmanicida do fármaco. Além disso, os tióis apresentam um papel duplo na farmacologia de antimônio pentavalente. Por um lado, os tióis promovem a ativação destes medicamentos através da redução não enzimática de Sb^V e por outro, promovem a detoxificação do fármaco pela formação de conjugados com o Sb^{III} para o efluxo e/ou sequestro (FRÉZARD et al., 2013). Porém, nos últimos anos há um crescente interesse científico nos estudos dos mecanismos de ação e resistência dos compostos antimoniais. Desta forma, os mecanismos moleculares envolvidos nestes processos estão sendo cada vez mais bem compreendidos o que

facilitará no curto prazo o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento das leishmanioses.

1.6 Transporte de compostos antimoniais

O estudo de quimioterápicos dirigidos à patógenos intracelulares deve considerar a internalização do fármaco na célula hospedeira e sua disponibilização ao patógeno intracelular. A *Leishmania* passa a maior parte de seu ciclo dentro de compartimentos especializados delimitados por membranas celulares (fagolisosoma). Os mecanismos de captação e efluxo de drogas pela célula hospedeira são ainda pouco conhecidos. A rota de entrada dos antimoniais ainda não é clara e devido à acumulação diferencial entre o Sb^V e Sb^{III} , particularmente observada em promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, sugere que o Sb^V utiliza diferentes vias de entrada nas células (FRÉZARD, MONTE-NETO e REIS, 2014). Os transportadores tipo AQP, MRP-1 e P-gp têm sido relacionados ao transporte de compostos antimoniais em células de mamíferos (JAHN e BIENERT, 2010). AQP-7 e AQP-9 foram descritos como transportadores de membrana internalizando glicerol e outros solutos neutros (CARBREY e AGRE, 2009) e também compostos antimoniais e arseniacais (WYSOCKI et al., 2001; LIU et al., 2002; BHATTACHARJEE et al., 2004; LIU, 2010). Na linhagem celular leucêmica K562, a superexpressão de AQP-9 leva à acumulação intracelular de Sb e sensibiliza estas células para As^{III} e Sb^{III} (BHATTACHARJEE et al., 2004). As AQPs têm sido descritas como transportadoras de Sb em *Leishmania* e *Escherichia coli in vitro* (GOURBAL et al., 2004; MARQUIS et al., 2005). Os genes *glpf* e *Fps1p*, homólogos de *aqp* em *E. coli* e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente, mediam a internalização de As^{III} e Sb^{III} (SANDERS et al., 1997; JAHN e BIENERT, 2010). Arsênio (As) e antimônio (Sb) são dois metalóides tóxicos com propriedades químicas semelhantes. O arsênio é classificado como grupo I entre os carcinógenos em humanos e afeta a saúde de milhões de pessoas através da água potável e alimentos contaminados com este metal (MEHARG, 2004; BHATTACHARJEE, 2007; RAHMAN e HASEGAWA, 2011). Por sua vez, Sb é menos abundante no ambiente do que o As e pouco se sabe sobre sua carcinogenicidade e mecanismos de ação (BEYERSMANN e HARTWIG, 2008; JAHN e BIENERT, 2010). Assim, os mecanismos de internalização, efluxo e detoxificação descritos em diferentes tipos celulares estão resumidos na figura 6.

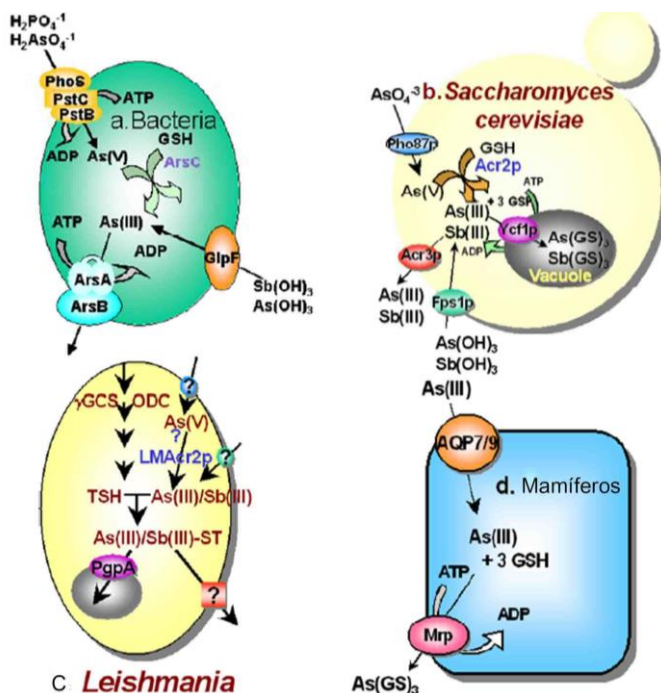


Figura 6. Comparação das vias de transporte e detoxificação de arsênio e antimônio em diferentes organismos. (a)= *E. coli*, (b)= *S. cerevisiae*, (c)= *Leishmania*, e (d)= mamíferos. Em *E. coli*, o arsenito é eliminado do citosol pelas bombas de efluxo ArsA e ArsB. Na levedura, As^{III} é eliminado do citosol pela bomba de efluxo Acr3p e do vacúolo pela bomba Ycf1p acoplada a ATP como As(GS)₃. Em mamíferos, diferentes isoformas da proteína associada à resistência de múltiplas drogas (MRP), um homólogo a bomba de efluxo Ycf1p, participam no efluxo da droga na forma As(GS)₃ para fora das células. Em *Leishmania* as bombas de efluxo da membrana plasmática eliminam os complexos de As-tripantona juntamente com o sequestro no interior de vesículas intracelulares por uma proteína PGPA homóloga a MRP. Em todos os tipos celulares a captação do As^{III} e Sb^{III} é facilitada por aquagliceroporinas: Em bactérias se tem descrito a aquaporina GlpF, em leveduras a Fps1p, em *Leishmania* a AQP1 e em mamíferos a AQP7 ou AQP9. Fonte: (ROSEN, 2002; JAHN e BIENERT, 2010).

Assim como a captação, a eliminação de compostos antimoniais é feita em células eucariotas, possivelmente conjugando o Sb com um grupo tiol mediado por transportadores de membrana tipo P-gp e MRP-1

(SALERNO e GARNIER-SUILLEROT, 2003). A superexpressão destes transportadores está relacionada ao fenótipo de resistência ao Sb em *Leishmania* e células cancerígenas. Em *Leishmania*, a P-gp A (membro da família de transportadores ABC tipo MRP) confere resistência a compostos antimoniais mediante o seqüestro de conjugados de Sb-tiol em vesículas intracelulares (LÉGARÉ, CAYER, et al., 2001; LÉGARÉ, RICHARD, et al., 2001). A superexpressão de P-gp (MDR-1) na linhagem celular cancerosa GLC4, resulta na redução significativa de Sb intracelular, como consequência de um aumento no efluxo do composto (VERNHET et al., 1999; VERNHET et al., 2000).

Interessantemente, o papel de transportadores de compostos antimoniais e de genes de estresse oxidativo de macrófagos envolvidos no acúmulo, distribuição e detoxificação de Sb em *Leishmania* intracelular têm sido praticamente inexplorados. Em um estudo recente, Mookerjee e cols, demonstraram que a infecção *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos com *L. donovani* resistente ao Sb, mas não com cepa sensível a Sb, induz a expressão dos transportadores de drogas P-gp e MRP-1 na superfície das células infectadas (MOOKERJEE BASU et al., 2008). Isto resulta na redução de Sb acumulado, permitindo assim a replicação e a sobrevivência intracelular do parasito. De modo similar, os autores demonstram que em monócitos de pacientes com falha terapêutica ao SAG (PENTOSTAM®), os genes MRP-1 e P-gp estavam superexpressos e as células não acumulavam Sb *in vitro*. A superexpressão destes transportadores em monócitos periféricos foi sugerida como resultado da interação destas células com antígenos de *L. donovani* resistentes ao Sb (MOOKERJEE BASU et al., 2008).

Recentemente tem sido descrito o envolvimento dos transportadores ABCB6 e MT2A como responsáveis pela distribuição do antimônio Sb^V em compartimentos intracelulares, indicando que a superexpressão destes genes promove o contato do medicamento com o patógeno, potenciando a morte intracelular do parasito (GÓMEZ et al., 2013).

Conjuntamente, estas observações sugerem que P-gp, MRP-1, ABCB6 e MT2A, podem estar envolvidas no efluxo e distribuição de compostos antimoniais nas células do hospedeiro, inibindo o acúmulo intracelular do composto facilitando a sobrevivência intracelular do parasito. Uma pesquisa extensa da literatura mostrou que estes relatos são as únicas publicações que abordam o papel de transportadores de fármacos em células do hospedeiro infectadas com *Leishmania*.

O papel das células hospedeiras na detoxificação e no transporte de fármacos é um conhecimento fundamental para o entendimento da terapêutica dos antimoniais. Além disso, o conhecimento dos eventos moleculares provavelmente envolvidos na regulação desses fenômenos permite o estabelecimento de modelos de interação entre o parasito-antimônio e sua célula hospedeira, e serve como um ponto de referência para a definição racional dos limites que definem a sensibilidade intracelular do parasito.

2 JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses continuam sendo um problema prioritário de saúde pública e social a nível mundial (DESJEUX, 2001). Segundo os relatos da Organização Mundial da Saúde, esta doença é endêmica em 98 países da América Latina, Ásia e África, onde mais de 350 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair a infecção, e estima-se que atualmente cerca de 15 milhões de pessoas estão infectadas no mundo com uma incidência anual de dois milhões de casos (WHO, 2014). Com uma carga da doença estimada pela perda de anos úteis de vida (DALYs) da ordem de 2,4 milhões de anos, as Leishmanioses estão entre as doenças parasitárias que representam o maior peso econômico e social, superada apenas pela malária (MURRAY et al., 2012). Em uma análise global do impacto de todas as doenças infecciosas sobre a saúde humana, as leishmanioses ocupam o nono lugar (WHO, 2014).

Com cerca de 35.000 casos relatados anualmente durante os últimos anos no Brasil (WHO, 2014), e a complexidade de fatores de risco associados como a migração, desmatamento e urbanização da transmissão, o panorama epidemiológico da Leishmaniose no Brasil é alarmante (DESJEUX, 2001; BERN, MAGUIRE e ALVAR, 2008).

Na ausência de uma vacina disponível e a limitada eficácia das estratégias de controle de vetores, o controle da Leishmaniose depende principalmente da detecção precoce de casos e o tratamento quimioterápico. Contudo, variações na eficácia dos fármacos utilizados no tratamento das Leishmanioses estão relacionadas a diferenças na sensibilidade de espécies de *Leishmania* à droga, ao sistema imune do hospedeiro e às propriedades farmacocinéticas da droga, Esses fatores associados ao desenvolvimento de resistência demonstram que a resposta terapêutica é complexa e multifatorial e constitui em uma das principais razões para falhas no tratamento quimioterápico (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006; REVEIZ et al., 2013).

Sendo a *Leishmania* um patógeno intracelular e para interferir na multiplicação do patógeno exercendo a sua ação, o fármaco deve ser capaz de atravessar as membranas celulares, tornar-se ativo, encontrar o seu alvo intracelular, e provocar o dano celular. Além disso, o efeito deverá ser suficiente para que o patógeno seja eliminado pela ação direta do fármaco, tenha sua replicação inibida, ou torne-se susceptível a resposta imune do hospedeiro ou finalmente, uma combinação desses efeitos. Contudo, os mecanismos que regulam estes processos são ainda

desconhecidos. Portanto, o entendimento dos mecanismos de detoxificação e transporte de fármacos na célula hospedeira, permitirão dar bases conceituais para o melhoramento da eficácia terapêutica de fármacos.

No presente estudo pretendemos avaliar a hipótese de que: **A expressão diferencial de genes da defesa antioxidante e do transporte de fármacos em macrófagos humanos está envolvida na sobrevivência intracelular do parasito, quando expostos ao tratamento com Glucantime *in vitro*.**

3 OBJETIVOS:

3.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar funcionalmente genes associados ao estresse oxidativo e ao transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1 Determinar a expressão diferencial de genes envolvidos no estresse oxidativo e no transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime.

3.2.2 Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na defesa antioxidante e no transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com *Leishmania* e expostos ao Glucantime.

3.2.3 Determinar o papel funcional de genes envolvidos na defesa antioxidante e no transporte de fármacos sobre a sensibilidade *in vitro* de *L. braziliensis* em macrófagos humanos infectados e tratados com Glucantime.

4 METODOLOGIA

4.1 Parasitos, cultivos celulares, seleção de doadores e isolamento de monócitos de sangue periférico.

4.1.1 Parasitos

Foram utilizadas promastigotas de *Leishmania Viannia braziliensis* (MHO/BR/75/M2904) mantidas a 26°C através de repiques semanais em meio *Schneider's Insect medium* suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (HENDRICKS e WRIGHT, 1979). Promastigotas em fase estacionária (6º dia) de cultivo em meio Agar sangue bifásico a 26°C (REY et al., 1990) foram utilizados nos ensaios de infecção dos macrófagos. Para tanto, os parasitos foram lavados duas vezes em DPBS 1X (*Dulbecco's buffered saline solution*) por centrifugação a 900 x g por 10 minutos e opsonizados durante 1 hora a 34°C em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro AB humano inativado a 56°C por 30 minutos (ROMERO et al., 2010).

4.1.2 Linhagem Celular THP-1

A linhagem celular THP-1 (ATCC® TIB202™) foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF, 2 mM de glutamato, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Macrófagos da linhagem celular THP-1 foram obtidos pela diferenciação das células em fase logarítmica utilizando meio de cultivo contendo 50ng/mL de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (SERENO, GUILVARD, et al., 2001).

4.1.3 Isolamento e cultura de macrófagos humanos derivados de monócitos de sangue periférico (MDMs).

Sangue periférico (150 mL) foi coletado de cinco voluntários adultos saudáveis, de acordo com o protocolo e com termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina (processo 2190 FR: 453659) e conduzidos em conformidade com as diretrizes nacionais e internacionais para a proteção de seres humanos contra os riscos de pesquisa. Os cinco doadores foram selecionados de uma triagem de 20 indivíduos oriundos de áreas não-endêmicas para Leishmaniose e que foram negativos para a infecção por *Leishmania* spp avaliada por PCR usando os iniciadores 150 (5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(C/G)CGAA 3') e 152 (5' (C/G)(C/G)(C/G)(A/T)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC

3') dirigidos a um fragmento de 120 pb da região conservada do minicirculo do kDNA (VOLPINI et al., 2004). As características avaliadas e os resultados da triagem nos 20 doadores saudáveis estão apresentados na Tabela S1 pag. 151.

Células mononucleadas do sangue periférico (*PBMC's*) foram isoladas mediante centrifugação num gradiente de *Ficoll-Histopaque*. Os monócitos foram diferenciados para macrófagos pela aderência em placas sob procedimentos padrão (WAHL et al., 2006). Resumidamente, 1×10^7 células (*PBMC's*) foram semeadas em placas de seis poços durante 2 horas a 37°C para adesão celular. Após a lavagem, as células aderentes foram diferenciadas para macrófagos derivados de monócitos (MDM), durante sete dias em cultivo (37°C, 5% de CO₂), em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de plasma autólogo humano até sua utilização nos ensaios de infecção com *L. braziliensis* e tratamento com Glucantime como descrito no item 4.2.

4.2 Infecção de macrófagos com *L. braziliensis* e tratamento com Glucantime.

Os macrófagos (derivados de THP-1 e MDM de humanos) foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* opsonizadas na proporção parasito:célula de 10:1. A interação das células com os parasitos foi de 1 hora em meio RPMI livre de soro bovino fetal (SBF) a 34°C e 5% de CO₂ e os parasitos livres foram removidos mediante três lavagens com D-PBS. Após 24 horas de incubação (34°C, 5% CO₂) tempo necessário para o desenvolvimento completo de amastigotas intracelulares, os macrófagos infectados foram tratados com Glucantime® (antimoniato de meglumina Sb^V) na concentração de 32 µg/mL (CI₅₀ determinada experimentalmente) por 48h com reposição do Glucantime® as 24 horas e incubadas a 34°C, 5% de CO₂ (ROJAS et al., 2006). As amostras foram coletadas e armazenadas diretamente em Trizol (Invitrogen) para a avaliação do perfil de expressão gênica por *PCR array* ou precipitadas para a determinação da expressão de proteínas por Western blot. Em paralelo, células foram semeadas em *chamber slide* e infectadas. Após 24 horas de infecção as monocamadas infectadas foram tratadas com Sb^V como se describe acima neste mesmo paragrafo ou não tratadas e coradas pelo Giemsa e o percentual de células infectadas e o número de parasitos por célula determinado pela contagem microscópica (objetiva de 100X) de 200-300 células/poço. A sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* ao Sb^V foi determinada pela porcentagem de sobrevivência medida pelo percentual de carga

parasitaria (Equação 1). O índice parasitário (IP) foi determinado pela (Equação 2) e a redução do percentual de células infectadas pela (Equação 3) conforme descrito por (SERENO, GUILVARD, et al., 2001). Todos os ensaios foram realizados em duplicata ou triplicata e a avaliação das lâminas feita de forma codificada, sendo a revelação do código feita somente após a finalização das leituras.

Equação 1:

$$\% \text{ Sobrevivência} = \frac{\text{Número médio de amastigotas/células tratadas}}{\text{Número médio de amastigotas/células sem tratamento}} \times 100$$

Equação 2:

$$\% \text{ redução do IP} = 100 - \left[\frac{\text{Média de amastigotas/células tratadas} \times \% \text{ células infectadas tratadas}}{\text{Média de amastigotas/células não tratadas} \times \% \text{ células infectadas não tratadas}} \times 100 \right]$$

Equação 3:

$$\% \text{ Infecção} = \frac{\text{Número médio de células infectadas tratadas}}{\text{Número médio de células infectadas não tratadas}} \times 100$$

4.3 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído com o RNeasy Mini Kit (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante. O RNA obtido foi dosado em espectrofotômetro PicoDrop P200 (PicoDrop Technologies). A síntese do cDNA foi realizada utilizando-se o RT²FirstStrand kit (SABiosciences). Setecentos nanogramas de RNA total foram submetidos à transcrição reversa em um volume final de 20 µL seguindo as recomendações do fabricante e incluindo um passo adicional de eliminação do ADN genômico recomendado pelo fabricante. A transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 95 °C durante 5 min. O cDNA foi diluído pela adição de água livre de RNase (91µL) e armazenado a -20 °C até à sua utilização.

4.4 Ensaios de expressão de genes de estresse oxidativo e de transportadores de medicamento em MDM de humanos.

Os níveis de expressão gênica de genes *mt3*, *aqp9*, *pgp* e *mrp* classicamente envolvidos no transporte do Glucantime foram avaliados através de RT-qPCR. Adicionalmente foram avaliados outros genes putativamente envolvidos neste processo através de *PCR-Array*, com o objetivo de entender o possível papel do macrófago no modo de ação do Sb^V contra a *Leishmania*, análises da expressão proteica foram realizadas mediante Western blot.

4.4.1 Análise da expressão gênica de *mt3*, *aqp-9*, *mdr-1* (*pgp*) e *mrp-1* em macrófagos humanos por RT-qPCR.

Como prova de conceito foi realizada a avaliação da expressão gênica desses genes classicamente envolvidos no transporte de

medicamento através de RT-qPCR em macrófagos humanos. A amplificação dos genes de interesse foi realizada empregando-se o sistema "TaqMan® Amplitaq Gold Universal Master Mix" (AppliedBiosystems) e sondas e oligonucleotídeos especificamente desenhados para sua amplificação, seguindo as recomendações do fabricante (AppliedBiosystems). O gene *gapdh* foi utilizado como gene normalizador e os dados foram obtidos por RT-qPCR utilizando um termociclador AppliedBiosystem 7900 (AppliedBiosystem). As características quanto ao tamanho do fragmento amplificado e eficiência de amplificação podem ser consultadas mediante cadastro no site do fabricante AppliedBiosystem <https://www.lifetechnologies.com/br/en/home.html>). O controle da variação intra e inter ensaio e da eficiência de amplificação dos iniciadores foi controlada utilizando o *qPCR Human Reference Total RNA control* (Número de catálogo 636690) de Clontech, segundo as especificações do fabricante.

4.4.2 Análise de Arrays em MDM de humanos.

Nos ensaios de expressão gênica por *PCR arrays* foi utilizado cDNA sintetizado a partir do RNA isolado de macrófagos humanos infectados e não infectados com *L. braziliensis*, tratados ou não tratados com Sb^V. A avaliação dos níveis de expressão gênica em 168 genes por *PCR arrays* foi feita utilizando o kit (*The Human Oxidative Stress* e o *The Human Drug Transporters RT² Profiler™ PCR Array*, número de catalogo PAHS-065Z e PAHS-070Z, respectivamente, QIAGEN) seguindo as especificações do fabricante. O agrupamento funcional da matriz de estresse oxidativo se divide em 2 grupos implicados na defesa antioxidante (Glutathiona peroxidases (GPx), outras peroxidases, peroxiredoxinas (TPx)), outros antioxidantes e o grupo de genes envolvidos no metabolismo de espécies reativas de oxigênio (ROS) como (Superoxido dismutases (SOD), Outros genes envolvidos no metabolismo de superóxidos, genes de resposta a estresse oxidativo e transportadores de oxigênio) Tabela S2 pag. 153.

A matriz de transportadores de fármacos se divide em 7 grupos funcionais implicados no transporte de fármacos dentro dos quais estão os transportadores da família ABC, transportadores carreadores de solutos (SLC) e outros transportadores como (H⁺-ATPase vacuolar, bombas de cobre, aquaporinas, proteína principal da *Vault* e canais de ânions voltagem-dependentes) Tabela S3 pag. 157. Para o desenvolvimentos desta tese foram utilizados iniciadores validados pelo

fabricante e as suas características quanto a o tamanho do fragmento amplificado, eficiência de amplificação e T_m podem ser consultadas gene a gene mediante prévio cadastro no site do fabricante QIAGEN (<http://www.qiagen.com>).

Os experimentos de *PCR-array* foram realizados nas seguintes condições de temperatura: Ativação inicial da DNA polimerase por 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos por 15s a 95°C e 1 min a 60°C (fase de quantificação) e por final uma fase de análises da curva de dissociação usando o modo padrão no instrumento ABI 7900HT FAST (AppliedBiosystem).

As análises dos dados de *PCR arrays* e a determinação dos níveis de expressão foram realizadas utilizando a plataforma em linha de análise de *arrays* disponibilizada pelo fabricante (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). A média de cinco genes referencia [*beta-2-microglobulin (b2m)*, *hypoxanthine phosphoribosyl transferase 1 (hpvt1)*, *ribosomal protein L12a (rpl13a)*, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (gapdh)*, e *β -actin (actb)*] foram utilizados para obter os valores de ΔC_t para cada gene de interesse. Os níveis de expressão relativa foram calculados usando o método do $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ comparando os níveis de expressão de cada gene em MDM infectados com *L. braziliensis*, MDM de humano tratados com Glucantime e em MDM infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime vs os níveis de expressão em MDM sem infecção e sem tratamento com Glucantime como controle.

4.5 Análises de expressão de proteínas de estresse oxidativo e de transporte de fármacos em MDM.

Extratos proteicos totais foram obtidos de macrófagos humanos recoletados segundo descrito no item 4.2. Os precipitados de células foram lavadas como D-PBS 1X e lisados por repetidos ciclos de pipetagem em tampão de lise contendo (0,25 M sucrose, 0,25% Triton X-100, 10 mM EDTA) e um coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich). O debris celular foi removido mediante centrifugação a 12,000 x g por 20 min at 4°C (ROMERO et al., 2014). A concentração de proteína nos extratos foi determinada pelo micrométodo de Bradford (Biorad) usando BSA como padrão e os extratos proteicos foram estocadas a -20°C até o seu uso. Extratos proteicos solúveis (22 μ g) das diferentes condições de MDM de humanos foram separadas por eletroforese em gel SDS-PAGE (12% ou 15%), de acordo com o tamanho da proteína predita e eletrotransferidas para membranas de

nitrocelulose (GE Healthcare) com tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM de glicina; 20% (v/v) metanol, pH 8,3) usando métodos padrão (GALLAGHER et al., 2008). As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em tampão de bloqueio (25 mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl 0,1 % Tween-20) por 1 h a temperatura ambiente. Após do bloqueio as membranas foram incubadas por 1 h a 37°C com os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CAT (sc-365738), anti-GPX1/2 (sc-74498), anti-GSR (sc-133136), anti-GSS (sc-365863), anti-GSTP1 (sc-66000), anti-SOD3 (sc-376948), anti-TRX (sc-166393), anti-ABCB11 (sc-74500) produzidos em camundongo, e com os anticorpos policlonais anti-GCLM (sc-22754), anti-ABCB6 (sc-98685), anti-SLC22A1 (sc-133866) produzidos em coelho, anti-ABCB5 (sc-104019) e anti-actina produzidos em cabra. A actina foi utilizada como proteína normalizadora no ensaio de expressão proteica. Os anticorpos primários foram usados na diluição de 1:200 ou 1:400. Após de cinco lavagens, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo, coelho ou de cabra conjugados com peroxidase (1:10.000) por 1 hora a 37°C e a seguir as membranas foram lavadas e reveladas através da utilização do kit ECL (Pierce) de acordo com as recomendações do fabricante. As análises de densitometria dos resultados de Western blot foram realizadas usando o software Image J 1.463r subtraindo o ruído de cada blot antes de medir a intensidade da banda específica. A intensidade da banda das proteínas de interesse vs a intensidade da banda de seu correspondente controle de carga (β -ACTINA) foi usada para determinar a expressão relativa em cada uma das amostras avaliadas. Os anticorpos utilizados nesta tese estão comercialmente disponíveis pelo fabricante Santa Cruz.

4.6 Análise da função de genes associados à defesa antioxidante em macrófagos THP-1 humanos.

4.6.1 Localização celular do Transportador ABCB5.

A localização celular dos transportadores é fundamental para determinar sua atividade de transporte. Para avaliar se o tratamento com Glucantime® ou a infecção por *Leishmania* afeta a localização subcelular dos transportadores, macrófagos da linhagem celular THP-1 submetidos às condições experimentais anteriormente descritas, foram lavados duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído por 10 min a temperatura ambiente e permeabilizadas por 5 min com PBS 1X e 0,05% Triton X-100.

Depois do bloqueio com BSA a 1% em PBS 1X, os macrófagos em *chamber slide* foram incubados com o anticorpo específico contra o transportador ABCB5. A co-localização do transportador com vacúolos parasitóforos contendo *Leishmania* foi realizada mediante dupla marcação com o marcador de fagossomo LAMP-1 (sc-20011) e os anticorpos secundários AlexaFluor 488 e AlexaFluor 594 (Life Technologies). O corante Hoechst H6024 (SIGMA-ALDRICH) foi utilizado como marcador nuclear. Após a montagem das lâminas com Hydromount, as células foram visualizadas e analisadas em microscópio confocal laser Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) objetiva de 63X. Os procedimentos de localização celular do transportador ABCB5 foram realizados seguindo os protocolos padrão do Laboratório de Biologia Celular, Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-Curitiba, Brasil e realizados em colaboração com o Dr. Maurilio José Soares.

4.6.2 Estudos de inibição específica dos genes *gstp1*, *gss*, *trx* e *abcb5* em resposta a infecção com *L. braziliensis* e o tratamento com Glucantime® em macrófagos THP-1 humanos.

Os estudos de funcionalidade dos genes *gstp1*, *gss*, *trx* e *abcb5* foram realizados pela inibição específica do gene utilizando três sequencias de siRNA validadas para cada alvo de interesse em macrófagos humanos THP-1 (Tabela S4 pag. 161) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (QIAGEN), com alguns modificações. Para tanto, $2,5 \times 10^5$ macrófagos THP-1 diferenciados como descrito no item 4.1.2 em placas de 24 poços ou 1×10^5 macrófagos THP-1 diferenciados em *Chamber Slide* foram transfectados usando o reagente de transfecção HiPerFect (QIAGEN). Vinte e cinco nM de cada sequencia de siRNA para cada alvo (*gstp1*, *gss*, *trx*, *abcb5* e *actina*) foi acrescentado a um volume de 100 μ L de RPMI sem soro e a seguir 9 μ L do reagente de transfecção foi adicionado. A mistura foi incubada por 10 min a temperatura ambiente para permitir a formação do complexo de transfecção siRNA gene Alvo-HiPerfect. O complexo formado foi deixado em contato com as células por 6 h em volume final de 600 μ L de meio RPMI sem soro em atmosfera controlada. Após as 6h, o meio foi trocado e as células permaneceram por mais 1h em atmosfera controlada e posteriormente foram usadas para realizar as infecções com *L. braziliensis* e o tratamento com Glucantime como descrito no item 4.2.

A manipulação bem sucedida do gene de interesse foi confirmada por meio de RT-qPCR do mRNA e análise mediante ensaios de Western blot nas linhagens celulares selvagens e mutantes, usando iniciadores específicos para os genes e anticorpos para as proteínas de interesse seguindo os procedimentos padronizados descritos no item 4.4 e 4.5. As características dos iniciadores estão detalhadas na Tabela S5 pag 162. Para avaliar o efeito da inibição dos genes *gstp1*, *gss*, *trx*, *abcb5* e β -*actina* na sensibilidade intracelular de *Leishmania* ao Sb^V em macrófagos THP-1 foi determinada a porcentagem de sobrevivência intracelular como descrito no item 4.2.

Em todos os experimentos um controle de não silenciamento *nonsilencing scrambled siRNA* (AllStars negative control AF488, QIAGEN), que não tem homologia conhecida em genes de mamífero, foi utilizado como um controle negativo e como controle positivo utilizamos o siRNA HsACTB6, que tem como sequencia alvo o gene de expressão constitutiva β -*actina*. A utilização de um controle negativo de siRNA modificado com o fluoróforo permitiu fazer o seguimento da eficiência e estabilidade de transfecção ao longo do experimento utilizando microscopia de fluorescência.

4.7 Análises de Dados.

Os resultados foram expressos como porcentagens, médias e desvio padrão ou erro padrão segundo indicado nos gráficos. As análises comparativas das variáveis quantitativas foram realizadas utilizando o teste T-Student, ou análise de variância ANOVA de uma ou duas vias. Para a determinação de correlação entre as variáveis foi usado o teste não paramétrico de coeficiente de correlação de Spearman. Em todos os experimentos foram determinados coeficientes de variação para a determinação da variação intra e inter ensaios. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graphpad 5.0. Diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS.

O Tratamento com Glucantime afeta a sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MDM de humanos.

Neste estudo, como prova de conceito, a sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* em MDM de humanos de doadores saudáveis foi determinada quando estas células infectadas foram tratados com Sb^V a uma dose de 32 µg/mL. Os resultados de sensibilidade obtidos a partir dos dados da sobrevivência intracelular e da diminuição do índice parasitário por microscopia, claramente distinguem o grupo de MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* do grupo MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* tratados com Sb^V (Figura 7A e 7B). Neste último grupo houve uma diminuição significativa ($p= 0,03$) na porcentagem de sobrevivência intracelular e na porcentagem de redução do índice parasitário do 54,8% e 67,1%, respectivamente (Figura 7A e 7B).

Contrariamente ao obtido na avaliação da sensibilidade ao Sb^V utilizando os parâmetros de sobrevivência e índice parasitário, a estimativa obtida a partir da porcentagem de células infectadas, não permitiu discernir significativamente entre os grupos de MDM de humanos infectados tratados dos infectados e não tratados (Figura 7C). Na avaliação da sensibilidade pela porcentagem de células infectadas houve uma diferença de 16,6% entre o grupo MDM de humanos infectados e o grupo de MDM infectados e tratados, mostrando a incapacidade de discriminar entre os grupos de estudo utilizando este parâmetro.

Destaca-se igualmente que houve uma variação de 18% (estatisticamente não significativa) na porcentagem de redução do índice parasitário em macrófagos provenientes dos cinco voluntários saudáveis selecionados para os estudos de avaliação da expressão gênica e proteica, mesmo tendo usado indivíduos com características similares quanto a capacidade de diferenciação a MDM.

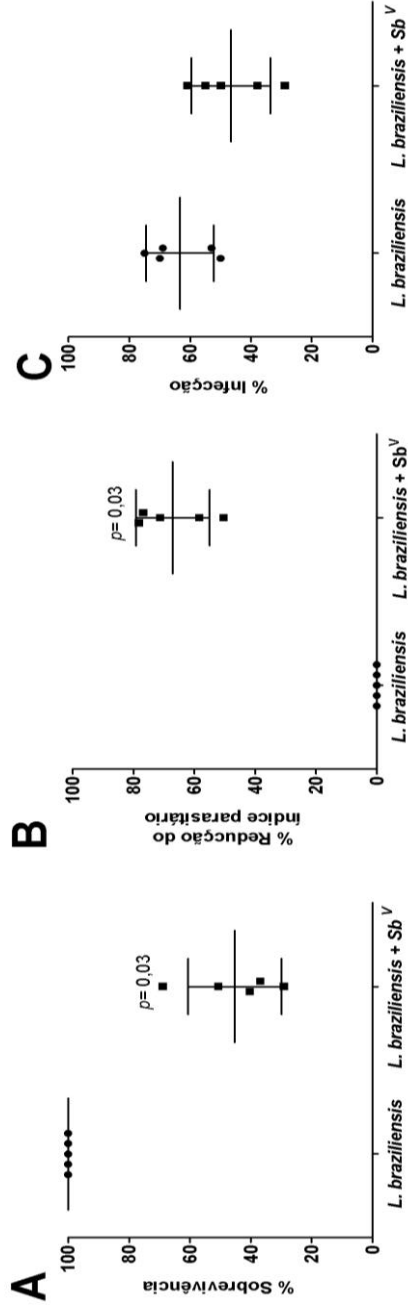


Figura 7. Sensibilidade de *Leishmania braziliensis* ao Glucantime (Sb^V) em MDM de humanos. A= Porcentagem de sobrevivência intracelular, B= Índice parasitário e C= Porcentagem de células infectadas. Os valores são apresentados como a média da triplicata de cinco voluntários saudáveis. As diferenças foram analisadas com relação ao grupo de MDM infectados com *L. braziliensis* sem tratamento, usando o teste t de Student, e o valor $p < 0,03$ encontram-se destacado.

Efeito do tratamento com Glucantime e a infecção com *L. braziliensis* sobre os níveis de expressão gênica nas vias de estresse oxidativo e de transportadores de fármacos em MDM de humanos.

Para avaliar os perfis de expressão de genes em MDM de humanos em resposta a uma infecção prolongada com *L. braziliensis*, ao tratamento por 72 horas com Glucantime ou simultaneamente com as duas condições, foram utilizadas matrizes de PCR (*PCR arrays*) comercialmente disponíveis, de 84 genes da via de estresse oxidativo e 84 genes transportadores de fármacos. Neste estudo usando um ponto de corte arbitrário nos níveis de expressão diferencial três vezes maior que o grupo controle (MDM de humanos sem infecção e sem tratamento), encontramos que 19,6% (33/168) dos genes foram regulados positivamente no grupo de MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime (Figura 8A, Tabela S6 e Tabela S7 pag. 163 e 168). Dos 33 genes regulados positivamente no grupo de MDM de humanos infectados e tratados com Sb^V, 54,5% (18/33) deles pertencem a via de estresse oxidativo e 45,5% (15/33) ao transporte de fármacos (Figura 8B e 8C).

Entre os genes diferencialmente expressos no grupo de MDM de humanos infectados com *Leishmania* e tratados com Sb^V, encontram-se os genes que codificam para *gstp1* (Glutathione S-transferase pi1), *gss* (Glutathione sintetase), *gsr* (Glutathione redutase), *gpx2* (Glutathione peroxidase 2 gastrointestinal), *gpx3* (Glutathione peroxidase 3 de plasma), *cat* (Catalase), *hmoxl* (*Heme oxygenase (decycling) 1*), TRX (Tioredoxina), *abcb5* (*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5*), *abcb6* (*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6*), *abcb11* (*ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11*), *slc7a11* (*solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc- system), member 11*), *slc22a1* (*solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1*), os quais apresentam valores nos seus níveis de expressão entre 3,06 e 15,98 vezes mais elevados que o grupo controle, sendo que o gene *gstp1* foi o que apresentou o maior valor e o gene *gpx3* o que teve o menor valor de regulação positiva (Tabela S6 e Tabela S7).

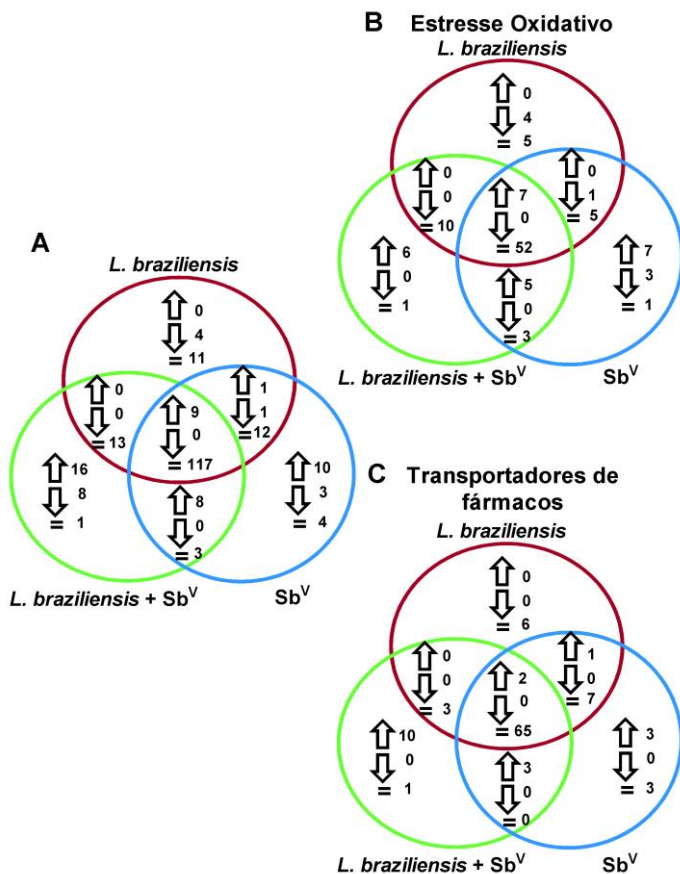


Figura 8. Gráfico de Venn apresentando o número de transcritos regulados positiva e negativamente em MDM de humanos. A= Número total de genes transcritos comuns ou diferencialmente expressos em MDM de humanos. B= Número de genes transcritos da via de estresse oxidativo. C= Número de genes transcritos da via de transportadores de fármacos. Seta para cima indica genes regulados positivamente; seta para baixo indica genes regulados negativamente; o sinal de igual indica o número de genes transcritos que permaneceram inalterados nos MDM de humanos. MDM infectados com *Leishmania braziliensis* (círculos vermelhos), MDM de humanos tratados com Sb^V (círculos azuis) e MDM de humanos infectados e tratados com Sb^V (círculos verdes).

Destaca-se igualmente neste grupo de macrófagos infectados e tratados, que 22 dos 33 genes exibiram valores de regulação positiva aumentados preferencialmente neste grupo sendo que 45,45% (10/22) deles pertencem a via de estresse oxidativo e 54,54% (12/22) ao transporte de fármacos (Tabela S6 e Tabela S7).

Os resultados indicam que a infecção por *L. braziliensis* conjuntamente com o tratamento com Sb^V modula significativamente a expressão de genes no hospedeiro, principalmente aqueles envolvidos na via de biossíntese da glutathione, defesa antioxidante e no transporte de fármacos, que putativamente podem estar envolvidos nos mecanismos de detoxificação de Sb^V (Tabela 3).

Efeito na modulação da expressão gênica no grupo de MDM de humanos tratados com Glucantime e no grupo de MDM de humanos infectados com *L. braziliensis*.

As análises de agrupamento dos genes avaliados das vias de estresse oxidativo e transportadores de fármacos em MDM de humanos, também permitiram determinar que o 16,7% (28/168) dos genes apresentaram uma regulação positiva no grupo de MDM tratados com o Sb^V (Figura 8A, Tabela S6 e S7). Dos 28 genes com regulação positiva, 10 genes apresentaram modulação positiva exclusivamente neste grupo, 70% (7/10) dos genes pertencem a via de estresse oxidativo e 30% (3/10) pertencem a via de transportadores de fármacos (Figura 8B, 8C). Interessantemente o gene *gclm* (*Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit*) apresentou o mais alto nível de expressão diferencial neste grupo, com um valor de 9,73 vezes (Tabela 3). Por sua vez, no grupo MDM infectados com *L. braziliensis*, dos 10 genes identificados regulados positivamente, nenhum deles foi modulado exclusivamente neste grupo (Figura 8A). Porém, os genes *abc5* e *abcd4*, pertencentes a via de transportadores de fármacos da família ABC, apresentaram os maiores valores de regulação positiva, com valores de 17,06 e 19,75 vezes, respectivamente (Tabela S7).

Tabela 3. Modulação dos genes envolvidos na biossíntese da Glutationa, defesa antioxidante e no transporte de fármacos em macrófagos derivados de monócitos humanos (MDM) infectados com *L. braziliensis*, tratados com Glucantime® (Sb^v) e infectados e tratados.

Seqüência referência	Abreviatura	Descrição	Regulação dos níveis de expressão gênica					
			<i>L. braziliensis</i>	Valor p	Sb ^v	Valor p	<i>L. braziliensis</i> e Sb ^v	Valor p
NM_000852	<i>gstp1</i>	Glutathione S-transferase pi 1	3,46	0,46	8,70	< 0,001	15,98	< 0,001
NM_002061	<i>gclm</i>	Glutamato-cisteína Ligase, subunidade modificadora	2,30	0,26	9,74	< 0,001	2,08	0,18
NM_000637	<i>gsr</i>	Glutathione reductase	1,63	0,57	5,54	< 0,05	6,31	< 0,01
NM_000178	<i>gss</i>	Glutathione sintetase	1,44	0,55	2,99	0,03	3,38	0,32
NM_001752	<i>cat</i>	Catalase	3,36	0,20	8,10	< 0,001	5,03	0,28
NM_002083	<i>gpx2</i>	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	3,23	0,22	3,06	0,22	5,58	< 0,05
NM_003102	<i>sod3</i>	Superóxido dismutase 3, extracelular	-5,62	< 0,001	-1,40	0,87	-2,58	0,59
NM_003329	<i>trx</i>	Tioredoxina	-1,23	0,49	3,66	< 0,001	6,63	< 0,01
NM_178559	<i>abcb5</i>	ATP binding cassette, subfamília B (MDR/TAP), membro 5. Transporte de íons pequenos, açúcares e moléculas orgânicas complexas	17,06	< 0,001	8,85	< 0,001	13,90	< 0,001
NM_005689	<i>abcb6</i>	ATP binding cassette, subfamília B (MDR/TAP), membro 6. captação na mitocôndria. Desempenha um papel crucial na síntese do grupo heme	3,39	0,48	4,80	0,14	10,12	< 0,001

Continuação Tabela 3

NM_003742	ATP binding cassette, subfamília B (MDR/TAP), membro 11, bomba biliar de efluxo de sal	1,83	0,90	9,58	<0,001	5,25	0,25
NM_003057	Carreador de solutos família 22 (transportador de cátions orgânico), membro 1. Detoxificação de xenobióticos e quimioterápicos	2,56	0,10	1,57	0,17	4,60	0,17

^a Modulação da expressão de genes foi avaliada depois de 3 dias de incubação com 32 µg/mL de Sb^v, usando o sistema de PCR "RT² Human Drug Transporters and Oxidative Stress PCR expression array analysis" da QIAGEN. Os dados são representados como a média da expressão relativa de cinco doadores sadios. As diferenças foram analisadas com relação ao grupo controle usando o teste t de Student e os valores p<0,05 encontram-se destacados em negrito.

Regulação negativa na expressão gênica mediada pelo tratamento com Glucantime e a infecção com *L. braziliensis*.

Igualmente as análises de expressão gênica mostraram que o 2,4 % (4/168) dos genes estavam regulados negativamente no grupo de MDM de humanos tratados com Sb^V (Figura 8B). Neste grupo o maior valor de regulação negativa foi observado no gene *txnrd1* (*Thioredoxin reductase 1*), com um valor de -11,09 vezes (Tabela S6). No grupo de MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* o 3,0 % (5/168) dos genes estavam regulados negativamente e o gene *sod3* (*Superoxide dismutase 3, extracelular*) apresentou o maior valor de regulação negativa, com um valor de -5.62 vezes (Tabela 3). Por outro lado, não observamos genes com regulação negativa no grupo de MDM de humanos infectados e tratados com Sb^V (Tabela S6 e S7).

Validação da modulação gênica observada em MDM de humanos infectados com *Leishmania* e tratados com Sb^V.

A especificidade nos perfis de expressão gênica observada em MDM humanos em resposta a infecção com *Leishmania* e o tratamento com Glucantime foi confirmada ao comparar os níveis de expressão gênica obtidos em macrófagos THP-1 humanos infectados com o clone de *T. cruzi* CL Brener (Fenótipo sensível ao Benzonidazol) e a cepa Colombiana (Fenótipo resistente ao Benzonidazol). As análises de agrupamento segundo a espécie de parasito e o tratamento usado mostraram que a modulação da expressão gênica observada nos genes da via de biossíntese de glutathione está especificamente modulada como resposta a infecção com *Leishmania* e o tratamento com Glucantime (Figura 9).

Figura 9. Continuação. Gráfico de Venn apresentando os transcritos regulados positiva ou negativamente em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime (Verde), macrófagos THP1 infectados com *T. cruzi* clone CLBrener e tratados com Benzonidazol (Amarelo) ou em macrófagos THP1 infectados com *T. cruzi* cepa Colombiana e tratados com BZ (Roxo). A= Número de genes transcritos da via de estresse oxidativo. B= Número de genes transcritos da via de transportadores de fármacos. Seta para cima indica genes regulados positivamente; seta para baixo indica genes regulados negativamente; o sinal de igual indica o número de genes transcritos que permaneceram inalterados nos macrófagos humanos segundo a espécie de parasito e o tipo de fármaco usado. Genes regulados positivamente estão apresentados em caixas. Genes relevantes em cada um dos grupos estão destacados em vermelho. A obtenção das amostras de macrófagos THP-1 foram obtidas segundo descrito no item material suplementar 1 pag. 146. O número de transcritos regulados nos macrófagos THP-1 infectados com o clone/cepa de *T. cruzi* e tratados com Benzonidazol correspondem a média de três experimentos independentes.

Análises da expressão proteica validam os níveis de expressão de genes com regulação positiva da defesa antioxidante e do transporte de fármacos em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime.

Tendo em conta a evidencia mencionada anteriormente da modulação na expressão gênica em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V, é particularmente interessante o aumento observado nos níveis de expressão de *gstp1*, *gclm*, *gsr*, *gss*, *cat*, *gpx2*, *sod3*, *trx*, *abcb5*, *abcb6*, *abcb11/bsep* e *slc22a1/oct1*. Para confirmar esses achados foram realizadas análises de Western blot usando extratos proteicos totais.

Os resultados mostraram que as proteínas da via de biossíntese de glutationa também foram as que apresentaram os níveis de expressão proteicos significativamente mais altos ($p < 0,05$) em MDM de humanos infectados e tratados quando comparados com o grupo controle. Os resultados dos ensaios de Western blot mostraram expressão aumentada nas proteínas GSTP1, GCLM, GSR e GSS com valores de expressão de 2,44, 1,98, 1,97 e 2,08 vezes maior ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle, respectivamente (Figura 10).

Nas proteínas envolvidas na defesa antioxidante avaliadas por Western blot os resultados mostraram que houve um aumento igualmente significativo nas proteínas SOD3 e TRX nos MDM de humanos infectados e tratados quando comparados com o grupo controle, com valores de expressão de 1,58 ($p < 0,05$) e 1,95 ($p < 0,01$) vezes maior em relação ao grupo controle, respectivamente (Figura 11). Por sua vez, não foram detectados mudanças significativas na expressão das proteínas CAT e GPX1/2 (Figura 11).

Por sua vez, nas proteínas de transporte de fármacos, observou-se um aumento de expressão proteica de 1,89 vezes ($p < 0,001$) no transportador ABCB5 e de 1,69 ($p < 0,01$) no transportador ABCB11 no grupo de MDM de humanos infectados e tratados com Sb^V quando comparado com o grupo controle (Figura 12).

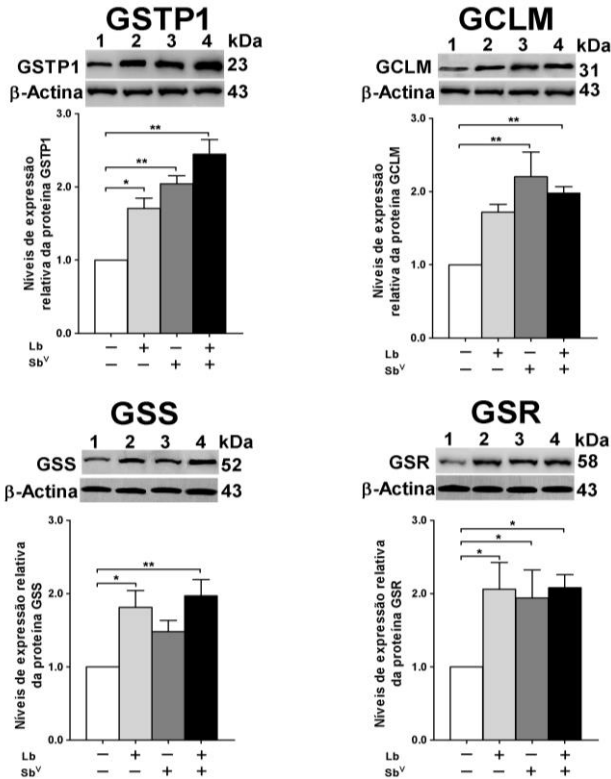


Figura 10. Expressão de proteínas GSTP1, GCLM, GSS e GSR em MDM de humanos. *Western blot* e análise densitométrica dos níveis de expressão das proteínas de extratos proteicos solúveis obtidos dos grupos de MDM de humanos. não infectados/não tratados como grupo controle (Canaleta 1), infectados com *L. braziliensis* (Canaleta 2), tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^{V} (Canaleta 3) e de MDM humanos infectados e tratados com Sb^{V} (Canaleta 4). Equivalência de carga de proteína foi controlada por imunodeteção da β -Actina. Os resultados representam a média de cinco voluntários sadios em duplicata + EP. Diferenças significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA-1 via), seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. A massa molecular (em kDa) das proteínas estão à direita de cada gel. Lb= *L. braziliensis*.

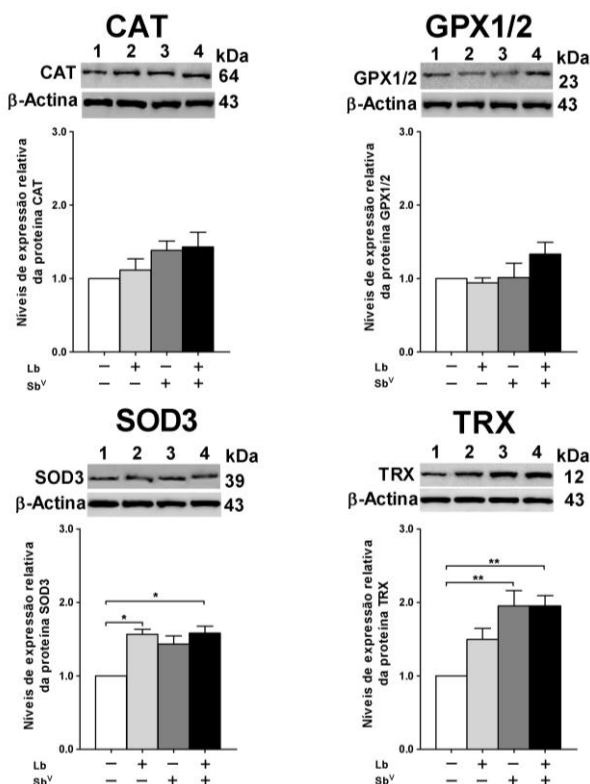


Figura 11. Expressão de proteínas CAT, GPX1/2, SOD3 e TRX em MDM de humanos. Western blot e análise densitométrica dos níveis de expressão das proteínas de extratos proteicos solúveis obtidos dos grupos de MDM humanos não infectados/não tratados como grupo controle (Canaleta 1), infectados com *L. braziliensis* (Canaleta 2), tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^{V} (Canaleta 3) e de MDM humanos infectados e tratados com Sb^{V} (Canaleta 4). Equivalência de carga de proteína foi controlada por imunodeteccção da β -Actina. Os resultados representam a média de cinco voluntários sadios em duplicata + EP. Diferenças significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA-1 via), seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. A massa molecular (em kDa) das proteínas estão à direita de cada gel. Lb= *L. braziliensis*.

Efeito na modulação da expressão proteica no grupo de MDM humanos tratados com Glucantime e no grupo de MDM de humanos infectados com *L. braziliensis*.

As análises dos níveis de expressão proteica relativa das 12 proteínas mencionadas anteriormente também permitiram determinar que GSTP1, GCLM, GSR, TRX e ABCB5 apresentaram um aumento significativo nos níveis de expressão no grupo de MDM tratados com o Sb^V. Interessantemente dentre estas proteína a GCLM apresentou o maior nível de expressão proteica, com valores de 2,2 vezes e a proteína ABCB5 o menor, com valor de 1,86 vezes (Figura 10 e 12). No grupo de MDM infectados com *L. braziliensis*, as proteínas identificadas com aumento significativo ($p < 0,05$ e $p < 0,01$ segundo apresentado na figura) nos níveis de expressão proteica foram GSTP1, com valor de expressão de 1,7, GSS, com valor de 1,82, GSR com 2,06, SOD3 com valor de 1,56 e ABCB5 com valor de 1,67 (Figura 10, 11 e 12). Porém, as proteínas CAT, GXP1/2, ABCB6 e SLC22A1 não apresentaram variação significativa nos seus níveis de expressão proteica em nenhum dos grupos em estudo (Figura 11 e 12).

Correlação dos níveis de expressão gênica com a expressão proteica em MDM de humanos.

Buscou-se correlacionar as mudanças encontradas na expressão gênica com os níveis de expressão proteica de 12 proteínas, oito das quais envolvidas na defesa antioxidante e quatro no transporte de fármacos em macrófagos humanos. Foi observada uma correlação positiva para seis marcadores GSTP1 ($r = 0,55$, $p = 0,006$), GCLM ($r = 0,50$, $p = 0,01$), GSS ($r = 0,43$, $p = 0,03$), GSR ($r = 0,63$, $p = 0,001$), TRX ($r = 0,74$, $p = 0,0001$) e ABCB5 ($r = 0,59$, $p = 0,003$). No caso da SOD3 houve uma correlação negativa ($r = -0,39$, $p = 0,04$). Para as demais proteínas não houve correlação (Figura 13).

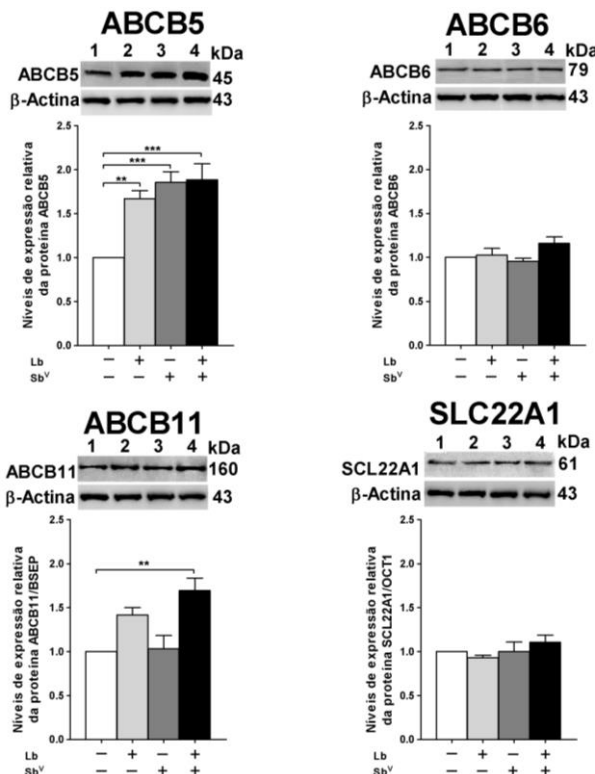


Figura 12. Expressão de proteínas transportadoras de fármacos ABCB5, ABCB6, ABCB11/BSEP e SLC22A1/OCT1 em MDM de humanos. *Western blot* e análise densitométrica dos níveis de expressão das proteínas de extratos proteicos solúveis obtidos dos grupos de MDM humanos não infectados/não tratados como grupo controle (Canaleta 1), infectados com *L. braziliensis* (Canaleta 2), tratados com 32 µg/mL de Sb^V (Canaleta 3) e de MDM de humanos infectados e tratados com Sb^V (Canaleta 4). Equivalência de carga de proteína foi controlada por imunodeteção da β-Actina. Os resultados representam a média de cinco voluntários sadios em duplicata + EP. Diferenças significativas foram determinadas utilizando-se análise de variância de uma via (ANOVA-1 via), seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, ** p<0,01, *** p<0,001. A massa molecular (em kDa) das proteína estão à direita de cada gel. Lb= *L. braziliensis*.

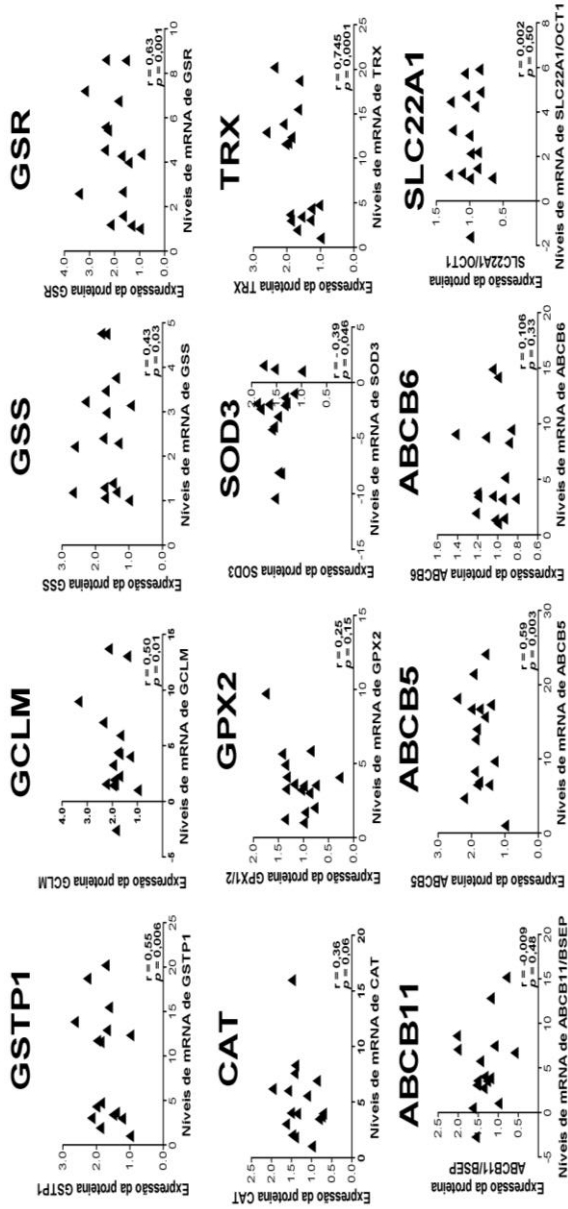


Figura 13. Correlação dos níveis de expressão do mRNA e proteínas em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis*, tratados com Glucantime e em ambas as condições, infectados e tratados com Glucantime. Os resultados representam a matriz de correlação entre os níveis de mRNA (Eixo X) e os níveis de proteína (Eixo Y) de: GSTP1, GCLM, GSS, GSR, CAT, GPX2, SOD3, TRX, BSEP, ABCB5, ABCB6 e OCT1. Os níveis de expressão de mRNA referem-se aos valores de regulação relativa obtidos das matrizes de *PCR arrays* e os valores de expressão de proteína referem-se aos valores obtidos das análises densitométricas de Western blot (n=5). Os valores r e p foram obtidos usando o teste de correlação não-paramétrico de Spearman. p<0,05.

Localização subcelular da proteína ABCB5 potencialmente envolvida no transporte de compostos antimoniais.

No sentido de investigar o possível papel do transportador ABCB5 na morte do parasito mediada pelo transporte de Sb^V , analisamos sua localização subcelular em macrófagos humanos infectados. Para tanto, utilizamos um corante HOECHST que permite tanto a detecção do DNA do núcleo do macrófago, quanto o DNA do núcleo do parasito (Figura 14 B e E, painéis superior e inferior). Na sobreposição da imagem obtida com o corante HOECHST e o marcador de endossomos e lisossomos LAMP1, observa-se que os parasitos estão localizados nos fagolisossomos (Figura 14 E). A análise em microscopia confocal de macrófagos infectados versus macrófagos infectados e tratados com Sb^V , permitiu observar diferenças na localização subcelular do transportador ABCB5 nas células infectadas e tratadas, mostrando uma localização mais associada com membranas dos fagolisossomos onde os parasitos residem (Figura 14 E, painel superior).

Seguimento da transfecção com o controle negativo de não-silenciamento *Allstars negative control* em macrófagos de humanos THP-1.

A estabilidade da transfecção foi monitorada em todos os experimentos de inibição funcional mediante microscopia de fluorescência pela observação de fluorescência a 8, 32, 80 e 104 horas após transfecção nas células transfectadas com o controle negativo de não-silenciamento siRNA *Allstars negative control* (QIAGEN), o qual contém um DSSiRNA modificado no seu extremo 3' da cadeia sentido com o corante fluorescente *Alexa Fluor 488*. Na avaliação inicial da transfecção, observa-se que a porcentagem de células fluorescentes não diminuiu significativamente, onde 96% e 91,5% de células permaneceram fluorescentes após 8 e 104 horas de transfecção, respectivamente, apresentando mais de 90% de células viáveis ao longo do tempo de experimentação (Figura 15A e 15B).

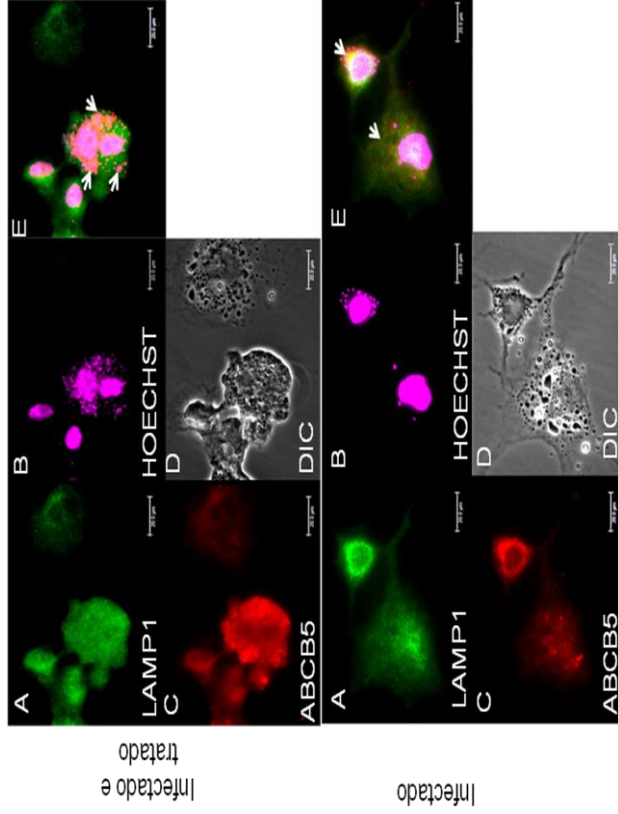


Figura 14. Imunolocalização por microscopia confocal do transportador ABCB5 em macrófagos de humanos. Painel superior representa os macrófagos de humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. Painel inferior, macrófagos de humanos infectados com *L. braziliensis* não tratados (Objetiva: 63X). A= LAMP1 marcador para endossomo e lisossomo tardio, B= O DNA de macrófagos e parasitos corados com o Hoechst (violeta), C= Localização subcelular do transportador de fármaco ABCB5, D= DIC (imagem diferencial de contraste) de macrófagos humanos, E= Sobreposição das imagens de Hoechst, LAMP1 e ABCB5. Seta branca mostra a localização subcelular de ABCB5 no fagolisossomo ou no citosol de macrófagos humanos infectados. Escala da barra = 20 μ m.

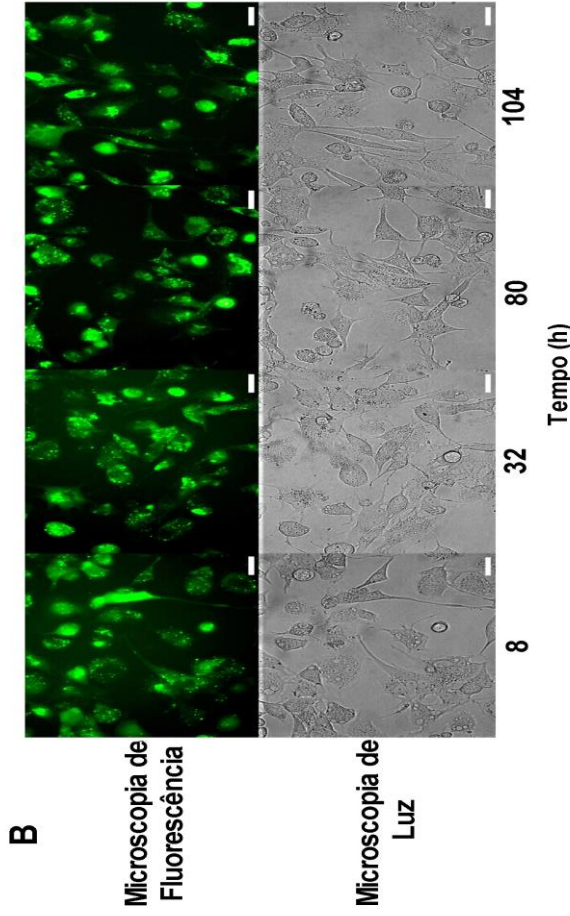
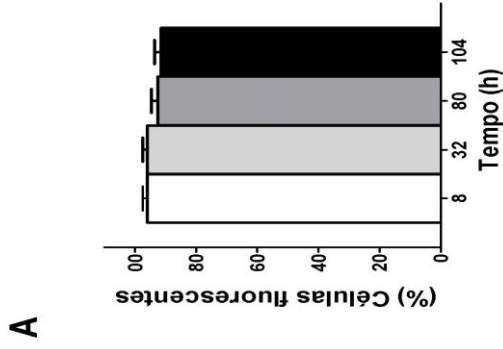


Figura 15. Células humanas THP1 diferenciadas em M Φ transfectadas com o controle negativo *AllStars siRNA AF488* (QIAGEN). A= percentagem de células fluorescentes 8, 32, 80 e 104 horas após transfecção foram determinadas por B= microscopia de fluorescência (painel superior) e a visualização da viabilidade das células por microscopia de luz (painel inferior). Escala da barra = 20 μ m, objetiva de 40X.

Efeito do silenciamento do gene humano *gstp1* na sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em MΦ humanos THP-1.

Inicialmente para investigar a eficácia de *knockdown* após transfecção com os siRNA do gene *gstp1* em MΦ THP-1, o percentual remanescente dos níveis relativos de expressão do mRNA de *gstp1* foram medidos por RT-qPCR. Os dados bruto das análises de RT-qPCR do gene *gstp1* ilustraram a manipulação bem sucedida da inibição do gene *gstp1* (amostras GSTP1^{KD}) nos MΦ humanos THP-1 infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V (Figura 16 Ai). Os valores de troca da fluorescência do sinal do repórter normalizada (ΔRn) em função do número de ciclos, revelam um aumento no valor de Ct (*threshold cycle*) de aproximadamente 5 Cts nas amostras silenciadas para o gene alvo *gstp1*^{KD}, produzindo uma diminuição na expressão do gene alvo com valores de *knockdown* entre 96% e 97% em MΦ THP-1 infectados não tratados e em MΦ infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V, respectivamente (Figura 16 Aii). Por sua vez, os valores de Ct do gene de referência *β -actina* permaneceram inalterados tanto nas amostras silenciadas para o gene alvo *gstp1*^{KD}, quanto nas amostras transfectadas com o controle negativo de não silenciamento siRNA (Controle não-sil siRNA) (Figura 16 Ai).

Os resultados das análises de expressão da proteína GSTP1 mediante ensaios de Western blot mostraram uma expressão aumentada da proteína com valores de expressão de 2,09 e 2,74 vezes maior nas amostras não silenciadas de MΦ humanos THP-1 infectados não tratados e nos MΦ humanos THP-1 infectados e tratados com Sb^V, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 16 Bi e Bii). As amostras do grupo controle correspondem a MΦ humanos THP-1 não infectados e não tratados (transfectadas com o controle negativo de não silenciamento siRNA), usadas como controle de expressão em todos os experimentos e que apresentaram um valor de expressão relativa corresponde a 1. As análises de Western blot usando extratos proteicos totais de MΦ THP-1 infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V confirmaram e validaram os achados obtidos utilizando MDM de humanos, onde observou-se aumento nos níveis de expressão proteica nestes grupos de estudo.

Interessantemente, em MΦ THP-1 infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V que foram silenciadas para o gene alvo *gstp1*, observou-se valores de expressão da proteína GSTP1 significativamente reduzidos de 0,59 e 0,52 ($p < 0,001$), condizentes com

uma porcentagem de *knockdown* de 71,8 % e 81%, respectivamente (Figura 16 Bii). Da mesma forma, os resultados de Western blot, confirmaram a manipulação bem sucedida do gene alvo *gstp1* observada mediante RT-qPCR nos MΦ THP-1 (Figura 16 Aii).

Uma vez confirmada a manipulação bem sucedida do gene *gstp1*, determinou-se o seu efeito na sobrevivência intracelular de amastigotes de *L. braziliensis* em MΦ THP-1 infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V. Os resultados de avaliação da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* mostraram uma associação direta entre a inibição do gene *gstp1* e a redução significativa ($p < 0,001$) da sobrevivência intracelular nos MΦ THP-1 silenciados para o gene alvo (amostras GSTP1^{KD}) infectados com *L. braziliensis* e tratados com uma dose de 32 µg/mL de Sb^V, onde o percentual de redução foi do 20,4% (Figura 16 Ci). Esse efeito é igualmente ilustrado na Figura 16 Cii e Figura S5A pag. 182, pela redução do número de amastigotas intracelular encontrado neste grupo, quando comparado com os MΦ THP-1 infectados e tratados e não silenciados para o gene alvo (Figura 16 Cii, S5A).

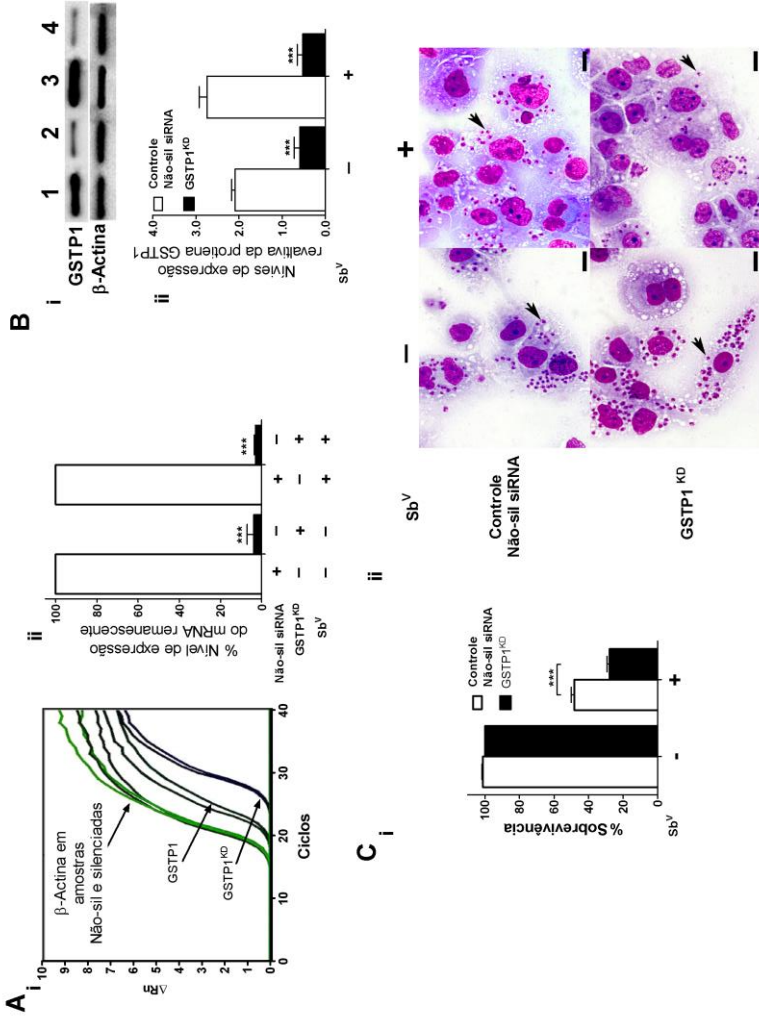


Figura 16. Continuação. Silenciamento do gene humano *gstp1* e sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1. A= Eficácia de silenciamento do gene *gstp1* foi determinada pela análise dos níveis de expressão do mRNA por PCR em tempo real. (i)= Representação das curvas de amplificação dos genes *gstp1* e β -actina mostrando o ΔRn vs os ciclos observados no grupo de MΦ THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados por 72h com Sb^V . (ii)= Percentual dos níveis de expressão do mRNA remanescentes nos grupos de MΦ THP-1 infectados, infectados e tratados (amostras de silenciamento e controle negativo não silenciado). Bi= Análises de expressão de proteínas por Western blot, a equivalência na carga de proteína foi controlada pela imunodeteção de β -ACTINA. Canaleta 1= MΦ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle negativo). Canaleta 2= MΦ com silenciamento do *gstp1*, infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados por 72h com Sb^V (32 μ g/mL). Canaleta 4= MΦ com silenciamento do *gstp1*, infectados com *L. braziliensis* e tratados por 72h com Sb^V . Bii= As análises densitométricas dos sinais apresentadas no painel Bi foram realizadas usando o programa ImageJ. Ci= Percentual de sobrevivência intracelular de amastigotas em MΦ não silenciados e silenciados, tratados por 72h com Sb^V (32 μ g/mL), MΦ infectados e não tratados foram usados como controles. Cii= Microfotografia de MΦ não silenciados e MΦ THP-1 GSTP1^{KD} contendo amastigotas (setas) submetidos ou não ao tratamento com 32 μ g/mL de Sb^V . (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 μ m). Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, *** $p < 0,001$.

O silenciamento dos genes humanos *gss*, *abcb5* e *trx* aumentaram a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1.

A avaliação da eficácia de *knockdown* após transfecção com os siRNA dos genes alvo *gss*, *abcb5* e *trx* em MΦ THP-1, medida por RT-qPCR mostrou que houve uma manipulação bem sucedida na inibição dos genes alvo em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V (Figuras 17, Figura S2 e S3 parte Aii e Aii pag. 177 e 179). A mudança da fluorescência do sinal do repórter normalizada (ΔRn) em função do número de ciclos, revelou um aumento no valor de Ct (*threshold cycle*) de aproximadamente 4-7 Ct para o gene *gss*, 6 Cts para *abcb5* e 3 vezes para o gene *trx* nas amostras silenciadas para os genes alvo, produzindo uma diminuição na expressão do mRNA com valores de *knockdown* entre 94,5% e 99,1% para o gene *gss* (Figura 17 Aii), de 98,0% para o gene *abcb5* (Figura S2 Aii), e entre 83,0% e 87,4% para o gene *trx* (Figura S3 Aii), em MΦ infectados não tratados e em MΦ infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V . Adicionalmente, no gene de referência *β -actina* os valores de Ct permaneceram inalterados tanto nas amostras silenciadas para os genes alvo *gss^{KD}*, *abcb5^{KD}* e *trx^{KD}*, quanto nas amostras transfectadas com o controle negativo de não silenciamento siRNA (Controle não-sil siRNA) (Figura 17, S2, S3 parte Ai).

Os resultados das análises de expressão das proteínas GSS, ABCB5 e TRX mostraram um aumento nos níveis de expressão, com valores de 1,66 e 2,33 vezes para a proteína GSS, de 1,38 e 1,73 para a proteína ABCB5 e de 1,64 e 2,15 vezes nas amostras não silenciadas de MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V , respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 17, S2, S3 parte Bi e Bii). As análises de Western blot em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V igualmente confirmaram e validaram os achados obtidos utilizando MDM de humanos, onde observou-se aumento nos níveis de expressão proteica também para esses marcadores nestes grupos de estudo.

Por sua vez, nas amostras *knockdown* dos genes alvo *gss^{KD}*, *abcb5^{KD}* e *trx^{KD}* em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V , ainda mostraram uma redução significativa nos valores de expressão das proteínas ($p < 0,05$). Os níveis de expressão da proteína GSS nas amostras silenciadas para o gene alvo (*GSS^{KD}*) foram de 0,66 vezes ($p < 0,05$) (Figura 17Bi e 17Bii), correspondente a 60,2% de *knockdown* da proteína em MΦ infectados e de 0,57 vezes ($p < 0,01$) (Figura 17Bi e

14Bii), correspondente a um percentual de *knockdown* de 75,6% em MΦ infectados e tratados com Sb^V. Para a proteína ABCB5, os níveis de expressão desta proteína nas amostras silenciadas para o gene alvo (ABCB5^{KD}) foram de 0,72 vezes ($p < 0,05$) (Figura S2 Bi e Bii), correspondente a 47,8% de *knockdown* da proteína em MΦ infectados e de 0,68 vezes ($p < 0,01$) (Figura S2 Bi e Bii), correspondente a um percentual de *knockdown* de 61,0% em MΦ infectados e tratados com Sb^V. Por final, na proteína TRX, os níveis de expressão nas amostras silenciadas para o gene alvo (TRX^{KD}) foram de 0,74 vezes ($p < 0,001$) (Figura S3 Bi e Bii), correspondente a 54,9% de *knockdown* da proteína em MΦ infectados e de 0,87 vezes ($p < 0,01$) (Figura S3 Bi e Bii), correspondente a 59,5% de *knockdown* em MΦ infectados e tratados com Sb^V.

Análises dos níveis de expressão proteica avaliados mediante Western blot confirmaram que a manipulação bem sucedida dos genes alvo *gss*, *abcb5* e *trx* usando RT-qPCR. Os resultados de avaliação da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V nas amostras silenciadas para os genes alvo GSS^{KD} e ABCB5^{KD}, mostraram um efeito direto da inibição dos genes alvo na redução significativa ($p < 0,001$) da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ silenciados (GSS^{KD} e ABCB5^{KD}) infectados e tratados com a dose de 32 µg/mL de Sb^V. O percentual de redução da sobrevivência quantificado foi de 17,8% em MΦ GSS^{KD} (Figura 17 Ci), e de 15,5% em MΦ ABCB5^{KD} (Figura S2 Ci). Da mesma forma, esse efeito está ilustrado nas figuras 17Cii, S2Cii e S5B, S5C, pela redução do número de amastigotas intracelulares em MΦ THP-1 GSS^{KD} e ABCB5^{KD} infectados e tratados com Sb^V, quando comparado com os MΦ infectados e tratados e não silenciados para os genes alvo (Figura 17Cii, S2Cii, S5B, S5C). Por sua vez, na resposta observada em MΦ TRX^{KD} houve uma diminuição não significativa de 5,8% na sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* após tratamento com 32 µg/mL de Sb^V (Figura S3Ci, S3Cii e S5D).

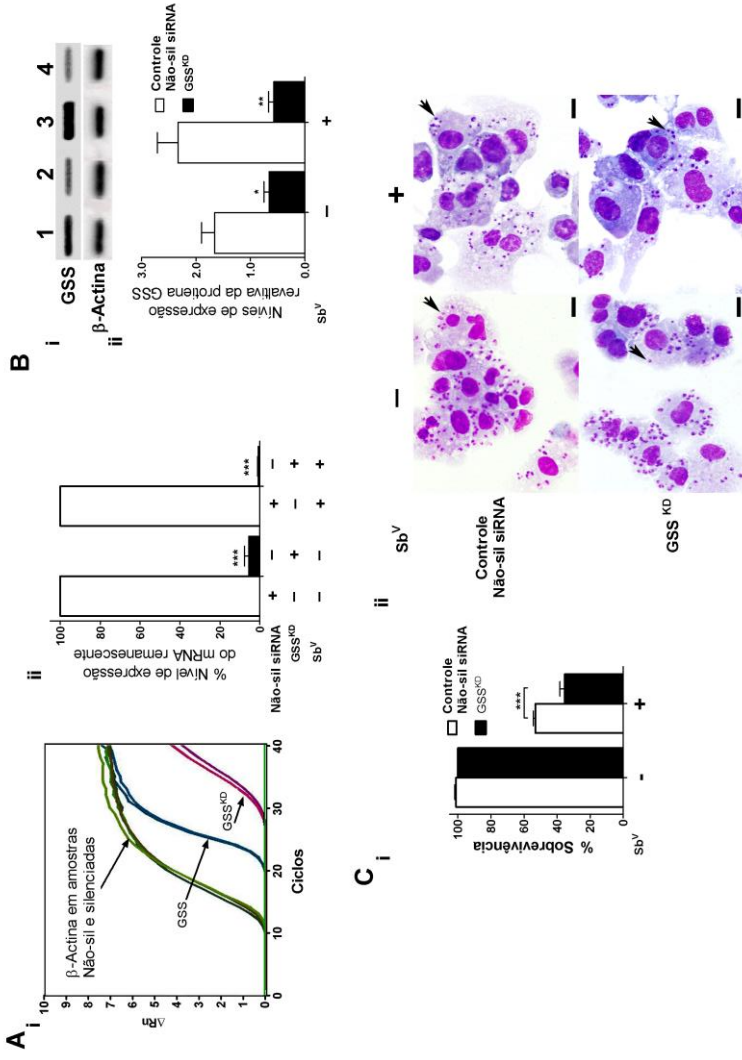


Figure 17. Continua na página seguinte.

Figura 17. Continuação. Silenciamento do gene humano *gss* e sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1. A= Eficácia de silenciamento do gene *gss* foi determinada pela análise dos níveis de expressão do mRNA por PCR em tempo real. (i)= Representação das curvas de amplificação dos genes *gss* e β -actina mostrando o ΔRn vs os ciclos observados no grupo de MΦ infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V . (ii)= Percentual dos níveis de expressão do mRNA remanescentes nos grupos de MΦ infectados, infectados e tratados (amostras de silenciamento e controle negativo não silenciado). Bi= Análises de expressão de proteínas por Western blot, a equivalência na carga de proteína foi normalizada pela imunodeteccção de β -ACTINA. Canaleta 1= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle negativo). Canaleta 2= MΦ com silenciamento do *gss*, infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μ g/mL). Canaleta 4= MΦ com silenciamento do *gss*, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V . Bii= Análises densitométricas dos sinais apresentadas no painel Bi foram realizadas usando o programa ImageJ. Ci= Percentual de sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ não silenciados e silenciados (GSS^{KD}), tratados com Sb^V (32 μ g/mL) e infectados e não tratados (controle). Cii= Microfotografia de MΦ não silenciados e MΦ GSS^{KD} contendo amastigotas (setas) submetidos ou não ao tratamento com 32 μ g/mL de Sb^V . (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 μ m). Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Validação do efeito da inibição de genes da defesa antioxidante e do transporte de fármacos na sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ THP-1 tratados com Sb^V.

O efeito potencializado da atividade leishmanicida do Sb^V observado em MΦ humanos *knockdown* para os genes *gstp1*, *gss* e *abcb5* infectados com *L. braziliensis* foi validado avaliando a sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ THP-1 *knockdown* para o gene constitutivo β -actina.

A avaliação da eficácia de *knockdown* após transfecção com os siRNA do gene β -actina foi igualmente determinada mediante RT-qPCR e análises de Western blot. Os resultados de expressão relativa remanescente do mRNA mostraram que houve uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de expressão do mRNA de β -actina, com valores de 85,33% e 88,26%, demonstrando uma manipulação bem sucedida na inibição do gene alvo em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V, respectivamente (Figura S4 A pag. 181). Uma redução de 41,9% ($p < 0,01$) e de 48,3% ($p < 0,01$) dos níveis de expressão da proteína β -actina foi confirmada nos grupos de estudo (Figura S4 Bi e Bii). Já, na avaliação da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com 32 μ g/mL de Sb^V silenciados para o gene alvo β -actina^{KD}, observou-se que não houve um efeito direto na inibição do gene alvo na sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ silenciados com um valor de sobrevivência de aproximadamente 52% nas amostras não silenciadas ou silenciadas após tratamento com Sb^V (Figura S4C, S5E).

Conjuntamente, os nossos resultados sugerem que os genes *gstp1*, *gss* e *abcb5*, putativamente podem estar envolvidos no mecanismo de detoxificação de compostos antimoniais e que sua inibição aumenta significativamente o efeito leishmanicida *in vitro* do Sb^V sobre a forma intracelular de *L. braziliensis* em MΦ humanos THP-1.

Efeito da exposição ao Sb^V tempo e concentração dependente sobre a expressão da proteína GSTP1 em MΦ THP-1 infectados com *L. braziliensis*

Para medir a atividade do Sb^V contra *Leishmania* e seu efeito na modulação da expressão gênica em MDM de humanos e em MΦ THP-1, tempos longos de incubação foram usados (72h de exposição ao Sb^V). As análises dos níveis de expressão gênica e proteica permitiram observar alterações em algumas vias de sinalização mediadas

conjuntamente pela infecção com *L. braziliensis* e o tratamento com 32 µg/mL de Sb^V nas células humanas.

Para testar se o efeito da inibição do gene *gstp1* na sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* podia ocorrer mais rapidamente e em concentrações diferentes de Sb^V avaliamos a eficácia de *knockdown* após transfecção com os siRNA do gene alvo *gstp1* em MΦ após diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 horas) com duas concentrações do Sb^V (8 e 32 µg/mL). As análises por RT-qPCR mostraram que houve uma manipulação bem sucedida na inibição do gene alvo resultando em redução significativa do percentual remanescente de mRNA do *gstp1* durante o tempo de seguimento estabelecido (Figuras 18 A).

O percentual de *knockdown* obtido após 24 h de exposição ao Sb^V foi de 96,9% em MΦ GSTP1^{KD} infectados não tratados, de 87,5% em MΦ GSTP1^{KD} tratados com 8 µg/mL de Sb^V e de 97,1% em MΦ GSTP1^{KD} tratados com 32 µg/mL de Sb^V. Após 48 horas de exposição ao Sb^V os valores foram do 96,1% em MΦ GSTP1^{KD} infectados não tratados, de 96,7% em MΦ GSTP1^{KD} tratados com 8 µg/mL de Sb^V, e de 95,5 % em MΦ GSTP1^{KD} tratados com 32 µg/mL de Sb^V. Por final, no tempo de 72h após exposição ao Sb^V os valores foram de 93,6% em MΦ GSTP1^{KD} infectados não tratados, de 94.1% nos MΦ GSTP1^{KD} tratados com 8 µg/mL de Sb^V, e de 96.2% nos MΦ GSTP1^{KD} tratados com 32 µg/mL de Sb^V (Figura 18 A). O percentual remanescente em cada um dos grupos (MΦ infectados não tratados, infectados e tratados com 8 µg/mL e infectados e tratados com 32 µg/mL) foi estimado pela comparação dos valores obtidos nas amostras silenciadas para o gene alvo, com os valores obtidos nas amostras não silenciadas, representadas como 100% de expressão remanescente. No grupo de MΦ infectados não tratados, os tempos de 24, 48 e 72 horas após tratamento com Sb^V, correspondem a 48, 72 e 96h após infecção com *L. braziliensis*.

Os resultados das análises dos níveis de expressão da proteína GSTP1 em função do tempo de exposição ao Sb^V de 24, 48 e 72 horas pós-tratamento, mostraram um aumento significativo dos níveis de expressão da proteína ao longo do tempo, alcançando os níveis de expressão mais altos 24h após exposição ao Sb^V, com valores entre 3,21 e 3,13 vezes nas amostras não silenciadas de MΦ infectados e tratados com 8 ou 32 µg/mL de Sb^V, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 18, Bi e Bii). No grupo de MΦ não silenciados infectados e tratados com 8 ou 32 µg/mL de Sb^V, destaca-se que o nível de expressão da proteína GSTP1 permaneceu igualmente aumentado

significativamente após 48 e 72h de exposição ao Sb^V , com valores de expressão de aproximadamente 2,72 vezes nas doses de 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V no tempo de 48 horas. No tempo 72 horas após o tratamento ou aumento foi de 2,1 vezes na dose de 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V e de 2,5 vezes na dose de 32 $\mu\text{g/mL}$. A comparação dos níveis de expressão em M Φ infectados e tratados com 8 ou 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V , com M Φ THP-1 infectados e não tratados (transfectadas com o controle negativo de não silenciamento siRNA), mostrou um aumento dose dependente de exposição ao Sb^V de 1,7 e 1,5 vezes em M Φ infectados e tratados com 8 ou 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V após 24 e 48 h de exposição ao Sb^V , respectivamente. No tempo 72 h de exposição ao Sb^V , o aumento foi de 1,3 vezes ($p<0,05$) só foi evidenciado em M Φ infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V . Os níveis de expressão da proteína GSTP1 em M Φ não silenciados infectados e não tratados, não apresentou uma modulação tempo dependente, mas os valores de expressão foram de 1,8 vezes maior ($p<0,001$) quando comparados ao grupo controle (Figura 18, Bi e Bii). Esses resultados sugerem uma modulação da expressão da proteína GSTP1 tempo e dose dependentes em resposta ao tratamento com Sb^V nos grupos estudados.

Por sua vez, nas amostras *knockdown* do gene alvo *gstp1*^{KD} em M Φ infectados não tratados e infectados e tratados com 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V , mostraram uma redução significativa nos valores de expressão da proteína ($p<0,001$) ao longo do tempo. Os níveis de expressão da proteína GSTP1 nas amostras silenciadas para o gene alvo (GSTP1^{KD}) foram de 0,44, 0,44 e 0,34 vezes ($p<0,001$) (Figura 18Bi e 18Bii), correspondente a 76,6% de *knockdown* da proteína em M Φ infectados não tratados, 86,3% em M Φ infectados e tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V e um 89,1% de *knockdown* da proteína em M Φ THP-1 infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de exposição ao Sb^V . No tempo de 48h após tratamento com Sb^V , observou-se valores de 0,51, 0,68 e 0,56 vezes ($p<0,001$), correspondente a um percentual de *knockdown* de 73,0% em M Φ infectados não tratados, de 75% em M Φ infectados e tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V e de 79,4% em M Φ infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V . No tempo final de 72h após tratamento, os valores foram de 0,54, 0,49 e 0,52 vezes ($p<0,001$), correspondente a um percentual de *knockdown* de 70,5% em M Φ infectados não tratados, de 76,6% em M Φ infectados e tratados com 8 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V e de 79,2 % em M Φ infectados e tratados com 32 $\mu\text{g/mL}$ de Sb^V (Figura 18Bi e 18Bii).

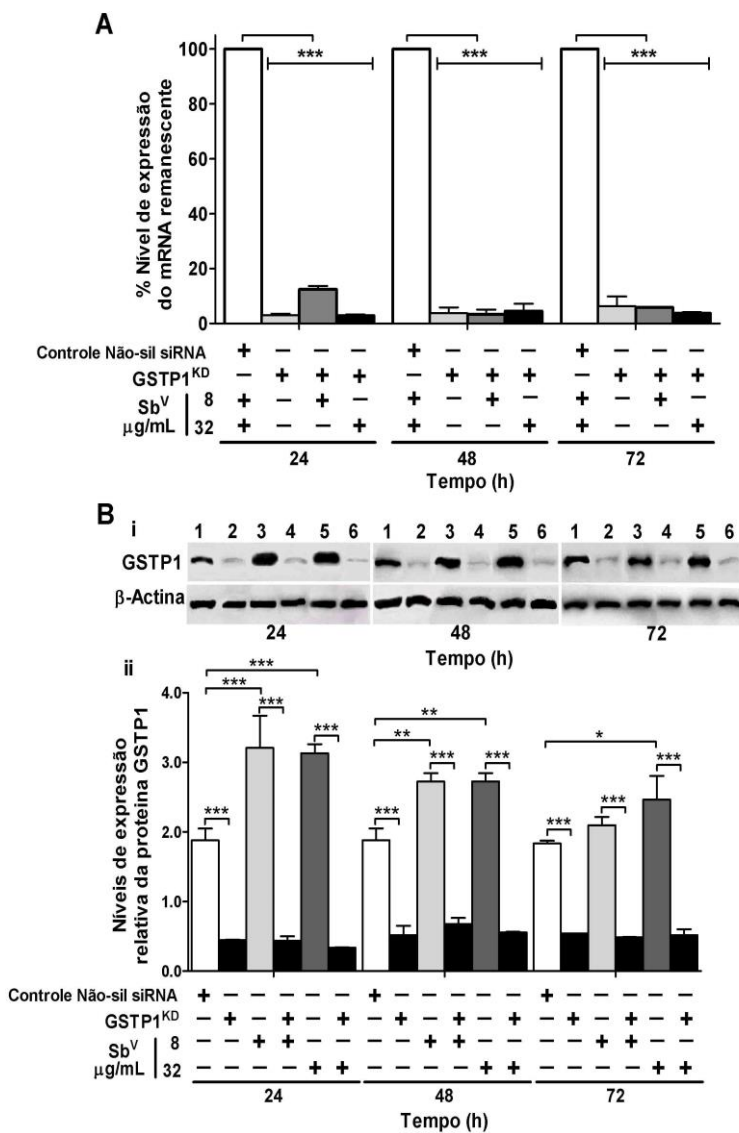


Figura 18. Continua na página seguinte.

Figura 8. Continuação. Efeito do tempo e da concentração de Sb^V sobre a expressão da proteína GSTP1 em MΦ THP-1 infectados com *L. braziliensis*. A= Eficácia do silenciamento do gene *gstp1* no tempo (equivalência em tempo igual a 24, 48 e 72 horas após exposição ao Sb^V) foi determinada mediante análise do nível de expressão do mRNA por PCR em tempo real. Os dados são apresentados como a porcentagem dos níveis de expressão do mRNA remanescentes de *gstp1* em comparação com os controles negativos não silenciados (Controle Não-sil siRNA). Bi= Análises da expressão das proteínas através de Western blot em 24, 48 e 72 horas após a exposição ao tratamento com Sb^V, a equivalência na carga de proteína foi controlada por imunodeteção de β-actina (gene e proteína de referência). Canaleta 1= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle de não-silenciamento). Canaleta 2= MΦ com silenciamento de *gstp1* (GSTP1^{KD}), infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (8 μg/mL). Canaleta 4= MΦ com silenciamento de *gstp1* (GSTP1^{KD}), infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (8 μg/mL). Canaleta 5= MΦ não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μg/mL). Canaleta 6= MΦ com silenciamento do *gstp1* (GSTP1^{KD}), infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μg/mL). Bii= As análises densitométricas dos sinais apresentadas no painel Bi foram realizadas usando o programa ImageJ. Os resultados representam a média de 2 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias, seguida do teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001.

O silenciamento do gene humano *gstp1* aumenta a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V de forma tempo e doses dependente.

Uma vez confirmada a manipulação bem sucedida no silenciamento do gene *gstp1* no transcurso do tempo de exposição ao Sb^V, determinamos seu efeito na sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ infectados não tratados e infectados e tratados com Sb^V em diferentes condições. Os resultados de sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* ao Sb^V mostraram uma associação direta entre a inibição do gene *gstp1* e a redução da sobrevivência intracelular em MΦ silenciados para o gene alvo (amostras GSTP1^{KD}) infectados com *L. braziliensis* e tratados com 8 µg/mL de Sb^V. O percentual de redução foi de 7,83% (p<0,01), 14,6% (p<0,01) 14,3% (p<0,001) para os tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 19Bi).

Na dose de 32 µg/mL de Sb^V a porcentagem de redução foi de 18,3% (p<0,001), 23,5% (p<0,001) e 20,1% (p<0,001), para os tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (Figura 19Bi). A redução da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em MΦ silenciados para o gene alvo foram também comprovados pela redução do número de amastigotas intracelulares nestes grupos quando comparados com MΦ não silenciados infectados e tratados nas doses de 8 e 32 µg/mL de Sb^V, respectivamente (Figura 19Bii e 19Cii). No grupo controle sem tratamento, não houve redução da sobrevivência intracelular e nem do número de amastigotas até o tempo de 72h de infecção (Figura 19Ai e 19Aii).

Os nossos resultados sugerem um possível envolvimento do gene *gstp1* no mecanismo de detoxificação do Sb^V em MΦ THP-1 evidenciado pelo aumento da sensibilidade de *L. braziliensis* ao Sb^V em dose menor quando ocorreu inibição seletiva do gene.

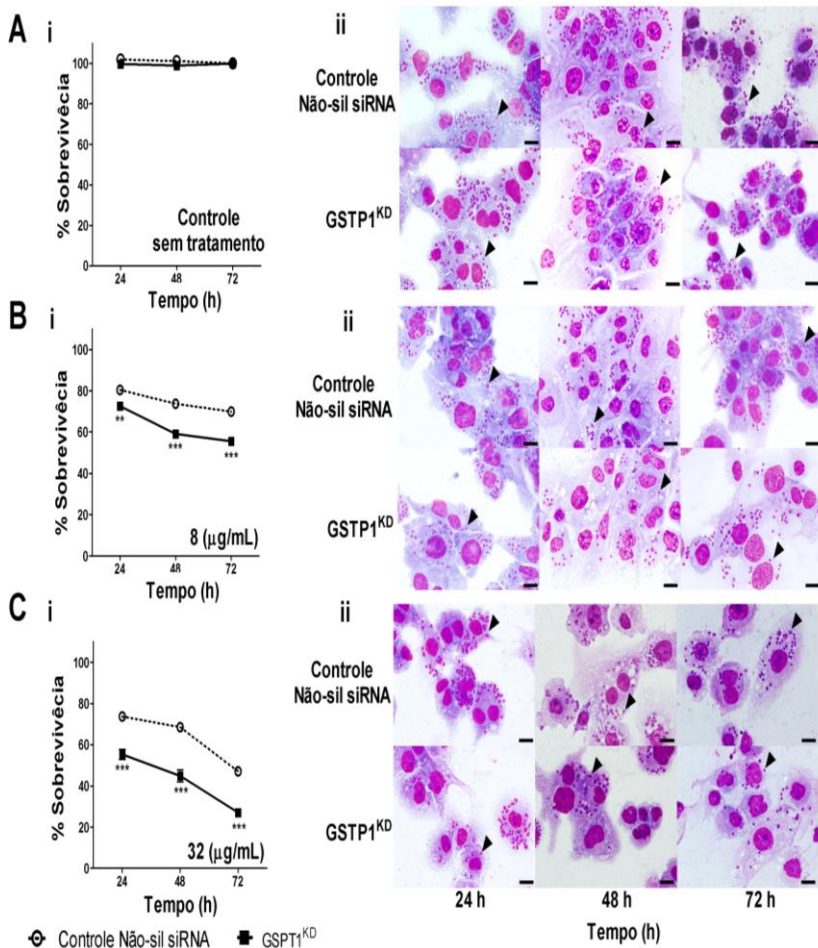


Figure 19. Efeito do tempo de tratamento e da concentração de Sb^V na sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ THP1 silenciados e não silenciados para o gene humano *gstp1*. Continua na página seguinte.

Figura 19. Continuação. Ai= Percentual de sobrevivência intracelular dos parasitos em MΦ não silenciados (controle negativo) e em MΦ GSTP1^{KD} ao longo do tempo sem tratamento com Sb^V (os pontos no tempo são equivalentes ao período de exposição ao Sb^V 24-72h). Aii= Microfotografia de MΦ sem tratamento, não silenciados e MΦ GSTP1^{KD} contendo amastigotas (setas). Bi= Percentual de sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ não silenciados e GSTP1^{KD}, durante um período de tempo de 72 horas de tratamento com Sb^V (8 µg/mL). Bii= Microfotografia de MΦ não silenciados e GSTP1^{KD} contendo amastigotas (setas), durante um período de tempo de 72 horas de tratamento com Sb^V (8 µg/mL) Ci= Percentual de sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* infectando MΦ não silenciados e GSTP1^{KD} durante 72h de tratamento com Sb^V (32 µg/mL). Cii= Microfotografia de MΦ não silenciados e GSTP1^{KD} contendo amastigotas (setas), durante um período de tempo de 72 horas de tratamento com Sb^V (32 µg/mL). (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 µm). MΦ infectados e não tratados foram usados como controle para estimar o percentual da sobrevivência dos parasitos e MΦ tratados. Os resultados representam a média de 2 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, ** p<0,01, *** p<0,001.

Restabelecimento dos padrões de sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* ao Sb^V pela inibição seletiva do gene humano *gstp1* em MΦ humanos THP-1.

Usando duas cepas de *L. braziliensis* superexpressando as proteínas cistationina β-sintase (pTEXCβS) e cisteína sintase (pTEXCS), geradas em nosso laboratório e que apresentavam fenótipos de perda de sensibilidade à compostos antimoniais (Ibeth Romero do Laboratório de Protozoologia, UFSC comunicação pessoal), avaliamos se a redução significativa da sobrevivência intracelular de amastigotes de *L. braziliensis* selvagem após exposição ao Sb^V, mediada pela inibição do *gstp1* em MΦ era igualmente observada em cepas com fenótipo de perda de sensibilidade aos antimoniais.

Os resultados de sensibilidade ao Sb^V das cepas de *L. braziliensis* mutantes (pTEXCβS e pTEXCS) mostraram um aumento significativo da sobrevivência intracelular, com valores do 37,4% para a cepa pTEXCS e de 12,0% para a cepa pTEXCβS de *L. braziliensis*, quando comparados com a cepa selvagem após exposição ao Sb^V (Figura 20A). O aumento na sobrevivência intracelular mostrou um número significativamente maior de amastigotas por macrófago após a exposição ao Sb^V (Figura 20B). Estes resultados confirmaram que as cepas de *L. braziliensis* mutantes para pTEXCβS e pTEXCS, apresentam fenótipo de perda de sensibilidade intracelular ao Sb^V em MΦ THP-1. Por sua vez, os resultados de sensibilidade intracelular em MΦ silenciados para o gene alvo *gstp1* infectados com a cepa selvagem ou com as cepas mutantes para pTEXCS e pTEXCβS de *L. braziliensis*, mostraram uma redução de 37,7% e 5,5%, respectivamente, contra uma redução de 16,2% para a cepa selvagem (Figura 20A e 20B). O percentual de sobrevivência intracelular das cepas de *L. braziliensis* em MΦ tratados com 32 µg/mL foi calculado em relação aos resultados obtidos em MΦ infectados com as diferentes cepas de *L. braziliensis* não tratados (grupo controle), cujo valor de sobrevivência equivale ao 100%.

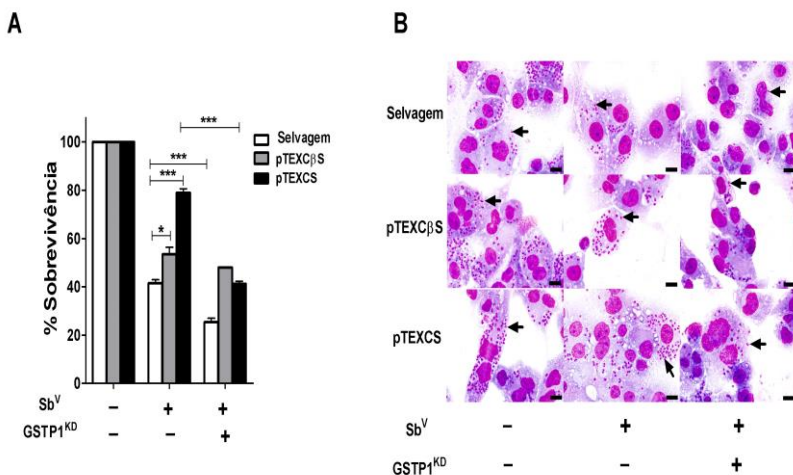


Figura 20. Efeito do silenciamento do gene *gstp1* e do tratamento com Sb^V em MΦ THP-1 sobre a viabilidade de *L. braziliensis* super-expressando CS e CβS. A= Sobrevivência intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* infectando MΦ não silenciados e MΦ GSTP1^{KD}, tratados com Sb^V (32 μg/mL). B= Microfotografia de MΦ não silenciados e MΦ GSTP1^{KD} infectados com a cepa selvagem e as cepas mutantes e tratados com 32 μg/mL de Sb^V (amastigotas estão indicados pela seta). (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 μm). Os resultados representam a média de 2 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, * p<0,05, *** p<0,001.

6 DISCUSSÃO.

O rápido avanço científico no conhecimento da biologia de parasitos e seus vetores advindo do sequenciamento do genoma de vários patógenos de importância na saúde, ainda não se traduziu em programas mais abrangentes de interrupção da transmissão das parasitoses e/ou no desenvolvimento de vacinas ou de novos agentes terapêuticos mais efetivos e acessíveis. As Leishmanioses fazem parte de um grupo de 18 doenças consideradas negligenciadas pela Organização Mundial da Saúde (*Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases – Summary*, 2011) e seu controle depende ainda majoritariamente da utilização de compostos antimoniais pentavalentes em uso há mais de 60 anos (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Estes fármacos continuam sendo os medicamentos de primeira linha para o seu tratamento, demonstrando que a busca de novos agentes quimioterápicos mais eficientes não vem recebendo a atenção e os financiamentos necessários. Além disso, a existência de cepas de *Leishmania* naturalmente resistentes aos medicamentos atualmente utilizados na clínica, associado ao tratamento prolongado agrava ainda mais este cenário (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006). É importante salientar também que não existe ainda nenhuma vacina eficiente para Leishmaniose para uso em humanos (KEDZIERSKI, 2010).

O recente desenvolvimento de tecnologias sensíveis e de maior poder resolutivo como a tecnologia de *Arrays*, tem permitido analisar perfis de expressão gênica e estudar simultaneamente diferentes processos biológicos incluindo vias de transdução de sinais e a identificação de genes ou redes de genes relacionados as doenças (BURCZYNSKI et al., 2005; ACHIRON e GUREVICH, 2006). Em nosso estudo utilizamos diferentes metodologias para a identificação e quantificação de genes envolvidos na defesa antioxidante e no transporte de fármacos que possam ser modulados em macrófagos humanos como resposta a infecção com *L. braziliensis* e o tratamento com Glucantime.

Inicialmente, como prova de conceito, utilizamos o modelo amastigota-macrófago-fármaco na linhagem celular THP-1 para avaliar a sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* ao Glucantime. Em nosso estudo, o valor da CI_{50} com intervalo de confiança (IC) de 95%, foi $32 \pm (25,7-39,8)$ $\mu\text{g/mL}$ o qual está na mesma ordem de magnitude (CI_{50} variando de 21,1 e 45,8 $\mu\text{g/mL}$), reportada em outros estudos com amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em macrófagos (MORAIS-

TEIXEIRA et al., 2008; ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010; De MORAIS-TEIXEIRA et al., 2014).

Nosso modelo experimental para estudos de interação parasito-macrófago-fármaco foi validado para MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com 32 µg/mL de Glucantime. Avaliou-se comparativamente a percentagem de infecção, a sobrevivência intracelular e a redução do índice parasitário nestes macrófagos. Quando avaliamos a sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* ao Sb^V determinada pela percentagem de infecção, apesar de observarmos uma diminuição da percentagem de infecção no grupo de MDM infectados e tratados não observamos diferenças significativas quando comparado com MDM infectados e não tratados. No entanto, quando utilizamos o número de parasitos por célula para estimar a sensibilidade intracelular de *L. braziliensis* em MDM de humanos, os resultados mostraram diferenças significativas frente ao grupo controle. A dificuldade em avaliar a susceptibilidade *in vitro* de *Leishmania* spp. mediante a estimativa da infecção é atribuída a vulnerabilidade deste parâmetro à superestimação de baixa sensibilidade (tolerância à droga ou resistência), enquanto que ao utilizar parâmetros que avaliam quantitativamente a carga parasitária, se obtém maior sensibilidade e especificidade da avaliação da sensibilidade parasitaria aos compostos antimoniais (FERNÁNDEZ et al., 2012). Da mesma forma, o efeito da droga sobre a multiplicação intracelular de amastigotas e sobre a percentagem de macrófagos infectados, pode ser determinada mediante a estimativa da redução do índice parasitário (SERENO et al., 1998; SERENO, HOLZMULLER e LEMESRE, 2000). A partir destes resultados em todos os experimentos foi utilizado Glucantime a concentração de 32 µg/mL e a sensibilidade ao Sb^V foi estimada pela determinação da sobrevivência intracelular dos parasitos.

Por sua vez é bem conhecido que para medir o efeito da atividade anti-leishmania do Glucantime *in vitro* são necessários tempos de incubação prolongados que variam de 72h a 96h (SERENO, GUILVARD, et al., 2001; EL FADILI et al., 2008; ROMERO et al., 2010). Em pacientes com Leishmaniose de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) o regime de tratamento da doença requer períodos longos para sua eficácia (GONZÁLEZ et al., 2009). Isso explica porquê em nosso estudo, o tempo de interação do fármaco com os macrófagos foi estabelecido em 72h e alterações na modulação da expressão gênica ou proteica só foram avaliadas neste tempo.

A análise de 168 genes relacionados ao estresse oxidativo (84 genes) e ao transporte de fármacos (84 genes) através de qPCR *arrays* mostrou que 33 genes do estresse oxidativo e 19 genes do transporte de fármacos foram modulados nas diferentes condições experimentais. Em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis* encontramos um total de 15 genes modulados, dos quais 10 estavam regulados positivamente e 5 regulados negativamente. Dentre estes, a regulação negativa observada no grupo de genes *mbl2*, *nqo1*, *ptgs2* e *sod3*, está de acordo com a capacidade do macrófago para controlar a infecção, uma vez que em conjunto esses genes fazem parte do sistema de defesa antioxidante da célula hospedeira. Neste sentido, estudo recente tem demonstrado que a inibição de SOD1, isoforma do gene SOD3, induz uma diminuição na carga parasitária em macrófagos humanos (KHOURI et al., 2009). Adicionalmente, estudo em pacientes com Leishmaniose cutânea, mostrou que este grupo de pacientes apresentam baixos níveis de atividade SOD, e que o aumento nos níveis intracelulares de SOD1 induziu aumento na carga parasitária (KHOURI et al., 2014). Da mesma forma, o baixo nível de SOD1 ocasionou alteração na morfologia de macrófagos tornando-os morfologicamente similares aos macrófagos infectados observados em pacientes com Leishmaniose Cutânea Difusa (KHOURI et al., 2014). Por outro lado, a regulação negativa destes genes, junto a regulação positiva dos genes *cat*, *gpx2* e *gstp1* sugerem que o parasito tenha capacidade de modular a resposta do hospedeiro favorecendo sua sobrevivência intracelular (DEY et al., 2007; BHARDWAJ et al., 2010).

O tratamento de MDM de humanos não infectados com glucantime mostrou que 32 genes estavam modulados, dos quais 16,7% (28/168) estavam regulados positivamente e 2,4% (4/168) regulados negativamente. Estes genes estão relacionados com a defesa antioxidante, estresse oxidativo, transporte de drogas, onde se destaca a modulação observada nos genes *cat*, *gsr*, *gstp1*, *gclm*, *gpx2*, *hmox1* e *trx*. Estes resultados sugerem que a toxicidade do fármaco pode estar envolvida na modulação da expressão deste conjunto de genes no macrófago. Resultados semelhantes tem sido descritas por outros autores em macrófagos da linhagem celular THP-1 e confirmado em MDM de humanos, sugerindo que o Sb^V favorecesse o estresse oxidativo na célula (EL FADILI et al., 2008). No presente estudo, a superexpressão de genes como *cat*, *gpx2*, *hmox1* e *trx* confirma o efeito do Sb^V e possivelmente do Sb^{III} na resposta ao estresse oxidativo. Adicionalmente, outra via que está modulada na interação Sb-macrófago

é a da síntese da glutatona, onde a expressão do gene que codifica para a proteína GCLM, enzima envolvida no primeiro passo da síntese da GSH está aumentada. A superexpressão deste gene em particular tem sido associada com o aumento nos níveis de GSH na célula (CHEN, Y. et al., 2005). É amplamente conhecido que a GSH é a principal molécula antioxidante em mamíferos e desempenha um papel central na manutenção da homeostasia da célula.

Por outro lado, em MDM de humanos infectados e tratados 19,6% (33/168) dos genes estavam superexpressos e nenhum modulado negativamente. Os resultados da análise de expressão gênica neste grupo, confirmam resultados publicados em estudos recentes por outros autores, utilizando abordagens metodológicas similares. Estes estudos mostraram que os compostos antimoniais, bem como a infecção por *Leishmania*, modula os níveis de expressão do gene que codifica para GSR envolvido na redução da glutatona, e dos genes que codificam para ABCB6 e SLC7A11, envolvidos na distribuição ou redução do fármaco no interior de macrófagos humanos (EL FADILI et al., 2008; GÓMEZ et al., 2013). No presente estudo, alterações na expressão gênica foram encontradas em genes relacionados com as vias de biossíntese de glutatona, defesa antioxidante, transportadores da família ABCB e transportadores de solutos da família SLC, onde se destaca a modulação observada nos genes *gstp1*, *gss*, *trx* e *abcb5*. Os distintos perfis de abundância de mRNA observados na interação macrófago-parasito-fármaco utilizando diferentes espécies de *Leishmania* como a *L. donovani* (EL FADILI et al., 2008; MOOKERJEE BASU et al., 2008), *L. panamensis* (GÓMEZ et al., 2013) e *L. braziliensis*, no presente estudo, ilustram a dinâmica dessas interações. Além disso, mostram a multiplicidade de respostas biológicas observadas nas diferentes espécies e suas diferenças intrínsecas na sensibilidade aos antimoniais pentavalentes (NEAL et al., 1995; YARDLEY et al., 2006; FERNÁNDEZ et al., 2014), ou nas diferentes respostas clínicas observadas no tratamento com compostos antimoniais (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006).

Com o objetivo de encontrar uma possível associação entre os fenótipos de sensibilidade de parasitos e sua modulação é necessário a utilização de patógenos naturalmente resistentes ao fármaco em estudo (ASHUTOSH, SUNDAR e GOYAL, 2007). Neste sentido, devido ao fato de não termos disponível em nosso laboratório cepas de *Leishmania* naturalmente resistentes ao glucantime, utilizamos o modelo de *T. cruzi* para verificar a existência ou não de expressão diferencial de genes em

macrófagos humanos associados com fenótipos de resistência. Para tanto, avaliamos a expressão gênica em macrófagos THP-1 humanos infectados com o clone CL Brener e a cepa Colombiana de *T. cruzi*, fenótipo sensível e resistente ao benzonidazol, respectivamente, e tratados com BZ. Os resultados destas análises corroboram a modulação espécie específica de genes do hospedeiro na interação *Leishmania*-macrófago-glucantime e permitiram identificar possíveis marcadores associados com a resistência ao BZ de *T. cruzi* em macrófagos THP-1 humanos. Interessantemente, no modelo de interação *T. cruzi*-macrófago-BZ, foram encontradas alterações na expressão gênica nas vias relacionadas com a defesa antioxidante, o metabolismo de superóxidos, resposta ao estresse oxidativo e transportadores de solutos. Dentre os genes modulados nestas vias, se destacam o *aqp1*, *aqp7*, *apq9* e *abcb1(mdr1)*. Estudos funcionais de expressão heteróloga tem demonstrado que AQP7 e AQP9 de mamíferos facilita a absorção de As^{III} e Sb^{III} , quando expressas em *S. cerevisiae* ou em oócitos de *Xenopus laevis* (LIU et al., 2002). Por sua vez, modulações nos níveis de expressão gênica destes genes têm sido estudados em outros organismos como por exemplo em *Leishmania*, onde uma diminuição da expressão de AQP1 (homóloga a AQP9 em mamíferos), tem sido associada com fenótipos de resistência (GOURBAL et al., 2004; Marquis et al., 2005). A infecção das células com *T. cruzi* e o tratamento com BZ, se constitui o primeiro relato da modulação destes genes nas vias mencionadas em macrófagos THP-1. Estudo recente em *T. cruzi* reportou que altos níveis de expressão gênica e de atividade de efluxo do transportador MDR1 induzem resistência ao BZ neste parasito (CAMPOS et al., 2013). Contudo, não existem dados de associação entre as AQP e a resposta à droga em *T. cruzi* (MANDAL et al., 2014). No entanto, a participação ou não destas proteínas nos mecanismos de captação da droga na célula hospedeira e sua associação com o desenvolvimento de resistência ao BZ se constitui um campo amplo a ser investigado.

A modulação da expressão gênica observada nas vias de defesa antioxidante e de transporte de solutos em macrófagos infectados e tratados com o BZ, acrescido do fato de que o parasito não possui algumas enzimas do sistema de defesa antioxidante como glutatona peroxidases, catalases, e outras moléculas não enzimáticas como o α -tocoferol e β -carotenos (MAYA et al., 2007), torna plausível inferir de que o *T. cruzi* estaria induzindo esta modulação para se defender e se perpetuar no ambiente intracelular. Recentemente foi descrito que o principal fator associado à ação de BZ em *T. cruzi* é a formação

intracelular de conjugados de BZ com os tiois, produzindo depleção endógena destas moléculas no parasito e aumentando ainda mais sua defesa contra o estresse oxidativo e os metabólitos eletrofílicos gerados por essa depleção (MAYA et al., 2007; TROCHINE et al., 2014).

Sabe-se que compostos nitroheterocíclicos como o BZ, geralmente funcionam como pró-drogas que necessitam ser submetidas à ativação para mediar seus efeitos citotóxicos (MAYA et al., 2007; WILKINSON et al., 2011). No caso do BZ, tem sido demonstrado a participação da enzima nitroreductase de tipo I, presente em parasitos e ausente em humanos, na redução e, portanto na ativação do BZ (WILKINSON et al., 2008; HALL e WILKINSON, 2012). De forma semelhante ao referido aos compostos antimoniais, o mecanismo de ação de BZ permanece incerto e a participação da célula hospedeira nestes mecanismos têm sido praticamente inexplorada (RIGALLI et al., 2012). Em estudo recente de Rigalli e colaboradores 2012, observaram que na linhagem celular HepG2 o BZ induz a expressão e a atividade de enzimas biotransformadoras como GSTP, de transporte de fármacos como P-gp, e MRP2 de forma dose-dependente. Os autores observaram uma modulação destas enzimas somente quando as células eram expostas a uma concentração de 200 μM de BZ, não sendo observada qualquer modulação destas enzimas em doses inferiores a 200 μM de BZ. Os ensaios funcionais através da inibição de um indutor da expressão destas enzimas o PXR (*Pregnane X-receptor*), sugerem que GSTP, P-gp e MRP2 participam na detoxificação do BZ (RIGALLI et al., 2012). Estes resultados foram posteriormente confirmados *in vivo* em ratos, onde o tratamento com BZ aumentou a expressão e a atividade de P-gp e MRP2, principalmente no fígado e no intestino proximal com regulação positiva hepática e intestinal de GSTP (PERDOMO et al., 2013). Em nosso modelo de interação *T. cruzi*-macrófago-BZ, não foi encontrada uma modulação da GSTP1, provavelmente devido à dose de triagem utilizada de 13 μM , o que está de acordo com a ausência de modulação em doses baixas de exposição ao BZ conforme reportado por Rigalli e colaboradores 2012. Uma pesquisa extensa da literatura mostrou que não há estudos de associação entre fenótipos de sensibilidade e resistência de cepas de *T. cruzi* e seu efeito na modulação da expressão gênica nas células hospedeiras. No entanto, inúmeros estudos sobre a resistência ao BZ focados no parasito, incluindo análise proteômica e metabólica têm sido relatados (VILLARREAL et al., 2005; ANDRADE et al., 2008; MURTA et al.,

2008; MEJÍA-JARAMILLO et al., 2011; Dos SANTOS et al., 2012; TROCHINE et al., 2014).

A complexidade das interações hospedeiro-patógeno descrita para as diferentes espécies de *Leishmania* e para o *T. cruzi* e sua possível associação com o desenvolvimento das diferentes apresentações clínicas das doenças por eles causadas têm sido descritas por diferentes autores (DEY et al., 2007; ADESSE et al., 2010; KAYE e SCOTT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; OSORIO et al., 2012; PIACENZA et al., 2013).

No contexto da interação de *Leishmania*-macrófago-Sb, recentemente foi descrito que a infecção com *L. donovani* resistente ao Sb em macrófagos induz a expressão de MRP-1 e P-gp nas células do hospedeiro, resultando em uma redução da concentração de Sb^V intracelular, o que não foi observado para *L. donovani* sensível ao Sb (MOOKERJEE BASU et al., 2008). Nossos resultados confirmam que efetivamente parasitos de *Leishmania* com fenótipos sensíveis, não induzem mudanças na expressão de genes que codificam para a P-gp (MDR-1) e MRP-1 em macrófagos humanos. Isso foi observado em nossas análises por RT-qPCR usando sondas específicas para os genes MT3, AQP9, P-gp e MRP-1 e confirmado com os resultados de *PCR arrays* (Figura S1, pag 152, Tabelas S6 e S7). A ausência de modulação nestes genes transportadores na célula hospedeira durante a interação com cepas de *Leishmania* com fenótipos sensíveis ao Sb foram recentemente confirmadas, onde foi demonstrado que cepas de *L. donovani* com fenótipos de resistência ao antimônio e não cepas com fenótipos sensíveis, regulam positivamente a expressão de IL-10 via fator de transcrição c-Fos/c-Jun como pré-requisito para a modulação positiva de MDR1 (MUKHERJEE et al., 2013). Estes resultados demonstram a capacidade da *Leishmania* em interferir na maquinaria da célula hospedeira e, conseqüentemente, suportam a idéia de que os mecanismos de resistência aos fármacos também devem ser abordados na interação do parasito com a célula hospedeira.

No sentido de verificar se a modulação da expressão gênica está relacionada com a expressão proteica realizamos ensaios de Western blot utilizando anticorpos monoclonais e policlonais contra proteínas específicas. Os resultados mostram uma correlação positiva da modulação na expressão gênica com a expressão proteica em GSTP1, GCLM, GSR, GSS, TRX e ABCB5, e uma correlação negativa para SOD3. Contudo, esta correlação não foi observada para CAT, GPX2, ABCB6, ABCB11 e SLC22A1. A ausência de correlação em algumas das proteínas provavelmente pode ser devido a variantes dos transcritos

não detectados por RT-qPCR ou modificações pós-traducionais (CHEN et al., 2002; LICHTINGHAGEN et al., 2002; GREENBAUM et al., 2003; PASCAL et al., 2008; GRY et al., 2009; MOUS et al., 2012).

O estudo da modulação da expressão gênica, conjuntamente com as análises de correlação da expressão proteica em macrófagos humanos não apenas confirmou o conhecimento existente da interação hospedeiro-patógeno-fármaco (ASHUTOSH, SUNDAR e GOYAL, 2007; JEDDI, PIARROUX e MARY, 2011), como também permitiu identificar genes que codificam para as enzimas GSS envolvida na via de biossíntese da glutatona. A GSTP1 que cataliza a conjugação da GSH com produtos xenobióticos, além do transportador ABCB5 envolvido no efluxo de fármacos. Vale ressaltar que a modulação destes genes em resposta a infecção com *L. braziliensis* e o tratamento com Glucantime ainda não haviam sido descritos em macrófagos humanos (Tabela S6 e S7).

A GSTP1 pertence à superfamília da glutatona S-transferase (GSTs), as quais desempenham um papel importante no sistema de defesa celular, particularmente na detoxificação de compostos xenobióticos catalizando a conjugação da glutatona reduzida (GSH) com compostos eletrofílicos, e assim, facilitando o seu efluxo da célula (HAYES, FLANAGAN e JOWSEY, 2005). É importante destacar que a conjugação de fármacos com GSH pode ocorrer tanto de forma espontânea como por via catalítica pela ação das GSTs com a classe P1 sendo esta, a enzima mais ativa desta superfamília (PLOEMEN et al., 1994; RUZZA et al., 2009). No modelo utilizando Arsênico (As), metal estreitamente relacionado com Sb, tem sido descrito um aumento na expressão da GST-P em linhagens celulares de rato resultando em um aumento da tolerância da linhagem celular ao arsênico facilitado pela formação de conjugados com GSH e efluxo do As da célula utilizando um transportador da família ABC (LIU et al., 2001; LIU, 2010). Em nosso modelo os resultados de aumento na expressão da GSTP1 sugerem que esta enzima pode estar desempenhando um papel semelhante de detoxificação observado para o As, formando conjugados de Sb com GSH em macrófagos humanos. Interessantemente nos ensaios de inibição seletiva dos genes de defesa antioxidante (*gstp1*, *gss* e *trx*) e do transportador de fármacos *abcb5*, observou-se que o marcador GSTP1 apresentou os valores de redução mais altos nas porcentagens de sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* após tratamento com Sb^V, mostrando um efeito direto da inibição do gene alvo e a diminuição significativa da carga parasitária em MΦ THP-1.

Este efeito foi igualmente evidenciado tanto em tempos curtos de exposição ao fármaco (24h), como a doses baixas de Sb^V (8 $\mu\text{g/mL}$) como apresentado anteriormente na descrição dos resultados da Figura 19. Estes achados acrescido dos resultados de avaliação da expressão da proteína nos ensaios de tempo e dose dependente reforçam a hipótese da possível participação da proteína GSTP1 em macrófagos humanos na formação do complexo $Sb(GS)_3$ para seu posterior efluxo da célula. A participação das glutionas S transferases na formação de complexos com metais tem sido explorada na linhagem SA7 de células de ovário de hamster chinês (CHO) resistente ao arsênico (LO et al., 1992). Neste estudo, uma associação da GSTP1 com a resistência ao As foi demonstrada utilizando ácido etacrínico e azul de Cibacron, inibidores do sitio ativo das GSTs e da biossíntese de GSH. Os autores observaram uma diminuição da resistência ao As na linhagem celular SA7, onde níveis aumentados da GSTP1 foram observados ao realizar o pré-tratamento das células com concentrações subletais de As na linhagem celular SA7N (linhagem celular revertente parcial ao Arsênico), sugerindo uma correlação entre os níveis de GSTP1 e a resistência ao As (LO et al., 1992). Nossos resultados de inibição seletiva do gene *gstp1* através de silenciamento constituem o primeiro relato de inibição específica desta molécula e seu possível papel no mecanismo de detoxificação de compostos antimoniais em células THP-1.

A GSS é uma enzima importante na biossíntese da GSH catalisando o segundo passo na formação deste tiol (LU, 2013; MORRIS et al., 2013). A GSH apresenta uma função dupla, que além de participar na detoxificação de produtos xenobióticos como mencionado anteriormente formando conjugados para serem exportados (LU, 2013), também participa na redução de compostos antimoniais fazendo a conversão não enzimática da forma Sb^V na sua forma ativa trivalente Sb^{III} (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; YAN et al., 2003). O papel funcional da GSS na sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* em macrófagos humanos tratados com Glucantime foi avaliada realizando *knockdown* específico para os transcritos deste gene, observando-se uma diminuição significativa da sobrevivência intracelular de 17,8% em macrófagos THP-1 *gss*^{KD}. A diminuição na expressão de GSS da célula hospedeira pode resultar na redução dos níveis de GSH intracelular e promover um ambiente intracelular oxidativo inibindo ou minimizando a redução do Sb^V à forma trivalente ou causando uma diminuição na complexação e posterior efluxo do fármaco ao ambiente extracelular.

Os transportadores da subfamília ABCB tem sido caracterizados como moléculas localizadas na membrana plasmática fazendo efluxo de fármacos e em diferentes organelas celulares como mitocôndria e retículo endoplasmático (FRANK et al., 2003; GLAVINAS et al., 2004; FRANK et al., 2005). O transportador ABCB5 é um transportador de doxorubicina, camptotecina, 10-hidroxi camptotecina e 5-fluorouracil, fármacos amplamente utilizados na quimioterapia do câncer (GILLET, EFFERTH e REMACLE, 2007). Este transportador faz parte de uma família de genes MDR e apresenta homologia de 70% na sequência de aminoácidos com o transportador ABCB1 (P-gp, MDR1), amplamente relacionado ao efluxo de fármacos potenciando fenótipos de resistência em melanocitos e células de melanoma (CHEN, K. G. et al., 2005). Diferentes estudos têm descrito que proteínas membros desta subfamília (ABCB1, ABCB6, ABCB11) se encontram igualmente localizadas em lisossomos sugerindo uma função de influxo de produtos xenobióticos potencializando o sequestro ou a distribuição no interior celular destes compostos (ZHANG et al., 2000; RAJAGOPAL e SIMON, 2003; DEMIREL et al., 2007; KISS et al., 2012; GÓMEZ et al., 2013). No presente estudo, a citolocalização mais associada do transportador ABCB5 com membranas dos fagolisossomos onde os parasitos residem em macrófagos THP-1 tratados com Sb^V, sugere que este transportador pode ter algum papel na sensibilidade de *L. braziliensis* ao tratamento com Glucantime. Neste sentido, as análises funcionais de inibição seletiva utilizando siRNA específicos para o gene *abcb5*, mostraram que houve um efeito direto da inibição deste gene com a diminuição da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* potencializando o efeito leishmanicida do Sb^V em MΦ THP-1. Da mesma forma, a redução da sobrevivência intracelular de *L. braziliensis* foi também observada em células THP-1 quando os genes *gstp1* e *gss* foram silenciados. A ausência desta redução na sobrevivência intracelular do parasito evidenciada em MΦ THP-1 infectados não tratados suporta esta hipótese. Em conjunto as análises funcionais de citolocalização e inibição seletiva e as análises de expressão do transportador ABCB5, sugerem que este transportador pode estar envolvido na detoxificação de compostos antimoniais mediante o efluxo da forma ativa Sb^{III}. A participação de membros da família ABCB, como por exemplo, o transportador ABCB1 (P-gp, MDR1), no efluxo de Sb tem sido descrita por outros autores, onde uma modulação positiva deste gene resulta na redução significativa de Sb intracelular, como consequência de um aumento no efluxo do composto (VERNHET et al., 1999; VERNHET et

al., 2000). O presente estudo constitui o primeiro relato tanto da localização subcelular do transportador ABCB5 na membrana de fagolisossomos de macrófagos THP-1 como de sua possível participação na detoxificação de compostos antimoniais.

Conjuntamente, nossos resultados sugerem que a inibição seletiva do gene humano *gstp1* aumenta significativamente o efeito leishmanicida *in vitro* do Sb^{V} sobre a forma intracelular de *L. braziliensis* em MΦ humanos THP-1. Este efeito foi igualmente demonstrado nas cepas de *L. braziliensis* pTEXCβS e pTEXCS que apresentavam perda de sensibilidade ao Sb^{V} , revertendo o seu fenótipo de tolerância ao Sb^{V} até alcançar valores de sensibilidade de cepa selvagem de *L. braziliensis* em MΦ humanos THP-1 não silenciados para o gene alvo. Estes achados sugerem que uma estratégia que combine inibidores específicos de GSTP1 com os fármacos de primeira linha no tratamento das Leishmanioses pode reverter fenótipos de resistência em ensaios clínicos. Por ser uma estratégia interessante para melhorar o tratamento das Leishmanioses, estudos adicionais são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares do efeito da inibição de genes humanos sobre o aumento de sensibilidade em parasitos naturalmente resistentes ao antimônio.

O modelo da possível interação das enzimas GSTP, GSS e ABCB5 proposto sugere que estas enzimas podem estar envolvidas no mecanismo de detoxificação do Sb potenciando a sobrevivência intracelular do parasito em macrófagos humanos tratados com Glucantime através de três mecanismos principais. O primeiro estaria relacionado com a quantidade de GSH disponível no macrófago que potencializaria a redução do Glucantime (Sb^{V}) para sua forma ativa o antimonial Sb^{III} , onde a GSS seria uma das enzimas responsáveis por manter os níveis adequados de GSH. Além da redução, a disponibilidade de GSH igualmente facilitaria a conjugação desta molécula com os compostos Sb^{III} presentes no interior da célula através da atividade catalítica de GSTP1, sendo este o segundo mecanismo. Por fim, o terceiro mecanismo está relacionado com o efluxo do composto Sb^{III} mediante a participação do transportador ABCB5, gerando assim uma diminuição do contato do fármaco com o parasito, potencializando sua sobrevivência na célula hospedeira. A participação da GSTP, GSS e ABCB5 na detoxificação de compostos antimoniais complementam o conhecimento existente dos mecanismos de detoxificação de Sb e a participação da célula hospedeira nestes processos, onde se tem descrito que uma atividade aumentada de γ -GCL leva a um aumento nos níveis

de tiois (CHEN, Y. et al., 2005; WYLLIE e FAIRLAMB, 2006). Estes tiois participam na formação do complexo com o Sb^{III} ou na ativação do Sb^V (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; YAN et al., 2003; LU, 2013). Além disso, têm sido descrito que os compostos antimoniais podem entrar na célula hospedeira utilizando canais transportadores como as AQP7 e AQP9 (ROSEN, 2002; JAHN e BIENERT, 2010; GÓMEZ et al., 2013) e que o influxo a compartimentos especializados como os fagolisosomos estaria mediada pelo transportador ABCB6 (GÓMEZ et al., 2013). O resumo do modelo proposto destes mecanismos em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* se encontra detalhado na Figura 21.

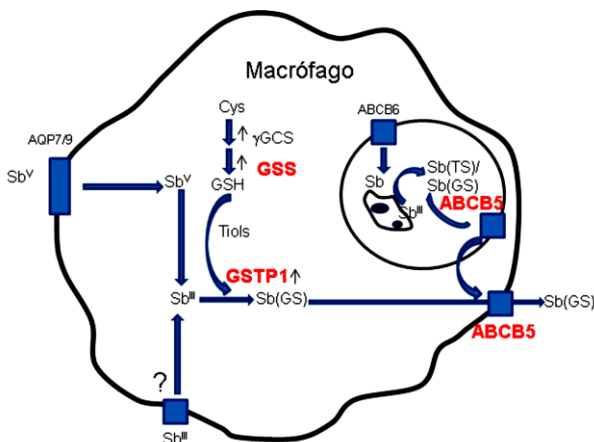


Figura 21. Modelo proposto de detoxificação de Glucantime em macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis*. A via de detoxificação inclui três mecanismos principais, onde GSS estaria no primeiro mecanismo relacionado com a quantidade de GSH disponível no macrófago. No segundo mecanismo, GSTP1 estaria catalizando a conjugação de moléculas de tiois com os compostos Sb^{III} e por fim ABCB5 estaria relacionado com o efluxo do composto Sb^{III} mediante a participação deste transportador constituindo este o terceiro mecanismo. Outras abreviações e convenções: Sb(TS) e Sb(GS), conjugados de Sb(III) com tripanotona ou glutatona. Cys= cisteína. Em vermelho se destacam as proteínas caracterizadas no presente estudo.

O presente estudo permitiu ampliar o conhecimento do envolvimento da célula hospedeira no possível mecanismo de detoxificação de Glucantime, onde o gene *gstp1* mostrou-se como um interessante marcador para o aumento da atividade leishmanicida do fármaco. Estes resultados, em conjunto com os estudos recentes no melhoramento do Glucantime mediante nanotecnologia, revelaram que o desenvolvimento inovador de novas formulações de antimônio, poderá impactar positivamente no tratamento das leishmanioses. Neste sentido, propomos que uma estratégia inovadora poderia ser o uso de siRNA, em especial o do gene *gstp1*, associado as formulações lipossomais e de ciclodextrina atualmente em desenvolvimento por outros grupos, o que potencializaria a ação do fármaco e diminuiria os efeitos colaterais das atuais formulações.

7 CONCLUSÕES.

Em conjunto, nossos resultados nos permitem concluir que:

- Macrófagos derivado de Monócitos humanos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime apresentam ativação de genes de defesa antioxidante demonstrado pelo nível de mRNA e da expressão de proteínas;
- A infecção por *L. braziliensis* modulou um número significativamente menor de genes em MDM de humanos, quando comparado com macrófagos não infectados e tratados com Sb^V ou infectados e tratados;
- A regulação positiva dos genes *cat*, *gpx2* e *trx* confirma o efeito do Sb^V e possivelmente do Sb^{III} na resposta ao estresse oxidativo em MDM de humanos;
- O silenciamento dos genes humanos *gstp1*, *gss* e *abcb5* aumentou a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em MΦ THP-1;
- O silenciamento do gene humano *gstp1* aumentou a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao Sb^V em MΦ THP-1 de forma tempo e dose dependentes;
- A inibição seletiva do gene humano *gstp1* em MΦ humanos THP-1 restabeleceu o padrão de sensibilidade ao Sb^V de *L. braziliensis* intracelular super-expressando as proteínas CS e CβS;
- A regulação positiva a nível gênico e proteico de GSTP1, GSS, TRX e ABCB5 em conjunto com a análise funcional em macrófagos infectados e tratados sugere que estas proteínas podem ser potenciais alvos candidatos para intervenção terapêutica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIRON, A.; GUREVICH, M. Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: the model of multiple sclerosis. **Autoimmun Rev**, v. 5, n. 8, p. 517-22, Oct 2006. ISSN 1568-9972. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17027885> >.

ADESSE, D. et al. Transcriptomic signatures of alterations in a myoblast cell line infected with four distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, n. 5, p. 846-54, May 2010. ISSN 1476-1645. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20439965> >.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010. ISSN 1365-2230. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831602> >.

ANDRADE, H. M. et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to Benzimidazole. **J Proteome Res**, v. 7, n. 6, p. 2357-67, Jun 2008. ISSN 1535-3893. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18435557> >.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 109-18, Feb 2012. ISSN 1435-4373. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533874> >.

ARTHUR, G.; BITTMAN, R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether lipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1390, n. 1, p. 85-102, Feb 1998. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9487143> >.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J Med Microbiol**, v. 56, p. 143-53, 2007. ISSN 0022-2615. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17244793> >.

BAIOCCO, P. et al. Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. **J Med Chem**, v. 52, n. 8, p. 2603-12, Apr 2009. ISSN 1520-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19317451> >.

BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen Pharmacol**, v. 30, n. 4, p. 435-43, Apr 1998. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9580315> >.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J. V.; BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 2, p. 197-201, Jan 1987. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3028425> >.

BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 27, n. 6, p. 916-20, Jun 1985. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2411217> >.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. e313, 2008. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18958165> >.

BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Arch Toxicol**, v. 82, n. 8, p. 493-512, Aug 2008. ISSN 0340-5761. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496671> >.

BHARDWAJ, S. et al. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 109189, 2010. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20396387> >.

BHATTACHARJEE, H. et al. Drug uptake and pharmacological modulation of drug sensitivity in leukemia by AQP9. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 322, n. 3, p. 836-41, Sep 2004. ISSN 0006-291X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15336539> >.

BHATTACHARJEE, Y. Toxicology. A sluggish response to humanity's biggest mass poisoning. **Science**, v. 315, n. 5819, p. 1659-61, Mar 2007. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379786> >.

BRAHMACHARI, U. N. et al. Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part VIII. Quantitative studies in excretion of antimony (tartar emetic and urea stibamine) **The Indian Journal of Medical Research**, v. 1924, n. 11, p. 829-838, 1924. Disponível em: < [http://ijmr.in/CurrentTopicView.aspx?year=Indian%20J%20Med%20Res%20Vol.11%20January%201924%20pp%20829-838\\$Original%20Article](http://ijmr.in/CurrentTopicView.aspx?year=Indian%20J%20Med%20Res%20Vol.11%20January%201924%20pp%20829-838$Original%20Article) >.

BURCZYNSKI, M. E. et al. Transcriptional profiles in peripheral blood mononuclear cells prognostic of clinical outcomes in patients with advanced renal cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 3, p. 1181-9, Feb 2005. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709187> >.

CALLAHAN, H. L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, n. 4, p. 818-22, Apr 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087496> >.

CAMPOS, M. C. et al. P-glycoprotein efflux pump plays an important role in Trypanosoma cruzi drug resistance. **Parasitol Res**, v. 112, n. 6, p. 2341-51, Jun 2013. ISSN 1432-1955. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23572046> >.

CARBREY, J. M.; AGRE, P. Discovery of the aquaporins and development of the field. **Handb Exp Pharmacol**, n. 190, p. 3-28, 2009. ISSN 0171-2004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096770> >.

CARTER, K. C. et al. Resistance of Leishmania donovani to sodium stibogluconate is related to the expression of host and parasite gamma-glutamylcysteine synthetase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 88-95, 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16377672> >.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-82, Nov 2007. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938629> >.

CHEN, G. et al. Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. **Mol Cell Proteomics**, v. 1, n. 4, p. 304-13, Apr 2002. ISSN 1535-9476. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096112> >.

CHEN, K. G. et al. Principal expression of two mRNA isoforms (ABCB 5alpha and ABCB 5beta) of the ATP-binding cassette transporter gene ABCB 5 in melanoma cells and melanocytes. **Pigment Cell Res**, v. 18, n. 2, p. 102-12, Apr 2005. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15760339> >.

CHEN, Y. et al. Glutamate cysteine ligase catalysis: dependence on ATP and modifier subunit for regulation of tissue glutathione levels. **J Biol Chem**, v. 280, p. 33766-74, 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081425> >.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 502-8, Nov 2003. ISSN 1471-4922. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580961> >.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1478-83, Oct 2011. ISSN 1469-0691. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933306> >.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 111-26, Jan 2006. ISSN 0893-8512. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418526> >.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des**, v. 8, n. 4, p. 319-42, 2002. ISSN 1381-6128. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860369> >.

CUNNINGHAM, M. L.; ZVELEBIL, M. J.; FAIRLAMB, A. H. Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals. **Eur J Biochem**, v. 221, n. 1, p. 285-95, Apr 1994. ISSN 0014-2956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168518> >.

DAS, V. N. et al. A randomized clinical trial of low dosage combination of pentamidine and allopurinol in the treatment of antimony unresponsive cases of visceral leishmaniasis. **J Assoc Physicians India**, v. 49, p. 609-13, Jun 2001. ISSN 0004-5772. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584934> >.

DAS, V. N. et al. A controlled, randomized nonblinded clinical trial to assess the efficacy of amphotericin B deoxycholate as compared to pentamidine for the treatment of antimony unresponsive visceral leishmaniasis cases in Bihar, India. **Ther Clin Risk Manag**, v. 5, n. 1, p. 117-24, Feb 2009. ISSN 1176-6336. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19436614> >.

DE MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. In vitro interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World Leishmania species. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 1, p. 150-4, Jan 2014. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970484> >.

DECUYPERE, S. et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in Leishmania donovani isolates from Nepal. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 4616-21, 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251303> >.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochim Biophys Acta**, v. 1570, n. 3, p. 192-8, Apr 2002. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020809> >.

DEMIREL, O. et al. Identification of a lysosomal peptide transport system induced during dendritic cell development. **J Biol Chem**, v. 282, n. 52, p. 37836-43, Dec 2007. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17977821> >.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J**, v. 381, n. Pt 2, p. 405-12, Jul 2004. ISSN 1470-8728. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15056070> >.

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 95, n. 3, p. 239-43, 2001 May-Jun 2001. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11490989> >.

DEY, R. et al. Functional paradox in host-pathogen interaction dictates the fate of parasites. **Future Microbiol**, v. 2, p. 425-37, 2007. ISSN 1746-0921. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17683278> >.

DOS SANTOS, P. F. et al. Molecular characterization of the hexose transporter gene in benznidazole resistant and susceptible populations of *Trypanosoma cruzi*. **Parasit Vectors**, v. 5, p. 161, 2012. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22871258> >.

DOUA, F. et al. The efficacy of pentamidine in the treatment of early-late stage *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 55, n. 6, p. 586-8, Dec 1996. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9025682> >.

DUFFIN, J.; CAMPLING, B. G. Therapy and disease concepts: the history (and future?) of antimony in cancer. **J Hist Med Allied Sci**, v. 57, n. 1, p. 61-78, Jan 2002. ISSN 0022-5045. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11892514> >.

EL FADILI, K. et al. Modulation of gene expression in human macrophages treated with the anti-leishmania pentavalent antimonial drug sodium stibogluconate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 2, p. 526-33, Feb 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18070969> >.

EL FADILI, K. et al. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 1988-93, 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15855523> >.

EPHROS, M. et al. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 278-82, Feb 1999. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9925518> >.

EPHROS, M.; WALDMAN, E.; ZILBERSTEIN, D. C. P. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, p. 1064-8, 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145870> >.

EUE, I.; ZEISIG, R.; ARNDT, D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U 937 cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 121, n. 6, p. 350-6, 1995. ISSN 0171-5216. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7797600> >.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annu Rev Microbiol**, v. 46, p. 695-729, 1992. ISSN 0066-4227. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1444271> >.

FARAUT-GAMBARELLI, F. et al. In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, p. 827-30, 1997. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087498> >.

FERNÁNDEZ, O. et al. Novel approach to in vitro drug susceptibility assessment of clinical strains of *Leishmania* spp. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 7, p. 2207-11, Jul 2012. ISSN 1098-660X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22518860> >.

FERNÁNDEZ, O. L. et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2871, May 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24853871> >.

FERREIRA, C. D. S. et al. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**, v. 16, p. 441-6, 2003. ISSN 0966-0844. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12680707> >.

FINKEL, T. Signal transduction by mitochondrial oxidants. **J Biol Chem**, v. 287, n. 7, p. 4434-40, Feb 2012. ISSN 1083-351X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21832045> >.

FLOHÉ, L.; HECHT, H. J.; STEINERT, P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 966-84, Nov 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569629> >.

FRANK, N. Y. et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. **Cancer Res**, v. 65, p. 4320-33, 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899824> >.

FRANK, N. Y. et al. Regulation of progenitor cell fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a novel human ATP-binding cassette transporter. **J Biol Chem**, v. 278, p. 47156-65, 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960149> >.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7, n. 12, p. 1343-58, Dec 2010. ISSN 1744-7593. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029028> >.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 913-6, 2001. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11181379> >.

FRÉZARD, F. et al. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Reviews in Inorganic Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 1-12, February 2013. ISSN 2191-0227. Disponível em: < <http://www.degruyter.com/view/j/revic.2013.33.issue-1/revic-2012-0006/revic-2012-0006.xml> >.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317-36, 2009. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19633606> >.

FRÉZARD, F. et al. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. **J Inorg Biochem**, v. 102, n. 4, p. 656-65, Apr 2008. ISSN 0162-0134. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18061680> >.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews** v. 6, n. 1, p. 119-132, 2014. Disponível em: < <http://download.springer.com/static/pdf/548/art%253A10.1007%252Fs12551-013-0134->

[y.pdf?auth66=1409423832_efcdc6c3a44be7f922050b827972a064&ext=.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633991) >.

GALLAGHER, S. et al. Immunoblotting and immunodetection. **Curr Protoc Mol Biol**, v. Chapter 10, p. Unit 10.8, Jul 2008. ISSN 1934-3647. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633991> >.

GILLET, J. P.; EFFERTH, T.; REMACLE, J. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1775, n. 2, p. 237-62, Jun 2007. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17572300> >.

GLAVINAS, H. et al. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. **Curr Drug Deliv**, v. 1, n. 1, p. 27-42, Jan 2004. ISSN 1567-2018. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16305368> >.

GONZÁLEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD004834, 2009. ISSN 1469-493X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19370612> >.

GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem J**, v. 37, n. 2, p. 198-209, Jul 1943. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16747617> >.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 12, p. 931-47, Dec 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24287781> >.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 293-307, Jun 2012. ISSN 1557-9824. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632640> >.

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in Leishmania by an aquaglyceroporin. **J Biol Chem**, v. 279, n. 30, p. 31010-7, Jul 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15138256> >.

GOYARD, S. et al. An in vitro system for developmental and genetic studies of *Leishmania donovani* phosphoglycans. **Mol Biochem Parasitol**, v. 130, n. 1, p. 31-42, Aug 2003. ISSN 0166-6851. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14550894> >.

GREENBAUM, D. et al. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. **Genome Biol**, v. 4, n. 9, p. 117, 2003. ISSN 1465-6914. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12952525> >.

GRIFFITH, O. W. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 922-35, Nov 1999. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569625> >.

GRONDIN, K. et al. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. **Embo j**, v. 16, p. 3057-65, 1997. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9214623> >.

GRY, M. et al. Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines. **BMC Genomics**, v. 10, p. 365, 2009. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19660143> >.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **Lancet Infect Dis**, v. 2, n. 8, p. 494-501, Aug 2002. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150849> >.

GÓMEZ, M. A. et al. *Leishmania panamensis* infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: impact on intracellular parasite survival. **J Antimicrob Chemother**, Sep 2013. ISSN 1460-2091. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23975742> >.

HADDAD, J. J. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. **Respir Res**, v. 3, p. 26, 2002. ISSN 1465-993X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12537605> >.

HAIMEUR, A. et al. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 108, p. 131-5, 2000. ISSN 0166-6851. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10802326> >.

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int**, v. 2011, p. 571242, 2011. ISSN 2090-2190. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091408> >.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 1, p. 115-23, Jan 2012. ISSN 1098-6596. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037852> >.

HANDY, D. E.; LOSCALZO, J. Redox regulation of mitochondrial function. **Antioxid Redox Signal**, v. 16, n. 11, p. 1323-67, Jun 2012. ISSN 1557-7716. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22146081> >.

HANSEN, C. et al. Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS. **Biol Trace Elem Res**, v. 144, n. 1-3, p. 234-43, Dec 2011. ISSN 1559-0720. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21618006> >.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 45, p. 51-88, 2005. ISSN 0362-1642. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822171> >.

HENDRICKS, L.; WRIGHT, N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in vitro cultivation of saline aspirates in Schneider's *Drosophila* Medium. **Am J Trop Med Hyg**, v. 28, n. 6, p. 962-4, Nov 1979. ISSN 0002-9637. Disponível em: <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=507285 >.

HENKLER, F.; BRINKMANN, J.; LUCH, A. The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. **Cancers (Basel)**, v. 2,

n. 2, p. 376-96, 2010. ISSN 2072-6694. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24281075> >.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, p. 1191-9, 1999. ISSN 0140-6736. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10513726> >.

HOCHHUTH, C. H. et al. Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. **Cell Immunol**, v. 141, n. 1, p. 161-8, Apr 1992. ISSN 0008-8749. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1555249> >.

IRIGOÍN, F. et al. Insights into the redox biology of Trypanosoma cruzi: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radic Biol Med**, v. 45, p. 733-42, 2008. ISSN 0891-5849. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18588970> >.

IRSCH, T.; KRAUTH-SIEGEL, R. L. Glyoxalase II of African trypanosomes is trypanothione-dependent. **J Biol Chem**, v. 279, n. 21, p. 22209-17, May 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14976196> >.

JACKSON, J. E. et al. Quantitative in vitro drug potency and drug susceptibility evaluation of Leishmania ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, p. 464-80, 1990. ISSN 0002-9637. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2173431> >.

JAHN, T. P.; BIENERT, G. P. MIPs and their role in the exchange of metalloids. Preface. **Adv Exp Med Biol**, v. 679, p. v-vi, 2010. ISSN 0065-2598. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20666219> >.

JEDDI, F.; PIARROUX, R.; MARY, C. Antimony resistance in leishmania, focusing on experimental research. **J Trop Med**, v. 2011, p. 695382, 2011. ISSN 1687-9694. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22174724> >.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani. **Mol Biochem Parasitol**, v. 164, n. 2, p. 111-7, Apr 2009. ISSN 0166-6851. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19146886> >.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 87-106, 2004. ISSN 0066-4154. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15189137> >.

JONES, D. P.; GO, Y. M. Redox compartmentalization and cellular stress. **Diabetes Obes Metab**, v. 12 Suppl 2, p. 116-25, Oct 2010. ISSN 1463-1326. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029308> >.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, p. 604-15, 2011. ISSN 1740-1534. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747391> >.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **J Glob Infect Dis**, v. 2, n. 2, p. 177-85, May 2010. ISSN 0974-8245. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606974> >.

KHOURI, R. et al. IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. **J Immunol**, v. 182, n. 4, p. 2525-31, Feb 2009. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19201909> >.

KHOURI, R. et al. SOD1 plasma level as a biomarker for therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, v. 210, n. 2, p. 306-10, Jul 2014. ISSN 1537-6613. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24511100> >.

KIM, D. H. et al. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3, n. 2, p. e381, 2009. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221595> >.

KISS, K. et al. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37378, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22655043> >.

KUMAR, R.; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, n. e13, 2014. Disponível em: < <http://www.nature.com/cti/journal/v3/n3/full/cti20144a.html> >.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Rev Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010. ISSN 2176-6223. Disponível em: < http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232010000200002&lng=en&nrm=iso >.

LICHTINGHAGEN, R. et al. Different mRNA and protein expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in benign and malignant prostate tissue. **Eur Urol**, v. 42, n. 4, p. 398-406, Oct 2002. ISSN 0302-2838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12361907> >.

LIRA, R. et al. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani. **J Infect Dis**, v. 180, n. 2, p. 564-7, Aug 1999. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10395884> >.

LIU, J. et al. Overexpression of glutathione S-transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic. **Mol Pharmacol**, v. 60, n. 2, p. 302-9, Aug 2001. ISSN 0026-895X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11455017> >.

LIU, Z. Roles of vertebrate aquaglyceroporins in arsenic transport and detoxification. **Adv Exp Med Biol**, v. 679, p. 71-81, 2010. ISSN 0065-2598. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20666225> >.

LIU, Z. et al. Arsenite transport by mammalian aquaglyceroporins AQP7 and AQP9. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 9, p. 6053-8, Apr 2002. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11972053> >.

LO, J. F. et al. Glutathione S-transferase pi in an arsenic-resistant Chinese hamster ovary cell line. **Biochem J**, v. 288 (Pt 3), p. 977-82, Dec 1992. ISSN 0264-6021. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1472011> >.

LOISEAU, P. M.; BORIES, C. Mechanisms of drug action and drug resistance in Leishmania as basis for therapeutic target identification and design of antileishmanial modulators. **Curr Top Med Chem**, v. 6, n. 5, p.

539-50, 2006. ISSN 1568-0266. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16719806>>.

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Mol Aspects Med**, v. 30, n. 1-2, p. 42-59, 2009 Feb-Apr 2009. ISSN 1872-9452. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18601945>>.

LU, S. C. C. P. Glutathione synthesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, p. 3143-53, 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995213>>.

LUCUMI, A. et al. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 8, p. 1990-5, Aug 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9687395>>.

LUX, H. et al. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 111, n. 1, p. 1-14, Nov 2000. ISSN 0166-6851. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11087912>>.

LÉGARÉ, D. et al. ABC proteins of *Leishmania*. **J Bioenerg Biomembr**, v. 33, p. 469-74, 2001. ISSN 0145-479X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804188>>.

LÉGARÉ, D. et al. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant *Leishmania*. **Exp Parasitol**, v. 87, p. 275-82, 1997. ISSN 0014-4894. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371094>>.

LÉGARÉ, D. et al. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **J Biol Chem**, v. 276, p. 26301-7, 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306588>>.

MALHOTRA, J. D.; KAUFMAN, R. J. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? **Antioxid Redox Signal**, v. 9, n. 12, p. 2277-93, Dec 2007. ISSN 1523-0864. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17979528>>.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 617521, 2010. ISSN 1110-7251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19888437> >.

MANDAL, G. et al. Trypanosomatid Aquaporins: Roles in Physiology and Drug Response **Diseases**, v. 2, n. 1, p. 3-23, 2014. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2079-9721/2/1/3/htm#B86-diseases-02-00003> >.

MANDAL, G. et al. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. **Parasitology**, v. 134, p. 1679-87, 2007. ISSN 0031-1820. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17612420> >.

MARINHO, F. E. A. et al. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507-9, Jun 2011. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21739043> >.

MARQUIS, N. et al. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. **Mol Microbiol**, v. 57, n. 6, p. 1690-9, Sep 2005. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16135234> >.

MAYA, J. D. et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 601-20, Apr 2007. ISSN 1095-6433. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16626984> >.

MCCONVILLE, M. J.; NADERER, T. Metabolic pathways required for the intracellular survival of *Leishmania*. **Annu Rev Microbiol**, v. 65, p. 543-61, 2011. ISSN 1545-3251. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21721937> >.

MEHARG, A. A. Arsenic in rice--understanding a new disaster for South-East Asia. **Trends Plant Sci**, v. 9, n. 9, p. 415-7, Sep 2004. ISSN 1360-1385. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15337490> >.

MEHTA, A.; SHAHA, C. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and

glutathione. **Free Radic Biol Med**, v. 40, p. 1857-68, 2006. ISSN 0891-5849. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16678023> >.

MEJÍA-JARAMILLO, A. M. et al. Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 169, 2011. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892937> >.

MOOKERJEE BASU, J. et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 3, p. 1080-93, Mar 2008. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18056276> >.

MOOKERJEE BASU, J. et al. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 5, p. 1788-97, May 2006. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16641451> >.

MORAIS-TEIXEIRA, E. et al. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 358-62, Jun 2008. ISSN 1678-8060. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18660990> >.

MOREIRA, E. S.; ANACLETO, C.; PETRILLO-PEIXOTO, M. L. Effect of glucantime on field and patient isolates of New World *Leishmania*: use of growth parameters of promastigotes to assess antimony susceptibility. **Parasitol Res**, v. 84, p. 720-6, 1998. ISSN 0932-0113. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9766900> >.

MORRIS, D. et al. Glutathione and infection. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, p. 3329-49, 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23089304> >.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: enzyme activities of amastigotes and promastigotes and their inhibition by antimonials and arsenicals. **Exp Parasitol**, v. 59, n. 2, p. 151-60, Apr 1985.

ISSN 0014-4894. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2982638> >.

MOUS, K. et al. Expression analysis of LEDGF/p75, APOBEC3G, TRIM5alpha, and tetherin in a Senegalese cohort of HIV-1-exposed seronegative individuals. **PLoS One**, v. 7, n. 3, p. e33934, 2012. ISSN 1932-6203. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22479480> >.

MUKHERJEE, A. K. et al. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. **J Infect**, v. 61, p. 173-84, 2010. ISSN 1532-2742. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20546775> >.

MUKHERJEE, B. et al. Antimony-resistant but not antimony-sensitive Leishmania donovani up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, p. E575-82, 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341611> >.

MURRAY, C. J. et al. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2197-223, Dec 2012. ISSN 1474-547X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23245608> >.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-77, 2005 Oct 29-Nov 4 2005. ISSN 1474-547X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257344> >.

MURTA, S. M. et al. Differential gene expression in Trypanosoma cruzi populations susceptible and resistant to benznidazole. **Acta Trop**, v. 107, n. 1, p. 59-65, Jul 2008. ISSN 0001-706X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501872> >.

MUSA, A. et al. Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 6, p. e1674, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22724029> >.

MUSA, A. M. et al. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 10, p. e855, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21049063> >.

NEAL, R. A. et al. The sensitivity of Leishmania species to aminosidine. **J Antimicrob Chemother**, v. 35, n. 5, p. 577-84, May 1995. ISSN 0305-7453. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7592170> >.

OLLIARO, P. L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infect Dis**, v. 5, p. 763-74, 2005. ISSN 1473-3099. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310148> >.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of Trypanosoma cruzi: who is who? **Microbes Infect**, v. 14, n. 15, p. 1390-402, Dec 2012. ISSN 1769-714X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23006853> >.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resist Updat**, v. 7, n. 4-5, p. 257-66, 2004 Aug-Oct 2004. ISSN 1368-7646. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15533763> >.

PASCAL, L. E. et al. Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. **BMC Genomics**, v. 9, p. 246, 2008. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18501003> >.

PERDOMO, V. G. et al. Modulation of biotransformation systems and ABC transporters by benzimidazole in rats. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 10, p. 4894-902, Oct 2013. ISSN 1098-6596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23877690> >.

PERRY, M. R. et al. Chronic exposure to arsenic in drinking water can lead to resistance to antimonial drugs in a mouse model of visceral leishmaniasis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, p. 19932-7, 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24167266> >.

PIACENZA, L. et al. Trypanosoma cruzi antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. **Antioxid Redox Signal**, v. 19, p. 723-34, 2013.

ISSN 1557-7716. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22458250> >.

PLOEMEN, J. H. et al. Reversible conjugation of ethacrynic acid with glutathione and human glutathione S-transferase P1-1. **Cancer Res**, v. 54, n. 4, p. 915-9, Feb 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8313381> >.

POSTIGO, J. A. Leishmaniasis in the World Health Organization Eastern Mediterranean Region. **Int J Antimicrob Agents**, v. 36 Suppl 1, p. S62-5, Nov 2010. ISSN 1872-7913. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20728317> >.

RAHMAN, M. A.; HASEGAWA, H. High levels of inorganic arsenic in rice in areas where arsenic-contaminated water is used for irrigation and cooking. **Sci Total Environ**, v. 409, n. 22, p. 4645-55, Oct 2011. ISSN 1879-1026. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21899878> >.

RAIS, S. et al. Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 9, p. 2406-10, Sep 2000. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10952587> >.

RAJAGOPAL, A.; SIMON, S. M. Subcellular localization and activity of multidrug resistance proteins. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 8, p. 3389-99, Aug 2003. ISSN 1059-1524. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12925771> >.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochim Biophys Acta**, v. 1661, n. 2, p. 212-8, Mar 2004. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003884> >.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007. ISSN 1473-3099. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714672> >.

REVEIZ, L. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **PLoS One**, v. 8,

n. 4, p. e61843, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23637917> >.

REY, J. A. et al. Infectivity of the subspecies of the *Leishmania braziliensis* complex in vivo and in vitro. **Am J Trop Med Hyg**, v. 43, n. 6, p. 623-31, Dec 1990. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2267967> >.

RIGALLI, J. P. et al. Regulation of biotransformation systems and ABC transporters by benzimidazole in HepG2 cells: involvement of pregnane X-receptor. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1951, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23272261> >.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1234-9, Jun 1995. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7574507> >.

ROBERTS, W. L.; RAINEY, P. M. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n. 9, p. 1842-6, Sep 1993. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8239593> >.

ROJAS, R. et al. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (*Viannia*) infection. **J Infect Dis**, v. 193, p. 1375-83, 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16619185> >.

ROMERO, I. et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, 2010. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856851> >.

ROMERO, I. et al. Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in *Trypanosoma rangeli*. **Parasit Vectors**, v. 7, p. 197, 2014. ISSN 1756-3305. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24761813> >.

ROSEN, B. P. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 133, n. 3, p. 689-93, Nov 2002.

ISSN 1095-6433. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443926> >.

RUZZA, P. et al. Glutathione transferases as targets for cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 9, n. 7, p. 763-77, Sep 2009. ISSN 1875-5992. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538171> >.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annu Rev Microbiol**, v. 55, p. 453-83, 2001. ISSN 0066-4227. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11544364> >.

SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. et al. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. **J Antimicrob Chemother**, v. 64, n. 5, p. 993-1001, Nov 2009. ISSN 1460-2091. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19749205> >.

SALAÛN, P.; FRÉZARD, F. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. **Anal Bioanal Chem**, v. 405, n. 15, p. 5201-14, Jun 2013. ISSN 1618-2650. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23612869> >.

SALERNO, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Resistance to arsenic- and antimony-based drugs. **Bioinorg Chem Appl**, p. 189-98, 2003. ISSN 1565-3633. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18365053> >.

SANDERS, O. I. et al. Antimonite is accumulated by the glycerol facilitator GlpF in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 179, n. 10, p. 3365-7, May 1997. ISSN 0021-9193. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150238> >.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1755-66, Dec 2006. ISSN 0006-3002. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17034877> >.

SEIFERT, K. et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30,

p. 229-35, 2007. ISSN 0924-8579. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17628445> >.

SERENO, D. et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 12, p. 3097-102, Dec 1998. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9835497> >.

SERENO, D. et al. Experimental studies on the evolution of antimony-resistant phenotype during the in vitro life cycle of *Leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. **Acta Trop**, v. 80, p. 195-205, 2001. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700176> >.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Trop**, v. 74, p. 25-31, 2000. ISSN 0001-706X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10643904> >.

SERENO, D. et al. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2064-9, 2001. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408224> >.

SERENO, D. et al. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 1168-73, 2001. ISSN 0066-4804. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257031> >.

SHAKED-MISHAN, P. et al. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 6, p. 3971-6, Feb 2001. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11110784> >.

SINGH, N.; SINGH, R. T.; SUNDAR, S. Novel mechanism of drug resistance in kala azar field isolates. **J Infect Dis**, v. 188, p. 600-7, 2003. ISSN 0022-1899. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898450> >.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and Targeted Therapies in Treatment of Visceral Leishmaniasis: current status and future prospects.

Frontiers in Immunology, v. 5, n. 296, p. 1-9, 2014. Disponível em: < <http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2014.00296/full> >.

SINGH, S.; SUNDAR, S. Treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Int J Dermatol**, v. 34, n. 9, p. 668-9, Sep 1995. ISSN 0011-9059. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7591476> >.

STAUCH, A. et al. Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony-resistant *L. donovani* in Bihar, India. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 12, p. e1973, 2012. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23285309> >.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 27, p. 25120-32, Jul 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12707265> >.

SUNDAR, S. et al. Short-course paromomycin treatment of visceral leishmaniasis in India: 14-day vs 21-day treatment. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 6, p. 914-8, Sep 2009. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663597> >.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-94, May 2008. ISSN 1744-7658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18447603> >.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opin Pharmacother**, v. 14, n. 1, p. 53-63, Jan 2013. ISSN 1744-7666. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23256501> >.

SUNDAR, S. et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med**, v. 362, n. 6, p. 504-12, Feb 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147716> >.

SUNDAR, S. et al. Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 5, p. 556-61, Sep 2007. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17682988> >.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med**, v. 356, n. 25, p. 2571-81, Jun 2007. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582067> >.

SUNDAR, S. et al. Cure of antimony-unresponsive Indian post-kala-azar dermal leishmaniasis with oral miltefosine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n. 7, p. 698-700, Jul 2006. ISSN 0035-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16325873> >.

SUNDAR, S. et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, n. 4, p. 1104-7, Oct 2000. ISSN 1058-4838. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049798> >.

SUNDAR, S. et al. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, p. 193-6, 2001. ISSN 0002-9637. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11561703> >.

SUNDAR, S. et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 4, p. 543-50, Aug 2012. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573856> >.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, O. P. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **J Trop Med**, v. 2014, p. 646932, 2014. ISSN 1687-9686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24876851> >.

TROCHINE, A. et al. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 5, p. e2844, May 2014. ISSN 1935-2735. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24853684> >.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. **Free Radic Biol Med**, v. 51, p. 337-51, 2011. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21620959> >.

VEHMEYER, K. et al. Hexadecylphosphocholine-mediated enhancement of T-cell responses to interleukin 2. **Cell Immunol**, v. 137, n. 1, p. 232-8,

Oct 1991. ISSN 0008-8749. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1909215>>.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3010-5, Aug 2004. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15273114>>.

VERNHET, L. et al. Differential sensitivities of MRP1-overexpressing lung tumor cells to cytotoxic metals. **Toxicology**, v. 142, n. 2, p. 127-34, Jan 2000. ISSN 0300-483X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10685512>>.

VERNHET, L. et al. Overexpression of the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in human heavy metal-selected tumor cells. **FEBS Lett**, v. 443, n. 3, p. 321-5, Jan 1999. ISSN 0014-5793. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10025956>>.

VICKERS, T. J.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. **J Biol Chem**, v. 279, n. 26, p. 27246-56, Jun 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073172>>.

VILLARREAL, D. et al. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 7, p. 2701-9, Jul 2005. ISSN 0066-4804. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15980339>>.

VOLPINI, A. C. et al. PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop**, v. 90, n. 1, p. 31-7, Mar 2004. ISSN 0001-706X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14739020>>.

WAHL, L. M. et al. Isolation of human monocyte populations. **Curr Protoc Immunol**, v. Chapter 7, p. Unit 7.6A, 2006. ISSN 1934-368X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18432977>>.

WHO. Leishmaniasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>, 2014. Acesso em: August.

WILKINSON, S. R. et al. Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n.

16, p. 2072-84, 2011. ISSN 1873-4294. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21619510> >.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 13, p. 5022-7, Apr 2008. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367671> >.

Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases – Summary. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 86, n. 13, p. 113-20, Mar 2011. ISSN 0049-8114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21438440> >.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M.; FAIRLAMB, A. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 279, n. 38, p. 39925-32, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15252045 >.

WYLLIE, S.; FAIRLAMB, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 3, p. 257-67, Jan 2006. ISSN 0006-2952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16318845> >.

WYSOCKI, R. et al. The glycerol channel Fps1p mediates the uptake of arsenite and antimonite in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Microbiol**, v. 40, n. 6, p. 1391-401, Jun 2001. ISSN 0950-382X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11442837> >.

YAN, S.; JIN, L.; SUN, H. 51Sb Antimony in Medicine. In: (Ed.). **Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents**: John Wiley & Sons, Ltd, 2005. p.441-461. ISBN 9780470864050.

YAN, S. et al. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. **J Biol Inorg Chem**, v. 8, p. 689-97, 2003. ISSN 0949-8257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12827457> >.

YARDLEY, V. et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? **J Infect Dis**, v.

194, p. 1168-75, 2006. ISSN 0022-1899. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16991093>>.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C. et al. In vitro sensitivity of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Trop Med Int Health**, v. 15, n. 1, p. 68-76, Jan 2010. ISSN 1365-3156. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874570>>.

ZHANG, F. et al. Characterization of ABCB9, an ATP binding cassette protein associated with lysosomes. **J Biol Chem**, v. 275, n. 30, p. 23287-94, Jul 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10748049>>.

ZHOU, Y. et al. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **J Biol Chem**, v. 279, n. 36, p. 37445-51, Sep 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220340>>.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 87-98, Feb 2003. ISSN 1473-3099. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12560194>>.

9 MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 Triagem de voluntários sadios para a obtenção de MDM de humanos

Código	TCLE	Fenótipo			PCR	Amostra para estudo
		Hemograma	MDM	Infecção	<i>Leishmania</i>	
001	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Não
002	Sim	Normal	Não	NR	NR	Não
003	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Não
004	Sim	Normal	Não	NR	NR	Não
005	Sim	Normal	Não	NR	Neg	Não
006	Sim	Normal	Não	NR	Neg	Não
007	Sim	Normal	Não	NR	Neg	Não
008	Sim	Normal	Não	NR	Neg	Não
009	Sim	Normal	Não	NR	Neg	Não
010	Sim	Normal	Sim	NR	Neg	Não
011	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Sim
012	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Sim
013	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Sim
014	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Sim
015	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Não
016	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Sim
017	Sim	Normal	Não	Não	NR	Não
018	Sim	Normal	Não	Não	NR	Não
019	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Não
020	Sim	Normal	Sim	Sim	Neg	Não

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, MDM: Diferenciação a macrófagos derivados de monócitos, NR: Não realizado, Neg: Negativo.

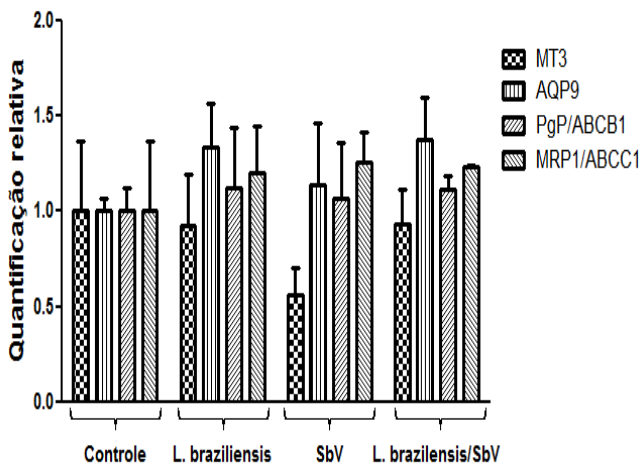


Figura S1. Expressão dos genes *mt3*, *aqp9*, *pgp* e *mrp1* em macrófagos humanos. Os valores representam as médias \pm erro padrão da média de três repetições, cada uma com três replicatas. A quantificação relativa foi estimada pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ usando o gene GAPDH como gene normalizador.

Tabela S2. Agrupamento funcional da matriz de Estresse Oxidativo.

DEFESA ANTIOXIDANTE		Outros genes envolvidos no metabolismo de Superóxidos:		Genes de resposta a Estresse Oxidativo:	
	Glutathione Peroxidasas (GPx)	<i>alox12</i>	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase</i>	<i>mb12</i>	<i>Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble</i>
<i>gpx1</i>	<i>Glutathione peroxidase 1</i>	<i>ccs</i>	<i>Copper chaperone for superoxide dismutase</i>	<i>mpo</i>	<i>Myeloperoxidase</i>
<i>gpx2</i>	<i>Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)</i>	<i>duox1</i>	<i>Dual oxidase 1</i>	<i>msra</i>	<i>Methionine sulfoxide reductase A</i>
<i>gpx3</i>	<i>Glutathione peroxidase 3 (plasma)</i>	<i>duox2</i>	<i>Dual oxidase 2</i>	<i>nqo1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>
<i>gpx4</i>	<i>Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)</i>	<i>gf2i</i>	<i>General transcription factor Iii</i>	<i>nud1</i>	<i>Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1</i>
<i>gpx5</i>	<i>Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)</i>	<i>mi3</i>	<i>Metallothionein 3</i>	<i>oxr1</i>	<i>Oxidation resistance 1</i>
<i>gpx6</i>	<i>Glutathione peroxidase 6 (olfactory)</i>	<i>ncf1</i>	<i>Neutrophil cytosolic factor 1</i>	<i>oxsr1</i>	<i>Oxidative-stress responsive 1</i>
<i>gpx7</i>	<i>Glutathione peroxidase 7</i>	<i>ncf2</i>	<i>Neutrophil cytosolic factor 2</i>	<i>pdlim1</i>	<i>PDZ and LIM domain 1</i>
<i>gstp1</i>	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>	<i>nos2 (imos)</i>	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>	<i>pnkp</i>	<i>Polynucleotide kinase 3'-phosphatase</i>
<i>gstz1</i>	<i>Glutathione transferase zeta 1</i>	<i>nox4</i>	<i>NADPH oxidase 4</i>	<i>prdx2</i>	<i>Peroxiredoxin 2</i>
	Peroxiredoximas (TPx):	<i>nox5</i>	<i>NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5</i>	<i>prdx5</i>	<i>Peroxiredoxin 5</i>

<i>prdx1</i>	<i>Peroxiredoxin 1</i>	<i>prdx1</i>	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate-dependent Rac exchanging factor 1</i>	<i>prdx6 (aop2)</i>	<i>Peroxiredoxin 6</i>	
<i>prdx2</i>	<i>Peroxiredoxin 2</i>	<i>ucp2</i>	<i>Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)</i>	<i>prnp</i>	<i>Prion protein</i>	
<i>prdx3</i>	<i>Peroxiredoxin 3</i>	Outros genes envolvidos no metabolismo de ROS:			<i>rng7</i>	<i>Ring finger protein 7</i>
<i>prdx4</i>	<i>Peroxiredoxin 4</i>	<i>atox1</i>	<i>Aldehyde oxidase 1</i>	<i>scara3</i>	<i>Scavenger receptor class A, member 3</i>	
<i>prdx5</i>	<i>Peroxiredoxin 5</i>	<i>bnip3</i>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>	<i>sels</i>	<i>Selenoprotein S</i>	
<i>prdx6 (aop2)</i>	<i>Peroxiredoxin 6</i>	<i>ephx2</i>	<i>Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic</i>	<i>sepl1</i>	<i>Selenoprotein P, plasma, 1</i>	
Outras Peroxidasas:		<i>mpv17</i>	<i>MpV17 mitochondrial inner membrane protein</i>	<i>sirt2</i>	<i>Sirtuin 2</i>	
<i>Cat</i>	<i>Catalase</i>	<i>Sfipd</i>	<i>Surfactant protein D</i>	<i>sod1</i>	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>	
<i>cybb</i>	<i>Cytochrome b-245, beta polypeptide</i>	Genes de resposta a Estresse Oxidativo:			<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	
<i>cygb</i>	<i>Cytoglobin</i>	<i>apoe</i>	<i>Apolipoprotein E</i>	<i>sqstm1</i>	<i>Sequestosome 1</i>	
<i>duox1</i>	<i>Dual oxidase 1</i>	<i>atox1</i>	<i>ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)</i>	<i>srxn1</i>	<i>Sulfiredoxin 1</i>	
Outras Peroxidasas:		Genes de resposta a Estresse Oxidativo:			Genes de resposta a Estresse Oxidativo :	

<i>epx</i>	Eosinophil peroxidase	<i>ccl5</i> (<i>rantes</i>)	Chemokine (C-C motif) ligand 5	<i>tpo</i>	Thyroid peroxidase
<i>lpo</i>	Lactoperoxidase	<i>cygb</i>	Cytoglobin	<i>tnn</i>	Titin
<i>mgxt3</i>	3 Microsomal glutathione S-transferase	<i>dhcr24</i>	24-dehydrocholesterol reductase	<i>trx</i>	Thioredoxin
<i>mpo</i>	Myeloperoxidase	<i>duox1</i>	Dual oxidase 1	<i>txnrd1</i>	Thioredoxin reductase 1
<i>ptgs1</i>	1 Prostaglandin-endoperoxide synthase cyclooxygenase)	<i>duox2</i>	Dual oxidase 2	<i>txnrd2</i>	Thioredoxin reductase 2
<i>ptgs2</i> (<i>cox2</i>)	2 Prostaglandin-endoperoxide synthase (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	<i>dup1</i> (<i>ptpn16</i>)	Dual specificity phosphatase 1	Transportadores de oxigênio:	
<i>pxdn</i>	Peroxidasin homolog (<i>Drosophila</i>)	<i>epx</i>	Eosinophil peroxidase	<i>cygb</i>	Cytoglobin
<i>tpo</i>	Thyroid peroxidase	<i>foxm1</i>	Forkhead box M1	<i>mb</i>	Myoglobin
<i>tnn</i>	Titin	<i>fh1</i>	Ferritin, heavy polypeptide 1	Genes de referencia:	
<i>alb</i>	Albumin	<i>gclc</i>	Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	<i>actb</i>	Actin, beta
<i>apoe</i>	Apolipoprotein E	<i>gclm</i>	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	<i>b2m</i>	Beta-2-microglobulin
<i>gsr</i>	Glutathione reductase	<i>gpx1</i>	Glutathione peroxidase 1	<i>gapdh</i>	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase
		<i>gpx2</i>	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	<i>hprt1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1

<i>mt3</i>	<i>Metallothionein 3</i>	<i>gpx3</i>	<i>Glutathione peroxidase 3 (plasma)</i>	<i>rplp0</i>	<i>Ribosomal protein, large, P0</i>
<i>sels</i>	<i>Selenoprotein S</i>	<i>gpx4</i>	<i>Glutathione peroxidase 4 (phospholipid hydroperoxidase)</i>		
<i>srxn1</i>	<i>Sulfiredoxin 1</i>	<i>gpx5</i>	<i>Glutathione peroxidase 5 (epididymal androgen-related protein)</i>		
<i>txnrd1</i>	<i>Thioredoxin reductase 1</i>	<i>gpx6</i>	<i>Glutathione peroxidase 6 (olfactory)</i>		
<i>txnrd2</i>	<i>Thioredoxin reductase 2</i>	<i>gpx7</i>	<i>Glutathione peroxidase 7</i>		
GENES ENVOLVIDOS NO METABOLISMO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)					
Superoxido Dismutases (SOD):					
<i>sod1</i>	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>	<i>hmxo1</i>	<i>Glutathione reductase</i>		
<i>sod2</i>	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	<i>hspal a</i>	<i>Glutathione synthetase</i>		
<i>sod3</i>	<i>Superoxide dismutase 3, extracellular</i>	<i>krt1</i>	<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>		
		<i>lpo</i>	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>		
			<i>Keratin 1</i>		
			<i>Lactoperoxidase</i>		

Tabela S3. Agrupamento funcional da matriz de transportadores de fármacos.

Transportadores ABC:		Transportadores SLC:		Transportadores SLC:	
<i>abca1</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	<i>slc2a1</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	<i>slc7a7</i>	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 6
<i>abca2</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	<i>slc2a2</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2	<i>slc7a8</i>	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7
<i>abca3</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	<i>slc2a3</i>	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3	<i>slc7a9</i>	Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8
<i>abca4</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	<i>slc3a1</i>	Solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1	<i>slc7a11</i>	Solute carrier family 7 (glycoprotein-associated amino acid transporter light chain, bo,+ system), member 9
<i>abca5</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 5	<i>slc3a2</i>	Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	<i>slco1a2</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2
<i>abca9</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	<i>slc10a1</i>	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	<i>slco1b1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1
<i>abca12</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	<i>slc10a2</i>	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2	<i>slco1b3</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3

<i>abca13</i>	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 13	<i>slc15a1</i>	Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	<i>slco2a1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1
<i>abcb1 (mdr1)</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	<i>slc15a2</i>	Solute carrier family 15 (H+-peptide transporter), member 2	<i>slco2b1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 2B1
<i>abcb4</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	<i>slc16a1</i>	Solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	<i>slco3a1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 3A1
<i>abcb5</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	<i>slc16a2</i>	Solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	<i>slco4a1</i>	Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1
<i>abcb6</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	<i>slc16a3</i>	Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	Outros Transportadores: H+-ATPase Vacuolar:	
<i>abcb11 (bsep)</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	<i>slc19a1</i>	Solute carrier family 19 (folate transporter), member 1		
<i>abcc1 (mrp1)</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	<i>slc19a2</i>	Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c	
<i>abcc2 (mrp2)</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10	<i>slc19a3</i>	Solute carrier family 19, member 3	Transportadores ABC:	
<i>abcc3 (mrp3)</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11	<i>slc22a1 (oct1)</i>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1		
<i>abcc4</i>	ATP-binding cassette, sub-family C	<i>slc22a2</i>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	Transportadores SLC:	
				<i>atp7a</i>	<i>Bombas de cobre:</i> ATPase, Cu++ transporting,

	(CFTR/MRP), member 12	cation transporter), member 2	alpha polypeptide
<i>abcc5</i> (<i>mnp5</i>)	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	Solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide <i>atp7b</i>
<i>abcc10</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	Aquaporinas:
<i>abcc11</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7	<i>Aquaporin 1</i> (Colton blood group)
<i>abcc12</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	<i>aqp1</i>
<i>abcd1</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 9	<i>aqp7</i>
<i>abcd3</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	Solute carrier family 25, member 13 (citrin)	<i>aqp9</i>
<i>abcd4</i>	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1	Proteina principal Vault:
<i>abcf1</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2	<i>mvp (lrp)</i> Major vault protein
<i>abcg2</i> (<i>bcrp</i>)	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	Canais de ânions voltagem-dependentes:
<i>abcg8</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1	<i>vdac1</i> Voltage-dependent anion channel 1
			<i>vdac2</i> Voltage-dependent anion channel 2

			Genes de referencia
<i>tap1</i> (<i>abc2</i>)	Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	<i>slc29a2</i>	<i>Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2</i>
<i>tap2</i> (<i>abc3</i>)	Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	<i>slc31a1</i> <i>slc38a2</i>	<i>Solute carrier family 31 (copper transporters), member 1</i> <i>Solute carrier family 38, member 2</i>
		<i>slc38a5</i>	<i>Solute carrier family 38, member 5</i>
		<i>slc5a1</i>	<i>Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1</i>
		<i>slc5a4</i>	<i>Solute carrier family 5 (low affinity glucose cotransporter), member 4</i>
		<i>slc7a5</i>	<i>Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member 11</i>
		<i>slc7a6</i>	<i>Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5</i>
			<i>actb</i>
			<i>b2m</i>
			<i>gapdh</i>
			<i>hprt1</i>
			<i>rplp0</i>
			<i>actin, beta</i>
			<i>Beta-2-microglobulin</i>
			<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
			<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
			<i>Ribosomal protein, large, P0</i>

Tabela S4 Sequências dos siRNA de genes envolvidos na defesa antioxidante para fazer as análises de inibição em macrofagos humanos

Nome siRNA	Gene	Abreviatur a do gene	Sequencia 5'-3' alvo	Fita senso 5'-3'	Fita antisenso 5'-3'
HsACTB6	NM_001101	<i>actb</i>	CGCCGGCTCGTCGTGACAA	CCGGCGUCGUCGACAAATT	UUGUGACGACGAGCGCGGGC
HsTRX_1	NM_003329	<i>trx</i>	CACCAITTAATGAATAATTAGTCTA	CCAUUAAUGAAUUAGUCUAATT	UAGACUAAUUCAUUUAAUUGGTG
HsTRX_2	NM_003329	<i>trx</i>	AACCAGCCATTGGCTATTTAA	CCAGCCAUUGGCUAUUUAAATT	UUAAAAGCCA AUGGCUUGGTT
HsTRX_3	NM_003329	<i>trx</i>	TGCCATCTGCGTGACAATAAAA	CCAUUCUGGUGACAAUAAAATT	UUUAAUUGUCACGCAGAUUGGCA
HsGSTP1_1	NM_000852	<i>gstp1</i>	AAGGATGACTATGTGAAAGGCA	GGAUAGACU AUGUGAAGGCATT	UGCCUUCACAUAGUC AUCCTT
HsGSTP1_2	NM_000852	<i>gstp1</i>	CCAGATCTCTTCGCTGACTA	AGAUUCUUCGUGACUAATT	UAGUCAGCGAAGGAGAUUCUGG
HsGSTP1_7	NM_000852	<i>gstp1</i>	CCCATCAATGGCAACGGGAAA	CAUCAUUGGCAACGGGAAAATT	UUUCCCGUUGCCAUUGAUUGG
HsGSS_1	NM_000178	<i>Gss</i>	TCCGAGCAACATTTGAAGATA	CGAGGAACAUUUGAAGAUATT	UAUCUUCAAAAUGUUCGUCGGA
HsGSS_2	NM_000178	<i>Gss</i>	CTGTGTCTACTGATTGCTCAA	GGUGCUACUGAUUGCUCAAATT	UUGAGCAUUCAGUAGCACCCAG
HsGSS_8	NM_000178	<i>Gss</i>	TTGGGATAGGACTGAGTGGTA	GGGAUAGGACUGAGUUGUAATT	UACCACUCAGUCCU AUCCCAA
HsABCb5_9	NM_178559	<i>abc b5</i>	TTTGATGTTCTGTGTAATGCAA	UGAUGUUCGUGUAAUUGCAATT	UUGCAUUACACGAACAUCAAA
HsABCb5_12	NM_178559	<i>abc b5</i>	GAGAAATGCATCAGAGCTTTA	GAUAGCAUCAGAGCUUUATT	UAAAGCUCUGAUGUCAUUCTC
HsABCb5_14	NM_178559	<i>abc b5</i>	CAGAGGTTATATGATCCGGAT	GAGGUUAU AUGAAACCGGAUTT	AUCCGGAUCAUUAUAAACCUCTG
Controle Negativo Allstars AF 488	Não Aplica	DS siRNA sequência controle	Não Aplica	Propriedade QIAGEN	Propriedade QIAGEN

Tabela S5. Iniciadores usados para confirmar o *knockdown* da expressão dos genes inibidos.

Gene	Número de		Posição de referência [†]	Tamanho da banda (pb)
	acesso Refseq	Catalogo No:		
<i>gstp1</i>	NM_000852	PPH00318F	861	155
<i>Gss</i>	NM_000178	PPH005767A	1412	111
<i>Trx</i>	NM_003329	PPH18986C	202	52
<i>abcb5</i>	NM_178559	PPH16752C	696	87
Genes de Referência				
<i>β-actin</i>	NM_001101	PPH00073G	730	174
<i>gapdh</i> [*]	NM_002046	PPH00150F	828	130

[†] A posição de referência é uma posição contida dentro da sequência do fragmento amplificado em relação ao início da sequência RefSeq

* Gene de referência usado para normalizar os dados β -Actin^{KD}

Tabela S6 Modulação dos níveis de expressão gênica de genes de estresse oxidativo em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis*, tratados com Glucantime® (Sb^V) ou em ambas as condições^a

Refseq	Abreviatura	Descrição do transportador de fármacos	Mudança nos níveis de expressão		
			<i>L. braziliensis</i>	Sb ^V	<i>L. braziliensis</i> /Sb ^V
NM_000477	<i>alb</i>	<i>Albumin</i>	1.48	1.70	2.42
NM_000697	<i>alox12</i>	<i>Arachidonate 12-lipoxygenase</i>	2.08	-1.05	3.64
NM_001159	<i>aox1</i>	<i>Aldehyde oxidase 1</i>	-1.05	1.02	1.20
NM_000041	<i>apoe</i>	<i>Apolipoprotein E</i>	2.79	6.46	5.82
NM_004045	<i>atox1</i>	<i>ATX1 antioxidant protein 1 homolog (yeast)</i>	3.62	4.42	4.10
NM_004052	<i>bnip3</i>	<i>BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3</i>	4.60	6.61	4.99
NM_001752	<i>cat</i>	<i>Catalase</i>	3.36	8.10	5.03
NM_002985	<i>ccl5</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 5</i>	1.53	1.71	1.36
NM_005125	<i>ccs</i>	<i>Copper chaperone for superoxide dismutase</i>	1.95	3.55	2.07
NM_000397	<i>cybb</i>	<i>Cytochrome b-245, beta polypeptide</i>	2.86	3.34	1.39
NM_134268	<i>cygb</i>	<i>Cytoglobin</i>	3.18	6.32	5.14
NM_014762	<i>dhcr24</i>	<i>24-dehydrocholesterol reductase</i>	1.28	1.33	1.20
NM_175940	<i>duox1</i>	<i>Dual oxidase 1</i>	-1.30	-1.59	1.53
NM_014080	<i>duox2</i>	<i>Dual oxidase 2</i>	-2.46	-1.35	-1.77
NM_004417	<i>dusp1</i>	<i>Dual specificity phosphatase 1</i>	2.19	1.79	2.50
NM_001979	<i>ephx2</i>	<i>Epoxide hydrolase 2, cytoplasmic</i>	-1.03	1.74	-1.14

NM_000502	<i>epx</i>	<i>Eosinophilperoxidase</i>	1.23	2.93	2.46
NM_021953	<i>foxm1</i>	<i>Forkhead box M1</i>	2.14	3.52	2.50
NM_002032	<i>fth1</i>	<i>Ferritin, heavy polypeptide 1</i>	5.92	8.45	4.31
NM_001498	<i>gclc</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase, catalyticsubunit</i>	1.37	1.84	-1.31
NM_002061	<i>gclm</i>	<i>Glutamate-cysteine ligase, modifiersubunit</i>	2.30	9.74	2.08
NM_000581	<i>gpx1</i>	<i>Glutathioneperoxidase 1</i>	1.61	1.50	1.41
NM_002083	<i>gpx2</i>	<i>Glutathioneperoxidase 2 (gastrointestinal)</i>	3.23	3.06	5.58
NM_002084	<i>gpx3</i>	<i>Glutathioneperoxidase 3 (plasma)</i>	1.76	1.39	3.06
NM_002085	<i>gpx4</i>	<i>Glutathioneperoxidase 4 (phospholipidhydroperoxidase)</i>	2.28	2.54	5.51
NM_001509	<i>gpx5</i>	<i>Glutathioneperoxidase 5 (epididymalandrogen-relatedprotein)</i>	-2.85	-3.00	-2.60
NM_182701	<i>gpx6</i>	<i>Glutathioneperoxidase 6 (olfactory)</i>	-2.87	-2.83	-2.79
NM_015696	<i>gpx7</i>	<i>Glutathioneperoxidase 7</i>	2.08	2.81	2.53
NM_000637	<i>gsr</i>	<i>Glutathionereductase</i>	1.83	5.54	6.31
NM_000178	<i>gss</i>	<i>Glutathionesynthetase</i>	1.44	2.99	3.38
NM_000852	<i>gstp1</i>	<i>Glutathione S-transferase pi 1</i>	3.46	8.70	15.98
NM_001513	<i>gstz1</i>	<i>Glutathionetransferase zeta 1</i>	1.16	2.98	2.21
NM_001518	<i>gtf2i</i>	<i>General transcription factor Iii</i>	1.03	3.28	2.31
NM_002133	<i>hmxo1</i>	<i>Heme oxygenase (decycling) 1</i>	1.47	9.99	6.37
NM_005345	<i>hspa1a</i>	<i>Heat shock 70kDa protein 1A</i>	1.35	4.41	2.10

NM_006121	<i>krt1</i>	<i>Keratin 1</i>	1.62	1.60	2.02
NM_006151	<i>lpo</i>	<i>Lactoperoxidase</i>	1.16	2.61	2.71
NM_005368	<i>mb</i>	<i>Myoglobin</i>	-4.23	-3.96	-1.38
NM_000242	<i>mb12</i>	<i>Mannose-binding lectin (protein C) 2, soluble</i>	-3.33	-2.38	-2.91
NM_004528	<i>mgst3</i>	<i>Microsomalglutathione S-transferase 3</i>	1.53	1.42	2.69
NM_000250	<i>mpo</i>	<i>Myeloperoxidase</i>	-1.06	1.14	2.29
NM_002437	<i>mpv17</i>	<i>Mpv17 mitochondrialinnermembraneprotein</i>	1.17	1.23	1.60
NM_012331	<i>msra</i>	<i>Methioninesulfoxidoreductase A</i>	-1.26	1.16	1.07
NM_005954	<i>mt3</i>	<i>Metallothionein 3</i>	1.64	-1.81	-1.42
NM_000265	<i>ncf1</i>	<i>Neutrophilcytosolic factor 1</i>	1.29	1.31	1.26
NM_000433	<i>ncf2</i>	<i>Neutrophilcytosolic factor 2</i>	1.18	3.16	2.80
NM_000625	<i>nos2</i>	<i>Nitric oxide synthase 2, inducible</i>	1.15	-1.76	1.44
NM_016931	<i>nox4</i>	<i>NADPH oxidase 4</i>	1.00	1.43	1.25
NM_024505	<i>nox5</i>	<i>NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5</i>	-1.61	-1.28	-1.00
NM_000903	<i>nqo1</i>	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>	-3.37	1.37	3.30
NM_002452	<i>nudt1</i>	<i>Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1</i>	1.18	1.29	1.36
NM_181354	<i>oxr1</i>	<i>Oxidationresistance 1</i>	1.49	1.59	2.33
NM_005109	<i>oxsr1</i>	<i>Oxidative-stress responsive 1</i>	-1.04	1.20	2.01
NM_020992	<i>pdlim1</i>	<i>PDZ and LIM domain 1</i>	-1.27	1.17	1.52
NM_007254	<i>pnkp</i>	<i>Polynucleotidokinase 3'-phosphatase</i>	-1.09	1.70	1.53
NM_002574	<i>prdx1</i>	<i>Peroxiredoxin 1</i>	1.07	1.50	1.84

NM_005809	<i>prdx2</i>	<i>Peroxiredoxin 2</i>	1.42	2.35	1.90
NM_006793	<i>prdx3</i>	<i>Peroxiredoxin 3</i>	1.13	2.27	1.63
NM_006406	<i>prdx4</i>	<i>Peroxiredoxin 4</i>	1.40	2.53	1.84
NM_181652	<i>prdx5</i>	<i>Peroxiredoxin 5</i>	1.38	2.59	2.28
NM_004905	<i>prdx6</i>	<i>Peroxiredoxin 6</i>	1.03	1.78	2.49
NM_020820	<i>prex1</i>	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate dependent Rac exchange factor 1</i>	-1.05	1.02	1.45
NM_183079	<i>pmp</i>	<i>Prion protein</i>	-1.42	-1.28	-1.04
NM_000962	<i>ptgs1</i>	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	-1.47	-1.11	1.11
NM_000963	<i>ptgs2</i>	<i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)</i>	-3.15	-1.66	-1.92
NM_012293	<i>pxdn</i>	<i>Peroxidasin homolog (Drosophila)</i>	1.25	-1.32	-1.32
NM_014245	<i>rnf7</i>	<i>Ring finger protein 7</i>	-1.27	1.35	-1.20
NM_182826	<i>scara3</i>	<i>Scavenger receptor class A, member 3</i>	2.17	2.46	1.23
NM_203472	<i>sels</i>	<i>Selenoprotein S</i>	1.13	2.43	1.26
NM_005410	<i>sepp1</i>	<i>Selenoprotein P, plasma, 1</i>	-1.37	-3.79	-1.40
NM_003019	<i>sfpd</i>	<i>Surfactant protein D</i>	-1.10	-2.14	2.49
NM_012237	<i>sirt2</i>	<i>Sirtuin 2</i>	1.63	2.53	2.68
NM_000454	<i>sod1</i>	<i>Superoxide dismutase 1, soluble</i>	1.34	1.92	1.93
NM_000636	<i>sod2</i>	<i>Superoxide dismutase 2, mitochondrial</i>	-1.33	-1.32	1.07

NM_003102	<i>sod3</i>	<i>Superoxidedismutase 3, extracelular</i>	-5.62	-1.40	-2.58
NM_003900	<i>sqstm1</i>	<i>Sequestosome 1</i>	-2.37	1.37	4.64
NM_080725	<i>srxn1</i>	<i>Sulfiredoxin 1</i>	-1.90	1.87	2.26
NM_006374	<i>stk25</i>	<i>Serine/threoninekinase 25</i>	-1.29	2.28	1.13
NM_000547	<i>tpo</i>	<i>Thyroidperoxidase</i>	1.81	2.30	1.43
NM_003319	<i>ttin</i>	<i>Titin</i>	1.39	2.20	1.28
NM_003329	<i>trx</i>	<i>Thioredoxin</i>	-1.23	3.66	6.63
NM_003330	<i>txnrd1</i>	<i>Thioredoxinreductase 1</i>	-1.10	-11.09	1.82
NM_006440	<i>txnrd2</i>	<i>Thioredoxinreductase 2</i>	1.68	2.92	2.73
NM_003355	<i>ucp2</i>	<i>Uncoupling protein 2 (mitochondrial, proton carrier)</i>	2.44	6.68	5.07

^aA modulação da expressão de genes do estresse oxidativo utilizando o sistema de *RT²Humanoxidative stress PCR expressionarrayanalysis (QIAGEN)*. Os dados em vermelho indicam os genes sendo superexpressos >3 vezes com relação a o grupo controle. Os valores em azul correspondem a genes regulados negativamente <3 vezes com relação ao grupo controle

Tabela S7. Modulação dos níveis de expressão gênica de genes transportadores de fármacos em MDM de humanos infectados com *L. braziliensis*, tratados com Glucantime® (Sb^V) ou em ambas as condições^a.

Refseq	Símbolo	Descrição do transportador de fármacos	Cambio nos níveis de expressão		
			<i>L. braziliensis</i>	Sb ^V	<i>L. braziliensis</i> /Sb ^V
NM_005502	<i>abca1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 1</i>	2.79	-1.22	6.07
NM_173076	<i>abca12</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 12</i>	1.21	1.44	1.51
NM_152701	<i>abca13</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 13</i>	1.66	2.03	2.54
NM_001606	<i>abca2</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 2</i>	1.27	2.19	4.97
NM_001089	<i>abca3</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 3</i>	1.29	1.51	2.38
NM_000350	<i>abca4</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 4</i>	1.23	1.52	2.22
NM_018672	<i>abca5</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 5</i>	1.52	-2.02	1.32
NM_080283	<i>abca9</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family A (ABCI), member 9</i>	1.76	1.56	2.57
NM_000927	<i>abcb1/pg</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family B</i>	1.07	-1.19	1.34

pI (MDR/TAP), member 1

NM_003742	<i>abcb11/b</i> <i>sep</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	1.83	9.58	5.25
NM_000443	<i>abcb4</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	1.75	1.41	1.38
NM_178559	<i>abcb5</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	17.06	8.85	13.90
NM_005689	<i>abcb6</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	3.39	4.80	10.12
NM_004996	<i>abcc1</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	1.05	1.16	2.14
NM_033450	<i>abcc10</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10	-2.08	-1.47	1.70
NM_032583	<i>abcc11</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11	-2.61	2.07	3.18
NM_033226	<i>abcc12</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 12	1.62	3.64	2.95
NM_000392	<i>abcc2</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	1.09	1.12	2.34
NM_003786	<i>abcc3</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	1.15	1.12	1.82
NM_005845	<i>abcc4</i>	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	-1.02	1.03	1.76

NM_005688	<i>abcc5</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5</i>	1.47	1.43	2.95
NM_000033	<i>abcd1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1</i>	-1.08	2.18	1.73
NM_002858	<i>abcd3</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3</i>	1.79	1.73	1.95
NM_005050	<i>abcd4</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4</i>	19.75	3.52	2.39
NM_001090	<i>abcf1</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1</i>	2.72	-1.01	2.75
NM_004827	<i>abcg2/bcrp</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2</i>	-1.23	1.36	2.26
NM_022437	<i>abcg8</i>	<i>ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8</i>	-2.32	-1.53	-1.32
NM_198098	<i>aqp1</i>	<i>Aquaporin 1 (Coltonbloodgroup)</i>	2.00	3.77	4.80
NM_001170	<i>aqp7</i>	<i>Aquaporin 7</i>	1.66	2.62	4.55
NM_020980	<i>aqp9</i>	<i>Aquaporin 9</i>	1.03	1.45	1.70
NM_001694	<i>atp6v0c</i>	<i>ATPase, H+ transporting, lysosomal 16kDa, V0 subunit c</i>	-1.06	-1.22	1.35
NM_000052	<i>atp7a</i>	<i>ATPase, Cu++ transporting, alpha polypeptide</i>	-1.33	-1.15	1.21
NM_000053	<i>atp7b</i>	<i>ATPase, Cu++ transporting, beta polypeptide</i>	-1.03	2.26	2.25

NM_017458	<i>mvp</i>	Major vault protein	-1.06	1.64	1.93
NM_003049	<i>slc10a1</i>	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 1	2.23	1.19	4.36
NM_000452	<i>slc10a2</i>	Solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 2	1.02	4.66	3.31
NM_005073	<i>slc15a1</i>	Solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1	-1.36	2.47	2.46
NM_021082	<i>slc15a2</i>	Solute carrier family 15 (H ⁺ /peptide transporter), member 2	-1.42	1.59	1.63
NM_003051	<i>slc16a1</i>	Solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)	-1.34	-1.06	1.39
NM_006517	<i>slc16a2</i>	Solute carrier family 16, member 2 (monocarboxylic acid transporter 8)	1.13	1.36	1.81
NM_004207	<i>slc16a3</i>	Solute carrier family 16, member 3 (monocarboxylic acid transporter 4)	-1.12	2.51	3.24
NM_194255	<i>slc19a1</i>	Solute carrier family 19 (folate transporter), member 1	-1.14	1.28	1.48
NM_006996	<i>slc19a2</i>	Solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	1.30	2.92	2.05
NM_025243	<i>slc19a3</i>	Solute carrier family 19, member 3	1.07	1.98	1.73
NM_003057	<i>slc22a1/ot1</i>	Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	2.56	1.57	4.60

NM_003058	<i>slc22a2/oc2</i>	<i>Solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2</i>	-1.05	-1.04	1.13
NM_021977	<i>slc22a3</i>	<i>Solute carrier family 22 (extraneuronal monoamine transporter), member 3</i>	1.14	1.81	1.90
NM_004790	<i>slc22a6</i>	<i>Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6</i>	1.43	1.93	3.07
NM_006672	<i>slc22a7</i>	<i>Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7</i>	-1.42	-1.07	1.83
NM_004254	<i>slc22a8</i>	<i>Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8</i>	-1.26	1.41	2.66
NM_080866	<i>slc22a9</i>	<i>Solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 9</i>	1.15	1.94	2.49
NM_014251	<i>slc25a13</i>	<i>Solute carrier family 25, member 13 (citrin)</i>	1.06	1.29	1.59
NM_004213	<i>slc28a1</i>	<i>Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 1</i>	1.73	1.98	5.12
NM_004212	<i>slc28a2</i>	<i>Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 2</i>	-1.64	-1.27	-1.17
NM_022127	<i>slc28a3</i>	<i>Solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3</i>	-1.65	-1.20	-1.30
NM_004955	<i>slc29a1</i>	<i>Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 1</i>	1.10	1.48	1.80
NM_001532	<i>slc29a2</i>	<i>Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 2</i>	1.02	2.36	2.26

		<i>transporters), member 2</i>			
NM_006516	<i>slc2a1</i>	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i>	1.95	1.50	2.29
NM_000340	<i>slc2a2</i>	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 2</i>	-1.14	1.57	2.08
NM_006931	<i>slc2a3</i>	<i>Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 3</i>	-1.15	1.20	1.53
NM_001859	<i>slc31a1</i>	<i>Solute carrier family 31 (copper transporters), member 1</i>	-1.46	1.48	1.69
NM_018976	<i>slc38a2</i>	<i>Solute carrier family 38, member 2</i>	-1.35	-1.01	-1.14
NM_033518	<i>slc38a5</i>	<i>Solute carrier family 38, member 5</i>	1.15	1.22	1.80
NM_000341	<i>slc3a1</i>	<i>Solute carrier family 3 (cystine, dibasic and neutral amino acid transporters, activator of cystine, dibasic and neutral amino acid transport), member 1</i>	-1.59	-1.05	1.06
NM_002394	<i>slc3a2</i>	<i>Solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2</i>	-1.03	1.25	2.08
NM_000343	<i>slc5a1</i>	<i>Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1</i>	-1.30	1.51	2.57
NM_014227	<i>slc5a4</i>	<i>Solute carrier family 5 (low affinity glucose cotransporter), member 4</i>	1.14	1.88	1.49
NM_014331	<i>slc7a11</i>	<i>Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, xc-system), member</i>	1.95	2.36	5.37

11

NM_003486	<i>slc7a5</i>	<i>Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 5</i>	-1.11	1.13	1.58
NM_003983	<i>slc7a6</i>	<i>Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 6</i>	1.30	1.16	1.42
NM_003982	<i>slc7a7</i>	<i>Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, y+L system), member 7</i>	1.42	1.47	1.62
NM_182728	<i>slc7a8</i>	<i>Solute carrier family 7 (amino acid transporter light chain, L system), member 8</i>	1.41	3.06	2.65
NM_014270	<i>slc7a9</i>	<i>Solute carrier family 7 (glycoprotein-associated amino acid transporter light chain, bo, + system), member 9</i>	-1.15	1.70	1.73
NM_021094	<i>slco1a2</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1A2</i>	-1.04	1.27	2.90
NM_006446	<i>slco1b1/o atp1b1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1B1</i>	-1.39	1.13	1.65
NM_019844	<i>slco1b3/o atp1b3</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 1B3</i>	1.36	1.52	1.80
NM_005630	<i>slco2a1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 2A1</i>	1.52	4.54	2.58

NM_007256	<i>slco2b1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 2B1</i>	-1.04	1.26	2.05
NM_013272	<i>slco3a1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 3A1</i>	-1.56	-1.24	1.06
NM_016354	<i>slco4a1</i>	<i>Solute carrier organic anion transporter family, member 4A1</i>	1.98	2.46	2.64
NM_000593	<i>tap1</i>	<i>Transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)</i>	1.18	1.16	1.59
NM_000544	<i>tap2</i>	<i>Transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)</i>	1.16	1.75	2.48
NM_003374	<i>vdac1</i>	<i>Voltage-dependent anion channel 1</i>	1.63	2.28	1.96
NM_003375	<i>vdac2</i>	<i>Voltage-dependent anion channel 2</i>	1.24	2.09	2.23

^aA modulação da expressão de genes de transporte de fármacos utilizando o sistema de *RT²Human drug transporter PCR expression array analysis* (QIAGEN). Os dados em vermelho indicam os genes sendo sobreexpressados >3 vezes com relação a o grupo controle. Os valores em azul correspondem a genes regulados negativamente <3 vezes com relação ao grupo controle

Metodos suplementar 1. Infecção de macrófagos com cepas de *T. cruzi* e tratamento com Benzonidazol.

Os macrófagos derivados de THP-1 foram diferenciados segundo descrito no item 4.1.2 foram infectados com tripomastigotes da cepa CL Brener (Fenotipo sensível ao Benzonidazol) e Colombiana (Fenotipo resistente ao Benzonidazol) de *T. cruzi* e tratados com uma dose de 13 μM de Benzonidazol (A dose corresponde ao valor de CI_{80} estimado da cepa sensível). Os macrófagos THP-1 foram infectados com uma proporção parasito:célula de 3:1 por 2 h em meio RPMI livre de FBS a 37°C e 5 % de CO_2 e após os parasitos livres foram removidos mediante três lavagens com meio RPMI sem soro. Depois de 14 h os macrófagos infectados foram tratados com Benzonidazol na concentração de 13 μM e incubadas a 37°C e 5 % de CO_2 por 48h. As amostras foram coletadas, armazenadas e processadas como descrito no item 4.2 para as amostras de macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com Glucantime para a avaliação dos perfis de expressão gênica e para avaliar o índice parasitário.

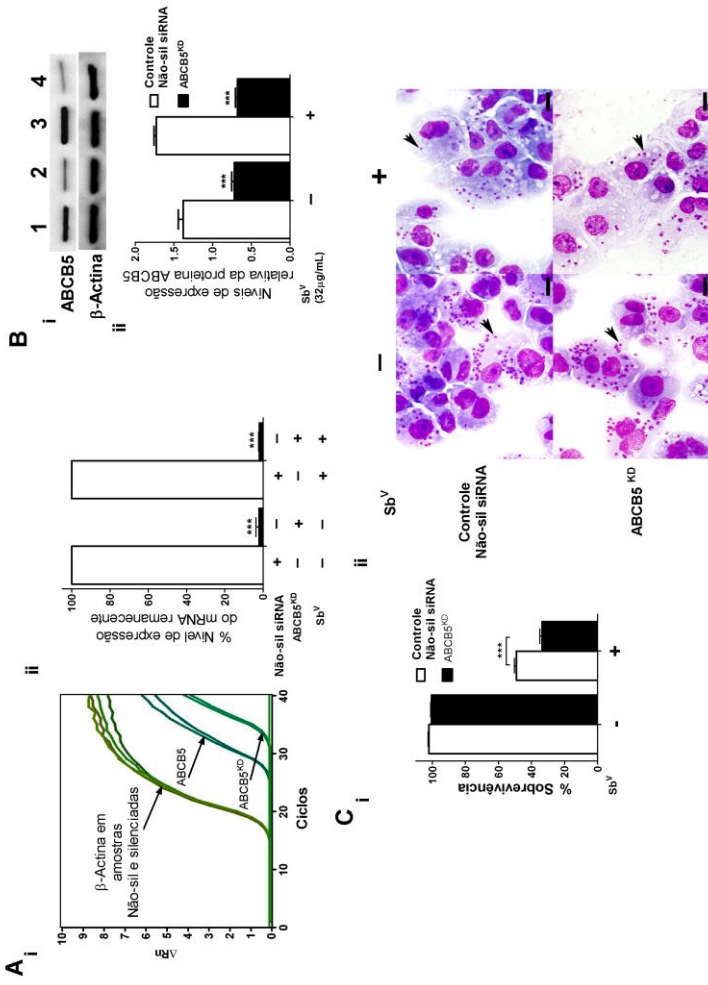


Figura S2. Silenciamento do gene humano *abcb5* aumentou a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^v em MΦ THP-1. Continua na página seguinte.

Figura S2. Continuação. A= Eficácia de silenciamento do gene *abcb5* foi determinada mediante análises dos níveis de expressão do mRNA por PCR em tempo real. (i)= Representação das curvas de amplificação dos genes *abcb5* e *β -actina* mostrando o ΔR_n vs os ciclos observados no grupo de M Φ THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. (ii)= Percentual dos níveis de expressão do mRNA remanescentes nos grupos de M Φ THP-1 infectados, infectados e tratados (amostras de silenciamento e controle negativo não silenciado). Bi= Western blot, a equivalência na carga de proteína foi controlada pela imunodeteção da β -Actina. Canaleta 1= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle negativo). Canaleta 2= M Φ THP-1 com silenciamento do *abcb5* (ABC5^{KD}), infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μ g/mL). Canaleta 4= M Φ THP-1 com silenciamento do *abcb5* (ABC5^{KD}), infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. Bii= As análises densitométricas dos sinais apresentadas no painel Bi foram realizadas usando o programa ImageJ. Ci= Percentual de sobrevivência intracelular das amastigotas de *L. braziliensis*, infectando M Φ THP-1 não silenciados e silenciados (ABC5^{KD}), tratados com Sb^V (32 μ g/mL), M Φ THP-1 infectados e não tratados foram usadas como controles. Cii= Microfotografia de M Φ THP-1 não silenciados e M Φ THP-1 ABC5^{KD} contendo amastigotas (setas) submetidos ou não ao tratamento com 32 μ g/mL de Sb^V. (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 μ m). Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias (*two-way*), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, *** p<0.01.

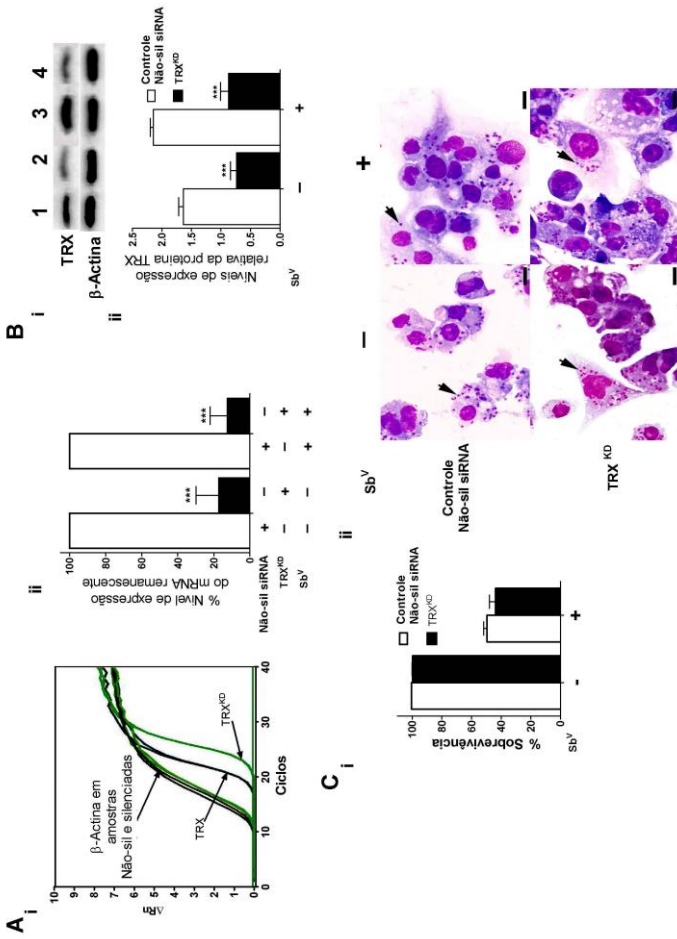


Figura S3. Silenciamento do gene humano *trx* favoreceu a sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^Y em MΦ THP-1. Continua na página seguinte.

Figura S3. Continuação. A= eficácia de silenciamento do gene *abcb5* foi determinada mediante análises dos níveis de expressão do mRNA por PCR em tempo real. (i)= Representação das curvas de amplificação dos genes *trx* e *β -actina* mostrando o ΔR_n vs os ciclos observados no grupo de M Φ THP-1 infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. (ii)= Percentual dos níveis de expressão do mRNA remanescentes nos grupos de M Φ THP-1 infectados, infectados e tratados (amostras de silenciamento e controle negativo não silenciado). Bi= *Western blot*, a equivalência na carga de proteína foi controlada pela imunodeteção da β -Actina. Canaleta 1= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle negativo). Canaleta 2= M Φ THP-1 com silenciamento do *trx* (TRX^{KD}), infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μ g/mL). Canaleta 4= M Φ THP-1 com silenciamento do *trx* (TRX^{KD}), infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. Bii= As análises densitométricas dos sinais apresentadas no painel Bi foram realizadas usando o programa ImageJ. Ci= Percentual de sobrevivência intracelular das amastigotas de *L. braziliensis*, infectando M Φ THP-1 não silenciados e silenciados (TRX^{KD}), tratados com Sb^V (32 μ g/mL), M Φ THP-1 infectados e não tratados foram usadas como controles. Cii= Microfotografia de M Φ THP-1 não silenciados e M Φ THP-1 TRX^{KD} contendo amastigotas (setas) submetidos ou não ao tratamento com 32 μ g/mL de Sb^V. (Coloração pelo Giemsa; escala da barra preta = 20 μ m). Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias (two-way), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, *** p<0.001.

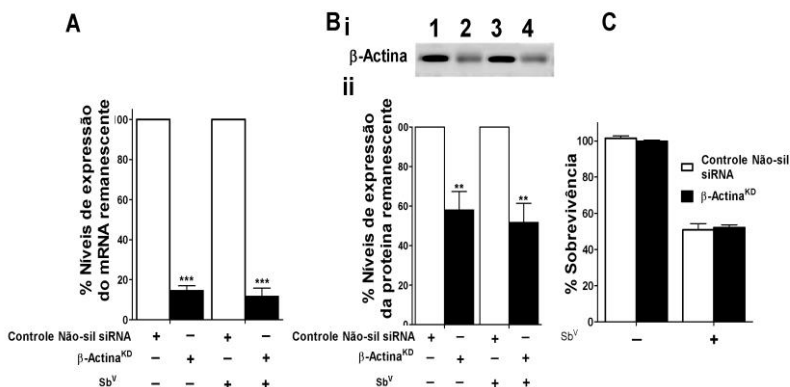


Figura S4. O silenciamento do gene humano da β -actina não induz nenhum efeito na sensibilidade intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* ao tratamento com Sb^V em M Φ THP1. Eficácia do silenciamento do gene β -actina foi determinada mediante análises dos níveis de expressão do mRNA por PCR em tempo real e da proteína por Western blot. A= Percentual dos níveis de expressão do mRNA remanescentes nos grupos de M Φ THP-1 infectados, infectados e tratados (amostras de silenciamento e controle negativo não silenciado). Bi= Níveis de expressão de proteína remanescente através de Western blot. Canaleta 1= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* (Controle negativo). Canaleta 2= M Φ THP-1 com silenciamento da β -actina (β -actina^{KD}) infectados com *L. braziliensis*. Canaleta 3= M Φ THP-1 não silenciados, infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V (32 μ g/mL). Canaleta 4= M Φ THP-1 com silenciamento do β -Actina (β -Actina^{KD}), infectados com *L. braziliensis* e tratados com Sb^V. Bii= Percentual dos níveis de expressão remanescentes da proteína determinado por meio de análises densitométricas dos sinais mostrados no painel Bi usando o programa ImageJ. C= Percentual de sobrevivência intracelular das amastigotas de *L. braziliensis*, infectando M Φ THP-1 não silenciados e M Φ THP-1 β -Actina^{KD}, tratados com Sb^V (32 μ g/mL); M Φ THP-1 infectados e não tratadas foram usados como controles. Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias (*two-way*), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, ** p<0.01 e *** p<0.001.

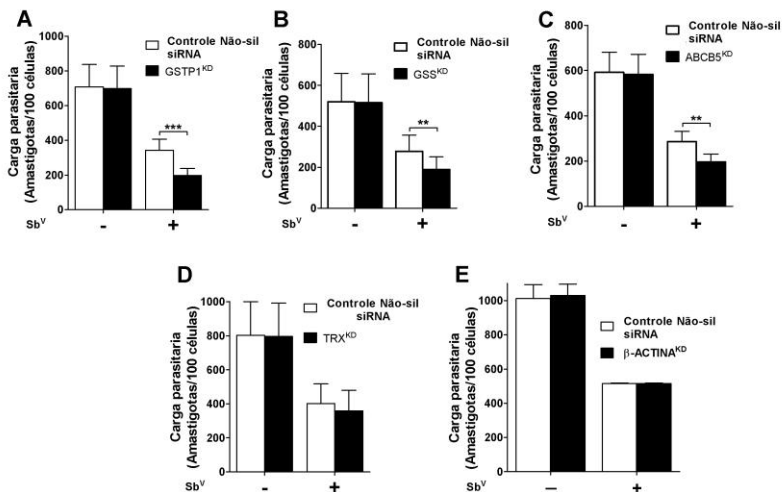


Figura S5. Efeito do silenciamento dos genes humanos da defesa antioxidante e do transporte de fármacos na carga parasitaria intracelular de amastigotas de *L. braziliensis* em MΦ THP1. A= Carga parasitaria intracelular de amastigotas de *L. braziliensis*, infectando MΦ THP-1 não silenciados e MΦ THP-1 silenciados. A= *gstp1*, B= *gss*, C= *abcb5*, d= *trx* e E= *β-actina*, tratados com Sb^V (32 µg/mL); MΦ THP-1 infectados e não tratados foram usados como controles. Os resultados representam a média de 2-3 experimentos independentes + EP. Diferenças significativas foram determinadas através da análise da variância (ANOVA) duas vias (*two-way*), seguida pelo teste de comparação múltipla de Bonferroni, ** p<0.01 e *** p<0.001.