



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO – UFMA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA – DBIO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GUSTAVO HENRIQUE CORRÊA SOARES

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (Leishmania)*
infantum DO ESTADO DO MARANHÃO A ANTIMÔNIO TRIVALENTE:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR**

SÃO LUÍS

2018

GUSTAVO HENRIQUE CORRÊA SOARES

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (Leishmania)*
infantum DO ESTADO DO MARANHÃO A ANTIMÔNIO TRIVALENTE:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Mayara Ingrid S. Lima

Coorientador (a): Prof^ª. Dr^ª. Vanessa R. Moreira

SÃO LUÍS

2018

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Soares, Gustavo.

Suscetibilidade de isolados clínicos de *Leishmania*
Leishmania infantum do estado do Maranhão a antimônio
trivalente: caracterização fenotípica e molecular /
Gustavo Soares. - 2018.

72 p.

Coorientador(a): Vanessa Ribeiro Moreira.

Orientador(a): Mayara Ingrid Sousa Lima.

Monografia (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

1. Antimônio. 2. Aquagliceporina-1. 3. Leishmaniose
visceral. I. Ribeiro Moreira, Vanessa. II. Sousa Lima,
Mayara Ingrid. III. Título.

GUSTAVO HENRIQUE CORRÊA SOARES

**SUSCETIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Leishmania (Leishmania)*
infantum DO ESTADO DO MARANHÃO A ANTIMÔNIO TRIVALENTE:
CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR**

Aprovada em: 12/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Mayara Ingrid Sousa Lima - Orientadora
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho – 1º Examinador
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Profa. Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo – 2º Examinador
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira – 1º Suplente
Universidade Federal do Maranhão – UFMA

MSc. Israel Higino de Sousa – 2º Suplente
Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia

*Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas,
ao meu pai, Dionísio Mendes Soares e ao meu avô, Biné Corrêa (in memoriam).*

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível ser realizado com ajuda de pessoas muito especiais que surgiram durante esses cinco anos de graduação. Reconhecer a ajuda de cada uma delas é valorizar o esforço que fizeram por mim e fico muito feliz em poder agradecer. Vocês ajudaram um garoto a se tornar persistente, à acreditar que no final tudo iria dar certo e que tudo bem se não desse. Muito obrigado mesmo!!!! Desde já peço desculpas caso eu esqueça de alguém, porém, cada pessoa que passou por mim durante esse período conquistou um local especial em meu coração. Sendo assim, agradeço:

Ao meu pai, **Dionísio Mendes Soares**, o maior exemplo de homem que eu conheço. Trabalhador, honesto e incrivelmente amoroso. Pai, espero me tornar metade do homem que o senhor é... Obrigado por ser o meu maior incentivador nos estudos e por acreditar que eu ainda irei chegar muito longe nesse caminho. Nossas conversas sempre me confortaram muito e espero poder retribuir todo o esforço que o senhor fez/faz por mim.

A minha mãe, **Cota**, agradeço por estar presente nos melhores e nos piores momentos dessa árdua jornada chamada vida. Obrigado por lutar por mim quando eu mesmo não conseguia mais e obrigado pelos seus grandes esforços, sem eles certamente eu não teria chegado aqui. A senhora, sem dúvidas, é minha maior inspiração de educadora. Eu te amo!

Aos meus padrinhos, **Wilson** e **Sandra**, por me confortarem e por sempre me defenderem. A minha tia **Rosa**, minha mainha, pelo carinho e também por todas as comidas maravilhosas que já fez pra mim, me salvando das experiências culinárias desastrosas daqui de casa. Sem vocês certamente seria mais difícil suportar todas as adversidades familiares.

As minhas primas, **Amanda** e **Mirla**, pelas conversas, risadas e também por nossas brincadeiras sem pé nem cabeça que inventávamos. Tenho vocês como irmãs e desejo muito sucesso e muito amor às duas.

Aos meus tios, **Jacira** e **José Mário** (*in memoriam*), obrigado por sempre me acolherem e pelo imenso carinho dado a mim. Sinto saudades suas, tio!

A minha orientadora, **Profa. Mayara Ingrid**, obrigado pela oportunidade de trabalhar com Biologia Molecular, pela enorme paciência e também por confiar em mim durante esses três anos que estamos trabalhando juntos. Aprendi muito com você e tenho um enorme carinho por tudo que construímos. Este trabalho é o resultado de nossas dedicações, nós conseguimos!!!!

A minha coorientadora, **Vanessa Moreira**, obrigado por me ensinar assim que entrei para o laboratório e também por sempre estar disponível a me ajudar. Agradeço pela preocupação e também por nossa amizade. Eu sei que ganhei uma grande amiga e que posso contar com você sempre que for necessário.

A todos do **Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM)**, em especial à **Patrícia, Jenilson, Clarence, Pamela e Léo** por sempre me socorrerem quando precisei. Fico muito feliz em ter conhecido cada um de vocês. Eu também não poderia deixar de agradecer a **Santana**, técnica do nosso laboratório. Obrigado Santinha, pela preocupação, pelo carinho e também por me ajudar a autoclavar meus materiais. Um especial agradecimento aos professores e também coordenadores do LabGeM, a **Profa. Silma Regina** e ao **Prof. Luís Fernando**, aprendi muito com vocês e os vejo como grandes exemplos de profissionais.

Aos meus amigos do **Grupo de Pesquisa em Genética e Biotecnologia aplicada à saúde (BioGen)**, em especial a **Ju** e a **Rob**. Obrigado pela ajuda, meninxs!!! Eu aprendi muito com vocês, podem ter certeza disso! Agradeço também a **Andressa, Karina** e a **Roberta** pelas conversas e também pelas risadas após os experimentos. A **Liliane**, pela sua amizade e também pela ajuda na estatística. E eu não poderia deixar de agradecer a duas pessoas que me ajudaram muito nos meus últimos experimentos: a **Danilo**, obrigado amigo por me ajudar ficando até tarde no laboratório comigo. Nossa amizade é muito valiosa! E a **Júnior 'Again'**, obrigado amigão por estar disponível aos finais de semanas e ir ao laboratório comigo para otimizar os meus experimentos. Vocês foram essenciais para o desenvolvimento desse trabalho!

A **Italo Vinícius**, pela nossa amizade e por nosso companheirismo durante esses cinco anos. Obrigado por estar comigo em todos os momentos e por ser sempre carinhoso comigo. Você fez com que eu amadurecesse e me tornasse uma pessoa mais confiante. Obrigado pela paciência, porque eu sei que eu te deixei louco durante a escrita desse trabalho. Sou muito feliz em ter te conhecido e lembre-se 너는 최고야.

A minha amiga **Natália Carine**, por compartilhar tantos momentos comigo durante esses anos de graduação. Desde nossa primeira iniciação científica até agora você demonstrou ser muito competente e espero que nós possamos continuar trabalhando juntos, realizando e atingindo nossas metas. Obrigado por me aturar na vida e também em dezoito grupos do *whatsapp*. Sei que posso contar sempre contigo, Naty!!!!

A **Emilly Moraes**, pela amizade, risadas e também pelo carinho. Obrigado por ser em muitos momentos a minha injeção de ânimo. Você se tornou uma grande amiga e tenho muito orgulho de você. Obrigado também por me mostrar que há alguém pior na cozinha que eu, isso sem dúvidas me ajuda muito (risos)... Enfim, você é única, imparável, uma verdadeira força da natureza!

A **Meyd**, meu grande amigo. Obrigado por nossas conversas e também pela ajuda em muitos momentos, no laboratório, nas disciplinas e também quando viajamos juntos para Ribeirão Preto. Você é incrível!

A **Augusto Júnior**, pela amizade e também por se tornar um grande exemplo meu. Sua dedicação e seu profissionalismo é inspirador! Obrigado por ter me supervisionado durante o meu período de estágio no Hospital Universitário Presidente Dutra e pelos ensinamentos sobre Imuno-histoquímica. Seus conselhos nunca serão esquecidos. Agradeço

também a minha amiga **Mairla Colins**, pelos momentos de descontração e também pelo carinho. Nossas conversas sobre *Masterchef* sempre foram as melhores e é bom compartilhar os mesmos ranços com alguém. Fico muito feliz em ver que nossa amizade está se fortalecendo cada vez mais e saiba que você pode contar comigo sempre.

A **Hugo Alves**, meu amigo/irmão do LabGeM. Obrigado por sempre se colocar disponível a me ajudar nos meus experimentos e também pela confiança. Nossa amizade é muito valiosa e espero te ver crescendo muito profissionalmente, tu merece muito amigooo!

A todos os meus professores do curso de Ciências Biológicas, por me proporcionarem um ensino de qualidade e também por serem grandes exemplos durante esse período da graduação. Um especial agradecimento a **Profa. Adriani Hass**, **Profa. Ilisandra Zanandrea** e também a **Profa. Wilma**, muito obrigado por me ajudarem sempre que precisei. Agradeço também a minha turma 2014.1, em especial a **Carlos**, **Ana Caroline**, **Rafaella**, **Isla** e **Tainá** pela amizade e pelos agradáveis momentos dessa graduação.

Ao meu amigo e orientador, **Prof. Macário Rebelo**, obrigado por todos os ensinamentos, pela preocupação e também pela nossa amizade. O senhor fez com que eu admirasse a área da Parasitologia e sou muito grato por isso. Sem dúvidas, o que sabemos hoje sobre leishmaniose no estado do Maranhão deve-se às suas pesquisas e saiba que o senhor se tornou um grande exemplo para mim. Espero poder continuar trabalhando com senhor e com todos do Laboratório de Entomologia e Vetores (LEV). Agradeço também aos meus amigos do LEV, **Mariza**, **Rosinha**, **Ana Vanniezy**, **Jesiel**, **João Manoel** e ao **Erick**, obrigado por me ajudarem quando eu estagiei no laboratório e também por me ensinarem sobre os flebotomíneos.

A **Profa. Gisele Garcia**, pelo imenso carinho, por todas as nossas conversas e também pela oportunidade de trabalharmos juntos. A senhora despertou em mim uma vontade enorme de trabalhar com Sistemática Filogenética e sou imensamente grato por tudo que a senhora me ensinou. Ganhei uma grande amiga, tenho certeza!!!

A **Profa. Melaine Lawall**, a minha primeira orientadora da graduação. Obrigado por abrir as portas do Laboratório de Histologia e também pela confiança. Aprendi muito com a senhora e vou levar seus ensinamentos para a vida. Agradeço também, a **Thiago Teófilo**, que me coorientou durante minha primeira iniciação científica e também por nossa amizade.

Ao meu amigo **Israel Higino**, pelos conselhos e por todos os ensinamentos com cultura celular. Sem sua ajuda com certeza não teria conseguido executar o meu trabalho. Obrigado pelos momentos de descontração no laboratório e também por ver potencial em mim. Agradeço também à **Profa Vera Maciel**, que se tornou uma pessoa muito especial em minha vida. Obrigado professora por ter me ajudado quando precisei viajar para Ribeirão Preto e por sempre fazer as melhores colocações.

A **Dra. Conceição Pedrozo**, pela colaboração em nosso projeto e por se dedicar no tratamento dos pacientes com leishmaniose no estado do Maranhão. Este trabalho só foi possível ser realizado com a sua ajuda. Agradeço também a **Viviane**, técnica do Hospital

Presidente Vargas, pela ajuda nas coletas das amostras e também pela preocupação. Foi muito bom conhecer pessoas tão simpáticas e especiais como vocês!!!

Ao **Laboratório de Bioquímica de Proteínas** (USP/Ribeirão Preto), pela oportunidade de estágio e também por me ensinarem sobre proteômica de *Leishmania*. Agradeço a **Elise, Bruno Biagi** e ao **Dham** por me receberem tão bem durante o período que fiquei no laboratório.

Ao **Prof. Adriano C. Coelho**, por ter me ajudado desde o início deste trabalho. Obrigado por ser tão atencioso e também por se colocar disponível a nos ajudar. Agradeço também pelas críticas ao meu projeto de TCC e também por responder todos os meus e-mails. Sua ajuda foi extremamente valiosa!!

A **Profa. Silvia Bortolin Uliana**, por ter me recebido tão bem durante o período que eu estagiei no Laboratório de Leishmanioses (USP/São Paulo). Sou imensamente grato pela sua ajuda e por nossas todas as nossas conversas. Obrigado pelo conselhos, pelo carinho e também pelo direcionamento à minha pesquisa. Agradeço também a **Cris Trinconi, Caroline Espada, Mariana Kolos, Victor Agostino** e a **Jenicer Yokoyama**, que me ensinaram sobre os ensaios de suscetibilidade com *Leishmania* e por me mostrarem os seus trabalhos. Vocês são incríveis!!! Fico muito feliz em ter tido a oportunidade de conhecer todos vocês.

A **Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão** (FAPEMA) pela concessão da bolsa durante dois anos de pesquisa.

E por fim, mas não menos importante, a **Deus**. Obrigado Pai, por me proteger e estar ao meu lado em todos os momentos. Só Tu sabe o quanto foi difícil chegar até aqui, mas conseguimos. Essa vitória é dada a Ti!!!!!!

“Everything that drowns me makes me wanna fly...”

Counting stars – OneRepublic

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	p.12
1.1 Gênero <i>Leishmania</i> : interação parasito-hospedeiro.....	p.12
1.2 Leishmanioses.....	p.14
1.2.1 Coinfecção HIV/ <i>Leishmania</i>	p.15
1.3 Epidemiologia.....	p.16
1.4 Quimioterapia.....	p.18
1.4.1 Antimoniais.....	p.19
1.4.2 Falhas terapêuticas em pacientes com leishmaniose.....	p.20
1.5 Mecanismos de resistência a antimoniais em <i>Leishmania</i> spp.....	p.21
2. Objetivos.....	p.25
2.1 Objetivo geral.....	p.25
2.2 Objetivos específicos.....	p.25
Referências bibliográficas.....	p.26
3. Artigo.....	p.36
4. Anexo: Normas da revista.....	p.58

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Gênero *Leishmania*: interação parasito-hospedeiro

O gênero *Leishmania*, pertencente à família Trypanosomatidae (Kinetoplastida), é constituído por espécies heteróxenas digenéticas, que alternam seu ciclo biológico entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e apresentam-se sob duas formas morfológicas principais: amastigotas e promastigotas (REY, 2016). As formas amastigotas (Fig. 1A) são encontradas no hospedeiro vertebrado, multiplicando-se intracelularmente em células do sistema mononuclear fagocitário e as formas promastigotas (Fig. 1B) são encontradas colonizando o intestino do hospedeiro invertebrado (BATES; ROGERS, 2004; MASLOV et al., 2013).

Classifica-se estes parasitos em dois subgêneros de acordo com sua localização no intestino do inseto vetor: o subgênero *Leishmania* – formas flageladas colonizam as porções anterior e médio do intestino; e o subgênero *Viannia* – as formas flageladas desenvolvem-se na porção posterior do intestino (BATES, 2007; RANGEL; LAINSON, 2009).

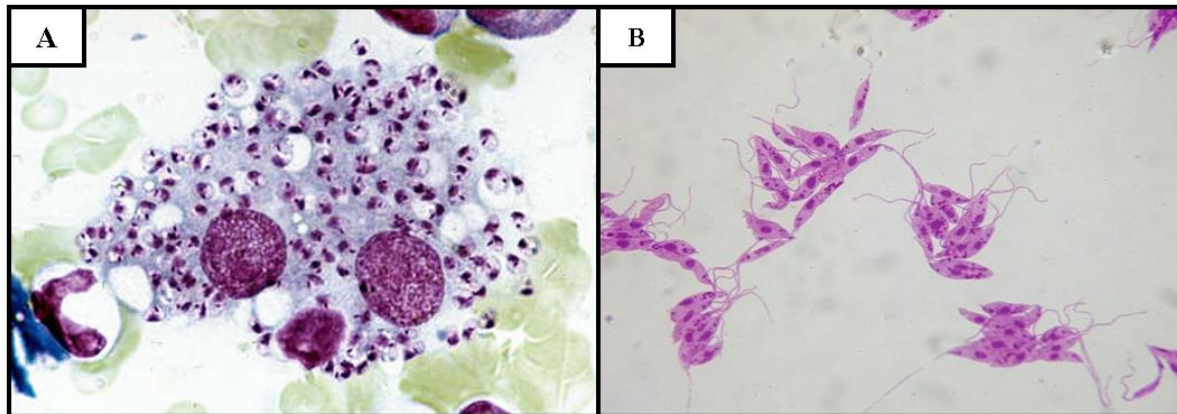


Figura 1: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. Em (A) amastigotas intracelulares e (B) promastigotas flageladas. Fonte: CVDB <http://www.cvdb.org/en/sand-fly-borne-diseases/leishmaniosis/>

O ciclo de vida do parasita inicia durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), que se alimentam alternadamente de um reservatório mamífero infectado e de um hospedeiro vertebrado suscetível (Fig. 2) (READY, 2013). Durante a hematofagia, o flebotomíneo ingere as formas amastigotas do parasito juntamente com o sangue do hospedeiro e no intestino do inseto transformam-se em formas promastigotas prociclícas que aderidos ao epitélio iniciam uma intensa atividade

multiplicadora, por divisão binária (ASHFORD, 2000; BESTEIRO et al., 2007). Após alguns dias, os parasitas migram para o esôfago do vetor e se diferenciam em formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, denominadas de promastigotas metacíclicas, que obstruem o canal alimentar do inseto (SACKS; PERKINS, 1984).

O inseto vetor ao tentar sugar o sangue de um novo hospedeiro, regurgita o material obstruído, inoculando os parasitas na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (REY, 2016). As formas promastigotas metacíclicas presentes na circulação são fagocitadas por células dendríticas e macrófagos residentes da derme e em seguida diferenciam-se em amastigotas intracelulares (MCNEELY; TURCO, 1990). As formas amastigotas replicam-se em fagolisossomos e rompem as células hospedeiras (SPATH et al., 2000) disseminando-se através dos sistemas linfático e vascular infectando outros macrófagos e monócitos no sistema reticulo-endotelial (CHAPPUIS et al., 2007) ou ainda podem ser ingeridas por flebotômíneos durante um novo repasto sanguíneo, reiniciando o ciclo (BATES, 1994).

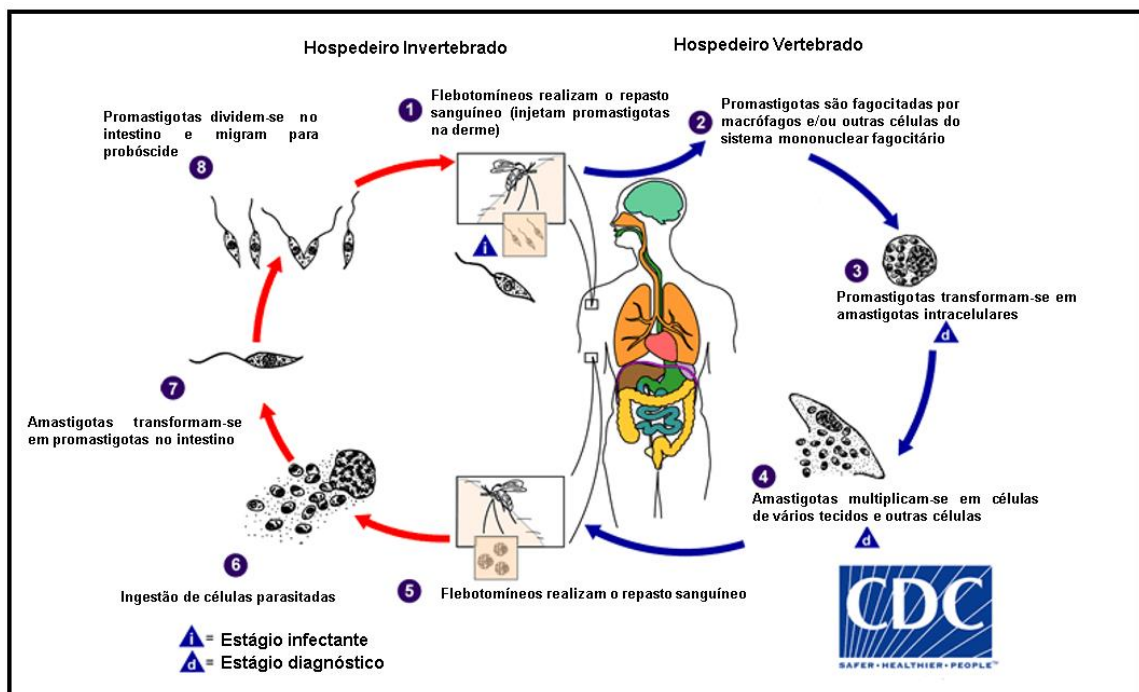


Figura 2: Ciclo biológico do protozoário parasita *Leishmania* sp. Fonte: CDC <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology>

1.2 Leishmanioses

A leishmaniose é uma infecção tropical negligenciada transmitida por fêmeas de flebotomíneos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (READY, 2013) e dependendo da espécie do parasita, da resposta imune do hospedeiro vertebrado e de fatores ambientais ocorre um pleomorfismo clínico quanto à infecção ocasionada (MURRAY et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) são reconhecidas três manifestações clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (WHO, 2018). As manifestações clínicas, quando expressas, variam de lesões cutâneas, que se não tratadas podem resultar em cicatrizes desfigurantes e infecções disseminada potencialmente fatais (PACE, 2014).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença e a infecção pode permanecer de forma subclínica ou torna-se aparente (MAGILL, 2005). As lesões cutâneas desenvolvem-se de algumas semanas a meses após a picada do flebotomíneo infectado e são frequentemente encontradas em partes expostas do corpo, como face, membros superiores e inferiores (DAVID; CRAFT, 2009). Os pacientes podem apresentar uma ou mais lesões, podendo ser de forma estrita, onde cada lesão representa uma picada independente do vetor ou em casos raros as lesões se manifestam de forma disseminada (MATHUR et al., 2011). A LC pode ser causada por diversas espécies de *Leishmania*, principalmente por: *Leishmania (Leishmania) major*, *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo e *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) guyanensis* no Novo Mundo (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é a forma crônica da doença (AMATO et al., 2007). Geralmente, inicia-se com uma inflamação nasal típica, seguida de ulceração da mucosa e perfuração do septo nasal, além dessas regiões, os lábios, o palato mole, a faringe e laringe também podem ser afetados (REITHINGER et al., 2007). A LMC necessita de diagnóstico e tratamento rápido, uma vez que as lesões são de difícil cicatrização podendo evoluir para desfiguração permanente e levar a óbito (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). As principais espécies responsáveis pela forma mucosa da doença são: *L. (L.) tropica*, *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) infantum* (variedade dermatrópica) no Velho Mundo e *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) panamensis* no Novo Mundo (MARRA; CHIAPPETTA; VINCENTI, 2014).

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar, é causada por *L. (L.) infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) no Novo Mundo e *L. (L.) donovani* no Velho Mundo (BANETH et al., 2008). A LV resulta em uma infecção sistêmica e progressiva, acometendo o sistema reticulo-endotelial e órgãos linfoides, como o baço, fígado e a medula óssea. Os sintomas clínicos incluem febre, anemia, leucopenia, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e caquexia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014), podendo causar imunossupressão, tornando o hospedeiro susceptível à infecções secundárias e pode ser letal, se não tratada de forma adequada (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000).

Considera-se ainda a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) como uma manifestação clínica (ASHFORD, 2000). Essa é uma condição dérmica que pode ocorrer durante ou após o tratamento da LV e é causada por *L. (L.) donovani* (ZIJLSTRA et al., 2017). A LDPC tende-se a cronicidade e é caracteriza pela presença de lesões maculares ou papulonodulares (HASNAIN et al., 2016) que geralmente iniciam no rosto e gradativamente aumentam de tamanho, podendo se espalhar para o pescoço, tronco e extremidades do corpo (GANGULY et al., 2010).

Essas manifestações clínicas geram diversos efeitos deletérios sobre a homeostasia imunológica do hospedeiro infectado, causando imunodepressão (OLIVIER et al., 2003), existindo inúmeros relatos de pacientes imunocomprometidos com leishmaniose, sendo a maioria dos casos descritos na literatura entre indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (VAN GRIENSVEN et al., 2014).

1.2.1 Coinfecção HIV/*Leishmania*

O primeiro caso de coinfecção HIV/*Leishmania* foi descrito na Europa em 1985, subsequentemente novos casos foram relatados em diversos países do globo (ALVAR et al., 1997). O vírus HIV e a *Leishmania* compartilham um mecanismo imunopatológico que compromete as células do sistema mononuclear fagocitário promovendo a replicação de ambos os patógenos (ANDREANI et al., 2012), o que contribui para o progresso da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e também para uma maior susceptibilidade a outras doenças oportunistas (LAULETTA; CUNHA; QUEIROZ, 2016).

A coinfecção HIV/*Leishmania* tem aspectos particulares em termos de apresentação, diagnóstico e resposta ao tratamento quimioterápico. Além disso, o diagnóstico precoce é essencial para reduzir a gravidade do quadro clínico e também da mortalidade (OLIVIER et

al., 2003). A mortalidade é significativamente maior em pacientes coinfetados com HIV/LV. Os baixos níveis de linfócitos T CD4⁺ e ausência de uma reconstituição da resposta imunológica após o tratamento são características presentes dessa coinfeção. Além disso, as recidivas apresentam-se como os principais agravantes para um mau prognóstico e está associado as altas taxas de mortalidade que ocorrem (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006).

1.3 Epidemiologia

As leishmanioses representam um grave problema de saúde pública e estão entre as seis maiores doenças tropicais que afligem países em desenvolvimento (DESJEUX, 2004). A prevalência dessas doenças é representada majoritariamente no globo, sendo endêmicas em 88 países e possuindo notificação obrigatória em 32 (MURRAY et al., 2005). A sua epidemiologia é extremamente diversificada considerando o número de espécies de *Leishmania* e de vetores competentes, havendo duas principais entidades epidemiológicas: 1) zoonótica, que inclui animais domésticos e silvestres como reservatórios no ciclo de transmissão e 2) antroponótica, no qual o homem é a única fonte de infecção para o vetor (SEAMAN et al., 1996).

Essas doenças apresentam alta morbidade e mortalidade em vários países do mundo e mais de 90% dos casos notificados à OMS ocorrem no Brasil, Etiópia, Índia, Somália e Sudão (WHO, 2018). Atualmente, as leishmanioses afetam aproximadamente 12 milhões de indivíduos e cerca de 350 milhões estão em risco de infecção. As estimativas mostram uma incidência anual de 0,7 a 1,2 milhão de novos casos da forma tegumentar da doença enquanto, para a LV é de 0,2 a 0,4 milhão de novos casos (ALVAR et al., 2012).

A distribuição da LV na América do Sul é extensa, sendo o Brasil o país com maior incidência de casos (Fig. 3) (TORRES, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, nos últimos 26 anos (1990-2016) de notificação, somaram-se 84.922 casos de LV no Brasil, sendo que 66.83% (56.756 casos) foram somente da região Nordeste, seguido pela região Norte e Sudeste com os maiores índices do país (BRASIL, 2018).

Os estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí destacam-se no cenário epidemiológico da doença, apresentando os maiores percentuais de casos da região Nordeste e também do país (BRASIL, 2018). O Maranhão apresenta-se como endêmico para LV (COSTA et al., 1995) e a doença está presente em todas as mesorregiões do estado, possuindo elevado número de municípios que apresentam transmissão intensa da doença, destacando-se com

maior número de notificação os municípios de Imperatriz, Caxias, Timon e Codó (COUTINHO; ELDA; CALDAS, 2012).

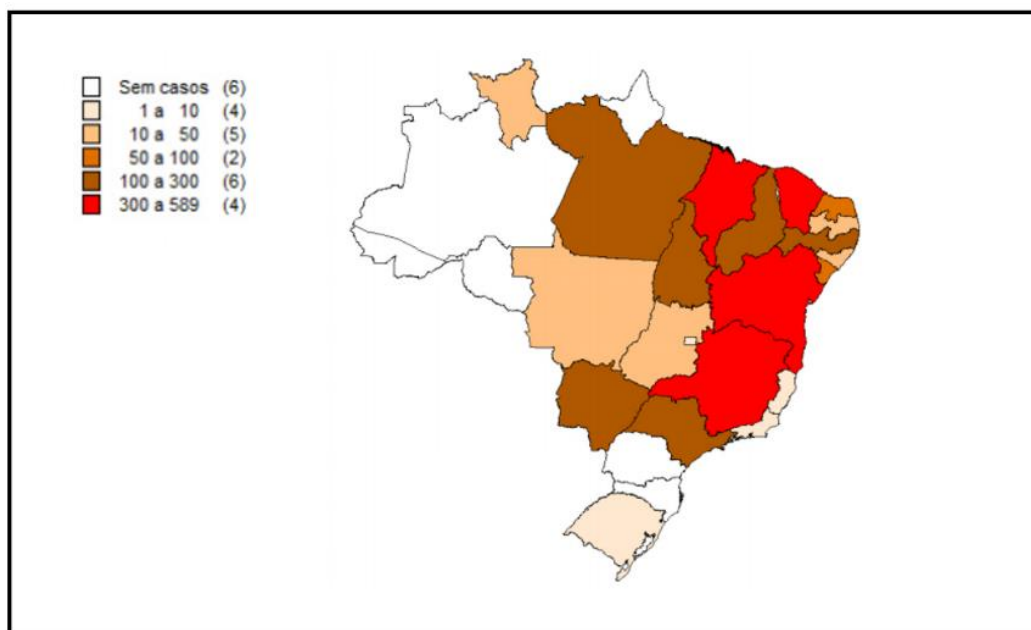


Figura 3: Casos de LV por unidade federativa do Brasil em 2015. Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde.

A Ilha de São Luís também responde por uma importante parcela do número de casos da doença no estado, destacando os municípios de São Luís e São José de Ribamar. Em relação ao número de notificações da doença no estado, somente em 2017 foram confirmados 831 casos, acometendo principalmente crianças de 1-4 anos de idade seguido de indivíduos com faixa etária entre 20-39 anos (SINAN, 2018).

No que diz respeito a distribuição da LV associada ao HIV, altas taxas de coinfeção foram registradas no Brasil (Fig. 4), principalmente em pacientes do sexo masculino com faixa etária entre 18-50 anos de idade (DE ALBUQUERQUE et al., 2014). Dados epidemiológicos reforçam que casos de coinfeção *Leishmania*/HIV estão aumentando pelo país e destacam as regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste como as principais portadoras dos números de casos (NASCIMENTO et al., 2011). Em relação ao estado do Maranhão, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) registrou entre o período de 2010-2017 um total de 422 pacientes coinfectados, demonstrado este cenário como um problema emergente de saúde pública (SINAN, 2018).

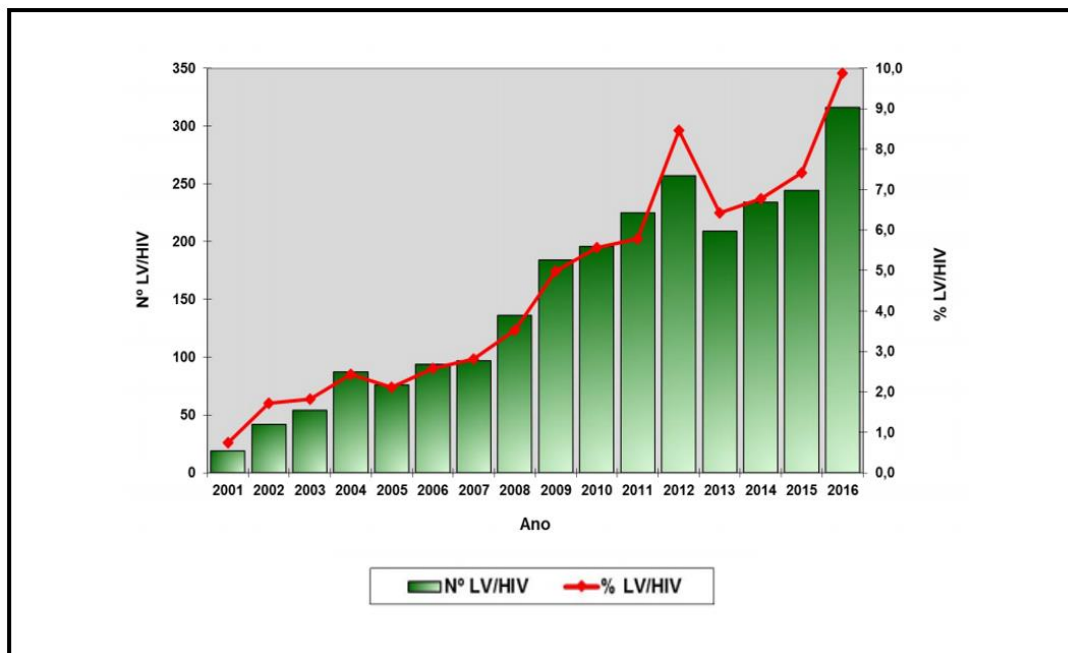


Figura 4: Casos e percentual de coinfecção LV/HIV no Brasil de 2001 a 2016. Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde.

1.4 Quimioterapia

A quimioterapia ainda constitui a principal ferramenta para o controle das leishmanioses (PONTE-SUCRE, 2003a). Os fármacos de primeira escolha para o tratamento destas doenças em muitas regiões são os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) – o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam™), sendo que no Brasil este último não é comercializado (BRASIL, 2017). Porém, variações na resposta clínica a esses medicamentos em LC, LMC e LV tem sido um problema persistente no tratamento nos últimos 50 anos, surgindo a hipótese de que há uma diferença intrínseca na sensibilidade das espécies de *Leishmania* a estes fármacos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

A toxicidade, as vias parenterais de administração e a duração do tratamento aos antimoniais estimularam o uso de medicamentos alternativos como a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e a paromomicina, embora estes dois últimos ainda não tenham sido aprovados no Brasil para uso clínico (ULIANA; TRINCONI; COELHO, 2018). Além disso, a larga utilização dos antimoniais combinada a interrupção do tratamento pode levar a falhas na terapia e favorecer o surgimento de linhagens resistentes do parasita (SUNDAR, 2001).

1.4.1 Antimoniais

Há muitos anos, os antimoniais têm sido utilizados na terapêutica das leishmanioses (FRÉZARD; DEMICHELI; RIBEIRO, 2009). Em 1912, Gaspar Vianna relatou a eficácia do tártaro emético (antimônio trivalente – Sb^{+3}) no tratamento da LMC, porém, o seu uso foi contestado devido a sua elevada toxicidade e seus efeitos colaterais graves (VIANNA, 1992; RATH et al., 2003). Assim, a partir da década de 40 o antimônio trivalente foi substituído por compostos menos tóxicos, os complexos de antimônio pentavalente (Sb^{+5}) (MARSDEN, 1985), sendo que somente em 1936 e 1945 as formulações dos medicamentos Pentostam™ e Glucantime®, respectivamente, foram introduzidos na terapêutica da doença (CROFT; YARDLEY, 2002).

Estes fármacos devem ser administrados via parenteral, diariamente, sendo recomendado pela OMS que a dose utilizada seja calculada em miligramas de antimônio pentavalente por quilograma de peso corporal (geralmente, 10-20mg Sb^{+5} /kg/20-30 dias) (BRASIL, 2017). É frequente durante a terapia antimonial ocorrer dores intramusculares locais e também efeitos colaterais, como náusea, fraqueza, vômitos, erupções cutâneas, hepatotoxicidade e cardiotoxicidade, exigindo cuidadosa supervisão médica (GUERIN et al., 2002).

No que diz respeito ao mecanismo de ação destes compostos, os antimoniais pentavalentes são pró-drogas que necessitam de redução biológica para a forma trivalente para apresentar atividade leishmanicida (EPHROS et al., 1999). O local e o mecanismo desta redução continuam controversos na literatura. Entretanto, estudos demonstraram que o Sb^{+5} não é ativo contra formas promastigotas do parasito, enquanto que, amastigotas axênicos, cultivados na ausência de macrófagos, são sensíveis a este composto, sugerindo que algum tipo de redução pode ocorrer nesta forma evolutiva (CALLAHAN et al., 1997; EPHROS et al., 1999).

O mecanismo pelo qual o Sb^{+5} é reduzido em amastigotas não está claro, uma das hipóteses apontadas é que condições de acidez e de temperatura elevada podem favorecer a redução desse composto, e esses são fatores encontrados nos fagolisossomos, porém, esta

redução não é significativa (WYLLIE; CUNNINGHAM; FAIRLAMB, 2004). Além disso, a redução não enzimática através da glutathiona (FRÉZARD et al., 2001) e da tripanotona (DOS SANTOS FERREIRA et al., 2003) também já foram relatadas em *Leishmania*. A redução enzimática também ocorre e duas enzimas já foram descritas como agentes redutoras nesses parasitos: a tiol dependente redutase (TDR1) (DENTON; MCGREGOR; COOMBS, 2004) e o antimoniato redutase (ACR2) (ZHOU et al., 2004).

O fármaco atravessa a membrana do parasito através de proteínas transportadoras, torna-se ativo e encontra seu alvo intracelular provocando morte celular (BROCHU et al., 2003), que pode ocorrer por inibição da síntese de macromoléculas, perturbação do metabolismo energético, distúrbios do potencial redox e também através da indução de apoptose, envolvendo fragmentação do DNA (SERENO et al., 2001a, 2001b).

1.4.2 Falhas na terapia antimonial em pacientes com leishmaniose

Apesar dos antimoniais representarem os fármacos de primeira escolha na terapia das leishmanioses, numerosos casos de falhas terapêuticas já foram relatados (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Esses casos podem ser classificados como falha terapêutica primária, quando ocorrem desde o início do tratamento ou como falha terapêutica secundária, quando ocorrem durante uma recaída (BRYCESON et al., 1985). Geralmente, os casos de falha terapêutica secundária são descritos em pacientes imunocomprometidos, porém, já foram reportados casos de pacientes imunocompetentes que tiveram recidiva clínica devido a um tratamento antimonial insuficiente (PETERS et al., 1990).

O aumento de casos refratários ao tratamento antimonial tem sido documentado em diversas regiões do mundo (GOTO; LINDOSO, 2010). Em vários estudos, observou-se falha terapêutica, registrado em 65% dos casos de LV na Índia (SUNDAR et al., 2000), 39% dos casos de LC na Colômbia (PALACIOS et al., 2001) e 7% dos casos de LC na Bolívia (BERMUDEZ et al., 2006). No Brasil, um estudo comparando a resposta ao Glucantime® em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* encontrou taxas de falha clínica de 60% e 30%, respectivamente, após o primeiro ciclo terapêutico (ROMERO et al., 2001). Além disso, casos de falha no tratamento em LC já foram reportados em diferentes unidades federativas do país, como no Rio de Janeiro (OLIVEIRA-NETO et al., 1997), Bahia (ROMERO et al., 2001) e também no Amazonas (TEIXEIRA et al., 2008), porém, estes dados são escassos a respeito da forma visceral da doença.

A diferença na sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos antimoniais constitui uma das principais razões para falhas no tratamento quimioterápico (DA LUZ et al., 2009). Um estudo realizado por Jeddi et al. (2014) mostrou que isolados clínicos de *L. (L.) infantum* de duas regiões do Magreb e uma do sul da França apresentaram diferença quanto a suscetibilidade a antimônio, possuindo valores de IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento celular em 50%) que variavam entre 7.5µg/mL à superiores a 60µg/mL.

Um estudo examinou a sensibilidade *in vitro* de amastigotas intracelulares de isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* ao Glucantime® no Brasil. Esse estudo demonstrou que os isolados de *L. (V.) braziliensis* foram significativamente mais sensíveis ao Sb⁺⁵ com valores de IC₅₀ variando entre 18.5-59.8µg/mL enquanto, os isolados de *L. (L.) amazonensis* apresentaram valores ≥ 112.2 µg/mL (ZAULI-NASCIMENTO et al., 2010).

Em relação à resposta terapêutica de pacientes coinfetados por *Leishmania*/HIV, os mesmos apresentam maiores riscos de recidivas e são mais propensos à má responsividade a quimioterapia (CIPRIANO et al., 2017). Isto implica no uso de profilaxia secundária com a utilização de anfotericina B ou de pentamidina (VAN GRIENSVEN et al., 2010). Alguns estudos já demonstraram que ocorre variabilidade quanto à sensibilidade de isolados de pacientes com e sem coinfeção, como demonstrado por Faraut-Gambarelli et al (1997) no qual relataram que amastigotas intracelulares de pacientes LV/HIV são mais sensíveis ao Glucantime® quando comparados a isolados de pacientes sem coinfeção.

O fenômeno de falha terapêutica é complexo, podendo envolver fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro, assim como aspectos da biologia do parasita, como a insensibilidade intrínseca a uma determinada droga e o fenótipo de resistência (GROGL; THOMASON; FRANKE, 1992). É importante ressaltar que falha terapêutica e resistência medicamentosa são dois eventos distintos, o primeiro possui origem multifatorial e envolve a relação entre o parasito e seu hospedeiro, enquanto o segundo é uma característica da seleção de parasitas através do contato com o fármaco isolado (TORRES et al., 2013).

1.5 Mecanismos de resistência a antimoniais em *Leishmania* spp

Os microrganismos desenvolveram numerosas estratégias para neutralizar a toxicidade celular induzida por componentes xenobióticos, sendo que algumas dessas defesas foram

coadaptadas para a resistência a drogas (FAIRLAMB et al., 2016). A resistência a medicamentos consiste na diminuição da sensibilidade de um parasito a uma droga, isso ocorre devido a um declínio da eficácia do fármaco em uma população anteriormente susceptível (NATERA et al., 2007). Porém, essa definição pressupõe suscetibilidade original dos parasitos à droga e isso pode não ocorrer, como em *Leishmania* sp. (PONTE-SUCRE, 2003b).

O fenômeno de resistência em *Leishmania* é complexo, podendo ser natural ou adquirido, sendo este último através da exposição de doses sub-ótimas da droga (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004). O surgimento desse fenótipo pode ter múltiplas origens, podendo ser através de adaptação fisiológica, mutações aleatórias seguida de seleção, seleção diferencial de parasitos resistentes em uma população heterogênea e também por alterações na expressão gênica (SINGH, 2006).

Considerando os antimoniais, diversas vias podem estar envolvidas nos fenótipos de resistência, como a entrada, metabolismo, efluxo e/ou sequestro da droga (Fig. 5) (JEDDI; PIARROUX; MARY, 2011). A diminuição desses fármacos dentro do parasita constitui uma das principais estratégias de escape utilizadas por *Leishmania* (MARQUIS et al., 2005). Além disso, foi observada a atuação de proteínas transportadoras de membrana no carregamento desses compostos sendo correlacionados com o fenômeno de resistência desses parasitos (HUBER; MARUIAMA; ALMEIDA, 2010).

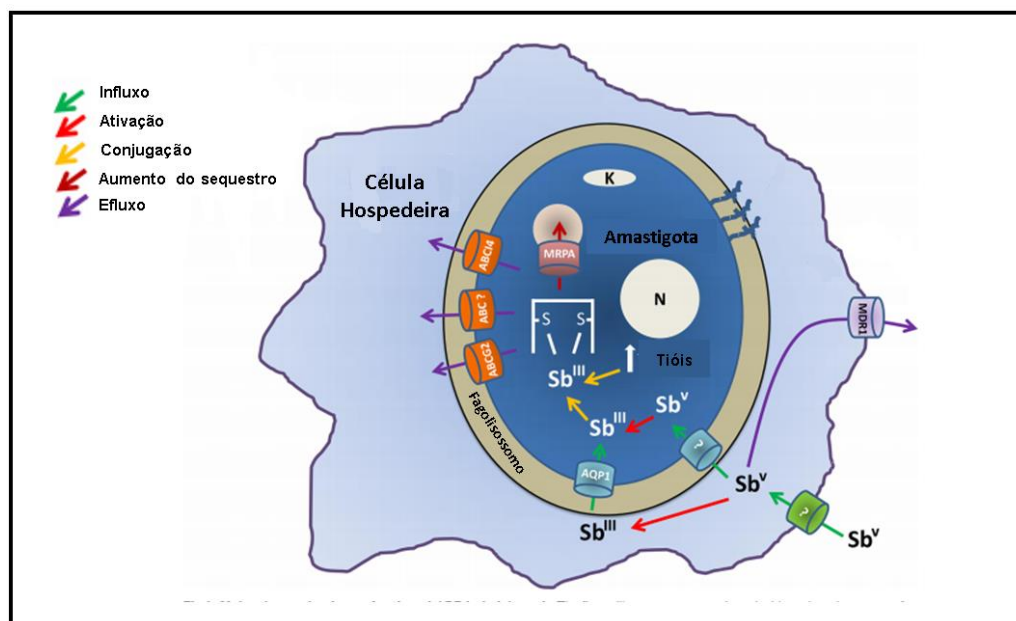


Figura 5: Mecanismos moleculares de resistência a antimoniais. ABCG2, ABC, ABC14 – ATP-Binding Cassete; AQP1 – aquaporina; K – cinetoplasto; MDR1 – proteína de resistência a múltiplas drogas; MRPA – proteína transportadora; Sb^{III} – antimônio trivalente; Sb^V – antimônio pentavalente; N – núcleo. Fonte: Adaptado de Ponte-Sucre et al. (2017).

As proteínas transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) estão envolvidas em muitos processos celulares, como no transporte de moléculas para dentro e fora da célula (SAURIN; HOFNUNG; DASSA, 1999). Essas proteínas utilizam a energia resultante da hidrólise de ATP para transportar uma variedade de moléculas através das membranas biológicas, incluindo aminoácidos, peptídeos, íons e também fármacos (HIGGINS, 1992; SHEPS; LING, 2007). Além disso, esses transportadores já foram observados contribuindo para o fenótipo de resistência de diversas drogas (LEPROHON et al., 2006). A proteína MRPA (*Multidrug-related protein A*), pertencente à família ABC, foi o primeiro transportador caracterizado em *Leishmania* spp. e está relacionado a resistência ao arsenito e também aos antimoniais (LÉGARÉ et al., 2001a). A saída de antimônio mediado pelo transportador MRPA ocorre através do sequestro da droga, conjugado a tióis, para o interior de vesículas que posteriormente são exocitadas pela região do bolso flagelar do parasita (LÉGARÉ et al., 2001b). A amplificação e a superexpressão do gene que codifica essa proteína já foi relacionada com a diminuição do influxo de Sb^{+3} em *Leishmania* (CALLAHAN et al., 1994) e resultados similares também foram observados em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* resistentes aos antimoniais (MUKHERJEE et al., 2007).

A proteína AQP1 (*Aquaglyceroporin-1*) também possui efeito modulador na resistência aos antimoniais em *Leishmania* (GOURBAL et al., 2004). As aquaglicoporinas são canais de membrana que permitem o transporte de pequenos solutos nas células e em *Leishmania* demonstrou facilitar a passagem de Sb^{+3} intracelularmente (MARQUIS et al., 2005). A superexpressão do gene AQP1 produz hipersuscetibilidade ao antimônio, enquanto que a deleção gênica torna o parasita resistente ao fármaco (GOURBAL et al., 2004; RICHARD et al., 2004). Estudos avaliaram o fenótipo de resistência ao Sb^{+5} em isolados clínicos de *L. (L.) donovani* e demonstraram a correlação desse fenômeno com a baixa expressão do gene *AQP1* demonstrando o seu papel no mecanismo de resistência a droga (DECUYPERE et al., 2005; MANDAL et al., 2010).

O surgimento de isolados *Leishmania* spp. resistentes à fármacos e a propagação dessas cepas enfatizam a importância de sua identificação e da elucidação dos possíveis mecanismos utilizados por esses isolados na resistência medicamentosa, principalmente em áreas

endêmicas. Considerando a escassez de dados na literatura a respeito do perfil de isolados brasileiros de *L. (L.) infantum* a antimoniais, a caracterização dessas cepas contribuiria para o desenvolvimento de novas estratégias quimioterápicas mais eficazes e permitiria diminuir o número de casos de falhas terapêuticas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Realizar a caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de pacientes com leishmaniose visceral do estado do Maranhão.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar a espécie de *Leishmania* spp. dos isolados clínicos obtidos no estudo;
- Verificar a suscetibilidade ao antimônio trivalente em formas promastigotas dos isolados clínicos;
- Determinar a taxa de infecção dos isolados clínicos em macrófagos RAW;
- Avaliar o nível de mRNA dos genes *AQPI* e *MRPA* dos isolados clínicos de *L. (L.) infantum*.

Referências Bibliográficas

- ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clinical microbiology reviews**, v. 10, n. 2, p. 298–319, 1997.
- ALVAR, J. et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: The second 10 years. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 2, p. 334–359, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAR, J.; CROFT, S.; OLLIARO, P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. **Advances in Parasitology**, v. 61, n. 05, p. 223–274, 2006.
- AMATO, V. S. et al. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 2, p. 266–274, 2007.
- ANDREANI, G. et al. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 276–282, 2012.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, n. 12–13, p. 1269–1281, 2000.
- BANETH, G. et al. Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. **Trends in parasitology**, v. 24, n. 7, p. 324–330, 2008.
- BATES, P. A. The developmental biology of Leishmania promastigotes. **Experimental parasitology**, v. 79, n. 2, p. 215–218, 1994.
- BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007.
- BATES, P.; ROGERS, M. New Insights into the Developmental Biology and Transmission Mechanisms of Leishmania. **Current Molecular Medicine**, v. 4, n. 6, p. 601–609, 2004.
- BERMUDEZ, H. et al. Generic sodium stibogluconate is as safe and effective as branded meglumine antimoniate, for the treatment of tegumentary leishmaniasis in Isiboro Secure Park, Bolivia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 100, n. 7, p. 591–600, 2006.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, 2007.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2018.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BROCHU, C. et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3073–3079, 2003.

BRYCESON, A. D. M. et al. Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs I. Clinical and immunological studies. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 5, p. 700–704, 1985.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 6736, n. figure 2, p. 1–20, 2018.

CALLAHAN, H. L. et al. The PGPA gene of Leishmania major mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 68, n. 1, p. 145–149, 1994.

CALLAHAN, H. L. et al. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818–822, 1997.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews microbiology**, v. 5, n. 11supp, p. S7, 2007.

CIPRIANO, P. et al. Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: The challenge of relapse and treatment failure. **Acta Medica Portuguesa**, v. 30, n. 6, p. 443–448, 2017.

COSTA, J. M. et al. Leishmaniose visceral no estado do Maranhao, Brasil: a evolucao de uma epidemia. [Visceral leishmaniasis in the State of Maranhao, Brazil: evolution of an epidemic]. **Cad Saude Publica**, v. 11, n. 2, p. 321–324, 1995.

COUTINHO, A. C. C.; ELDA, S.; CALDAS, A. J. M. Análise dos casos e óbitos por leishmaniose visceral no Estado do Maranhão, no período de 2000 a 2008. **Rev Pesq Saúde**, v.13, n. 1, p. 11-15, 2012.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 319–342, 2002.

DA LUZ, R. I. et al. In vitro sensitivity testing of Leishmania clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5197–5203, 2009.

DAVID, C. V; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DE ALBUQUERQUE, L. C. P. et al. HIV/AIDS-related visceral leishmaniasis: A clinical and epidemiological description of visceral leishmaniasis in northern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 38–46, 2014.

DECUYPERE, S. et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (V) resistance in Leishmania donovani isolates from Nepal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4616–4621, 2005.

DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G. H. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal**, v. 381, n. 2, p. 405–412, 2004.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DOS SANTOS FERREIRA, C. et al. Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biomaterials**, v. 16, n. 3, p. 441–446, 2003.

EPHROS, M. et al. Stage-specific activity of pentavalent antimony against Leishmania donovani axenic amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 2, p. 278–282, 1999.

FAIRLAMB, A. H. et al. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. **Nature Microbiology**, v. 1, n. 7, 2016.

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. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p.827-830, 1997.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 913–916, 2001.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317–2336, 2009.

GANGULY, S. et al. Tropical medicine rounds Post-kala-azar dermal leishmaniasis – an overview. p. 921–931, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GOURBAL, B. et al. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **Journal of Biological Chemistry**, 2004.

GROGL, M.; THOMASON, T. N.; FRANKE, E. D. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 47, n. 1, p. 117–126, 1992.

GUERIN, P. J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494–501, 2002.

HASNAIN, G. et al. Case report: Post-kala-azar dermal leishmaniasis without previous history of visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 1383–1385, 2016.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual review of cell biology**, v. 8, n. 1, p. 67–113, 1992.

HUBER, P. C.; MARUIAMA, C. H.; ALMEIDA, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, 2010.

JEDDI, F.; PIARROUX, R.; MARY, C. Antimony resistance in Leishmania, focusing on experimental research. **Journal of tropical medicine**, v. 2011, 2011.

JEDDI, F. et al. Heterogeneity of molecular resistance patterns in Leishmania antimony-resistant field isolates from the Western Mediterranean area. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4866-4874, 2014.

LAULETTA, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Leishmaniasis – HIV coinfection: current challenges. p. 147–156, 2016.

LÉGARÉ, D. et al. ABC proteins of Leishmania. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 33, n. 6, p. 469–474, 2001a.

LÉGARÉ, D. et al. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 28, p. 26301–26307, 2001b.

LEPROHON, P. et al. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 10, p. 1713–1725, 2006.

MAGILL, A. J. Cutaneous leishmaniasis in the returning traveler. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 19, n. 1, p. 241–266, 2005.

MANDAL, S. et al. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and-resistant clinical isolates of Leishmania donovani from India. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 496–507, 2010.

MARQUIS, N. et al. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant Leishmania. **Molecular microbiology**, v. 57, n. 6, p. 1690–1699, 2005.

MARRA, F.; CHIAPPETTA, M. C.; VINCENTI, V. Ear, nose and throat manifestations of mucocutaneous Leishmaniasis: a literature review. **Acta bio-medica : Atenei Parmensis**, v. 85, n. 1, p. 3–7, 2014.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 187–198, 1985.

- MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: All that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 43–52, 2013.
- MATHUR, A. et al. Diffuse mucocutaneous leishmaniasis. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 59, n. 10, p. 649, 2011.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MCNEELY, T. B.; TURCO, S. J. Requirement of lipophosphoglycan for intracellular survival of *Leishmania donovani* within human monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 144, n. 7, p. 2745–2750, 1990.
- MUKHERJEE, A. et al. Role of ABC transporter MRPA, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 204–211, 2007.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NASCIMENTO, E. T. et al. The emergence of concurrent HIV-1/AIDS and visceral leishmaniasis in Northeast Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 5, p. 298–300, 2011.
- NATERA, S. et al. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 6, p. 637–642, 2007.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. et al. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 57, n. 6, p. 651–655, 1997.
- OLIVIER, M. et al. The pathogenesis of *Leishmania* /HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 97, n. sup1, p. 79–98, 2003.
- OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: A literature review with emphasis on clinical aspects. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 8, p. 553–562, 2000.

- OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.
- PACE, D. Leishmaniasis. p. 10–18, 2014.
- PALACIOS, R. et al. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania viannia* species. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 64, n. 3, p. 187–193, 2001.
- PETERS, B. S. et al. Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. **QJM: An International Journal of Medicine**, v. 77, n. 2, p. 1101–1111, 1990.
- PONTE-SUCRE, A. Their Relevance for Chemotherapy. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 10, p. 1–10, 2003a.
- PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 2017.
- PONTE-SUCRE, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. **Kinetoplastid Biology and Disease**, v. 2, n. 1, p. 14, 2003b.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: Aspects of their biology and vectorial competence. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 937–954, 2009.
- RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, 2003.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.
- REY, L. *Leishmania* e Leishmaníases. In: **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 4. ed., 2016.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007.
- RICHARD, D. et al. Growth phase regulation of the main folate transporter of *Leishmania*

infantum and its role in methotrexate resistance. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 52, p. 54494–54501, 2004.

ROMERO, G. A. et al. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* and *L.*(V.) *guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–465, 2001.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science**, v. 223, n. 4643, p. 1417–1419, 1984.

SAURIN, W.; HOFNUNG, M.; DASSA, E. Getting in or out: early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. **Journal of molecular evolution**, v. 48, n. 1, p. 22–41, 1999.

SEAMAN, J. et al. Epidemic visceral leishmaniasis in southern Sudan: Treatment of severely debilitated patients under wartime conditions and with limited resources. **Annals of Internal Medicine**, v. 124, n. 7, p. 664–672, 1996.

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 tropica**, v. 80, n. 3, p. 195–205, 2001a.

SERENO, D. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064–2069, 2001b.

SINAN. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose visceral - situação epidemiológica. 2018. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvma.def>>. Acesso em: 11.Nov.2018.

SHEPS, J. A.; LING, V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 453, n. 5, p. 545–553, 2007.

SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 411, 2006.

SPATH, G. F. et al. Lipophosphoglycan is a virulence factor distinct from related glycoconjugates in the protozoan parasite *Leishmania major*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 16, p. 9258–9263, 2000.

SUNDAR, S. et al. Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis.[Erratum appears in Trop Med Int Health 2002 Mar;7(3):293]. **Tropical Medicine {&} International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

TEIXEIRA, A. C. et al. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 3, p. 157–160, 2008.

TORRES, D. C. et al. Assessment of drug resistance related genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Acta tropica**, v. 126, n. 2, p. 132–141, 2013.

TORRES, F. D. Current epidemiological status of visceral leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537–541, 2006.

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

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010.

VAN GRIENSVEN, J. et al. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 4, p. 286–299, 2014.

WHO. **Leishmaniasis**. 2018. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 11.Nov.2018.

WYLLIE, S.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 38, p. 39925–39932, 2004.

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. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 68–76, 2010.

ZHOU, Y. et al. Leishmania major LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 36, p. 37445–37451, 2004.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis in the Indian subcontinent: A threat to the South-East Asia Region Kala-azar Elimination Programme. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–16, 2017.

1 **Artigo – *International Journal of Antimicrobial Agents***

2 **Estudo fenotípico e molecular de isolados clínicos de *Leishmania (Leishmania) infantum***
3 **demonstram uma variada sensibilidade intraespecífica a antimônio trivalente**

4 Gustavo Henrique Corrêa Soares^{a*}; Vanessa Ribeiro Moreira^b; Mayara Ingrid Sousa Lima^a

5 ^a Departamento de Biologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal
6 do Maranhão, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil; ^b
7 Faculdade Santa Terezinha, Avenida Casemiro Júnior, 12, Anil, São Luís, Maranhão, Brasil.

8 E-mail: ghc.soares7@gmail.com (G. Soares); more_nessa@yahoo.com.br (V. Moreira);
9 mayaingrid@yahoo.com.br (M. Lima)

10 * Autor correspondente

11

12 **Resumo**

13 A leishmaniose visceral é causada por *Leishmania (Leishmania) infantum* e apresenta-se
14 como uma doença endêmica do estado do Maranhão. A quimioterapia da doença baseia-se na
15 administração de antimoniais, porém, o surgimento de falhas terapêuticas e de recidivas
16 clínicas tornaram-se grandes desafios na terapêutica da doença. A ocorrência desses
17 fenômenos deve-se principalmente à variabilidade do parasito na suscetibilidade à drogas.
18 Desse modo, o presente estudo realizou a caracterização fenotípica e molecular de cinco
19 isolados clínicos de *L. (L.) infantum* provenientes do estado Maranhão ao antimônio
20 trivalente. Para isso, a sensibilidade dos isolados clínicos ao antimônio foi avaliada através de
21 ensaios de viabilidade celular verificando uma variação de IC₅₀ (concentração da droga que
22 inibe a viabilidade celular em 50%) de 66,2 a 133,8µM. A taxa de infecção de cada isolado
23 também foi avaliada através de um modelo experimental de macrófagos RAW observando
24 uma variação de 59% a 81%. Uma discreta correlação entre suscetibilidade e potencial de
25 infecção foi encontrada. A expressão dos genes AQP1 (Aquagliceoporina-1) e MRPA
26 (Proteína A de resistência a múltiplos fármacos) foram determinados através de PCR
27 quantitativa em tempo real observando a superexpressão de ambos os genes nos isolados
28 clínicos. Estes resultados implicam que ocorre uma variabilidade intraespecífica dos isolados
29 de *L. (L.) infantum* ao antimônio trivalente, demonstrada através do perfil fenotípico e
30 molecular dos isolados a droga.

31 **Palavras-chave:** Leishmaniose visceral. Antimônio. Suscetibilidade. Aquagliceoporina

32

33

34 **Abstract**

35 Visceral leishmaniasis is caused by *Leishmania (Leishmania) infantum* and it presents as an
36 endemic disease in the state of Maranhão. The chemotherapy of the disease is based on the
37 administration of antimonials, however, the emergence of therapeutic failures and clinical
38 relapses have become great challenges in the treatment of the disease. The occurrence of these
39 phenomena is mainly due to the variability of the parasite in the susceptibility to drugs. Thus,
40 the present study carried out the phenotypic and molecular characterization of five clinical
41 isolates of *L. (L.) infantum* from the state of Maranhão to trivalent antimony. For this, the
42 sensitivity of clinical isolates to antimony was assessed by cell viability assays by checking a
43 range of IC₅₀ (concentration of drug that inhibits cell viability by 50%) from 66.2 to 133.8µM.
44 The infection rate of each isolate was also evaluated through an experimental model of RAW
45 macrophages, observing a variation of 59% to 81%. A discrete correlation between
46 susceptibility and infection potential was found. Expression of AQP1 (Aquaglyceporin-1) and
47 MRPA (Multidrug-related protein A) genes were determined by quantitative real-time PCR,
48 observing the overexpression of both genes in clinical isolates. These results imply that
49 intraspecific variability of the isolates of *L. (L.) infantum* occurs to the trivalent antimony,
50 demonstrated by the phenotypic and molecular profile of the isolates the drug.

51 **Key words:** Visceral leishmaniasis. Antimony. Susceptibility. Aquaglyceporin

52

53 **1. Introdução**

54 A leishmaniose visceral (LV) é uma doença tropical negligenciada causada por *Leishmania*
55 (*Leishmania*) *donovani* no Velho Mundo e por *L. (L.) infantum* no Novo Mundo. Essa doença
56 é considerada a forma mais grave das leishmanioses, sendo altamente letal, se não tratada de
57 forma adequada [1]. A distribuição da LV na América do Sul é extensa, sendo o Brasil o país
58 com a maior incidência de novos casos [2]. A região Nordeste destaca-se no cenário
59 epidemiológico da doença por apresentar aproximadamente 67% dos casos do país,
60 considerando os últimos 26 anos de notificação realizados pelo Ministério da Saúde. O estado
61 do Maranhão possui o maior percentual de casos de LV da região, sendo que somente em
62 2017 foi notificado 714 casos, o que reforça essa situação como um grave problema de saúde
63 pública [3].

64 A quimioterapia continua representando a principal ferramenta de controle da doença, porém,
65 o arsenal terapêutico é bastante limitado. No Brasil, a primeira opção terapêutica para a LV é
66 administração do antimoniato de meglumina (Glucantime[®]), um composto pentavalente
67 contendo antimônio [4]. Porém, o antimônio pentavalente (Sb^{+5}) necessita de redução
68 biológica para a forma trivalente (Sb^{+3}) para exercer atividade leishmanicida, ocorrendo essa
69 redução tanto na célula hospedeira quanto intracelularmente no parasito [5]. O surgimento de
70 falhas terapêuticas e de recidivas clínicas tornaram-se grandes desvantagens no tratamento da
71 doença. Esses fenômenos possuem origem multifatorial que envolvem aspectos relacionados
72 ao hospedeiro (fatores imunológicos, genéticos e nutricionais), à droga (qualidade e
73 farmacocinética) e também ao parasita (resistência natural ou adquirida a drogas, aumento da
74 infectividade e a coinfeção com outros patógenos) [6].

75 A resistência medicamentosa em *Leishmania* tem sido reportado em várias regiões do mundo,
76 como no estado de Bihar, Índia, onde 65% dos pacientes infectados por *L. (L.) donovani* não
77 respondem ao tratamento antimonial [7]. No Brasil, casos refratários ao tratamento com
78 Glucantime[®] também já foram reportados, principalmente em pacientes com a forma
79 tegumentar da doença [8]. Esse fenômeno pode ocorrer devido a diferença intrínseca de
80 sensibilidade do parasito à droga, podendo agravar com o declínio da eficácia do fármaco [9].

81 Os mecanismos pelo qual *Leishmania* adquire resistência têm sido objeto de pesquisa há
82 várias décadas, podendo ocorrer por alterações na expressão de genes relacionados a
83 captação, efluxo e também sequestro do fármaco [10]. Uma regulação negativa na expressão
84 de aquagliceoporina-1 (*AQPI*) está correlacionada com a menor captação de Sb^{+3} , diminuindo
85 a concentração da droga dentro do parasito [11]. Por outro lado, a superexpressão da proteína
86 A de resistência a múltiplos fármacos (*MRPA*) está relacionada com o sequestro de complexos
87 de antimônio, conferindo resistência ao parasito [12]. O surgimento de isolados de
88 *Leishmania* spp. resistentes e também da propagação dessas cepas em área de endemia podem
89 contribuir para uma maior mortalidade em pacientes com leishmaniose visceral. Por isso, é
90 importante identificar isolados suscetíveis ou resistentes, assim como elucidar os possíveis
91 mecanismos utilizados por esses parasitos em resposta aos medicamentos. Portanto, neste
92 trabalho, objetivou-se realizar a caracterização fenotípica e molecular de isolados clínicos de
93 *L. (L.) infantum* de uma área endêmica de leishmaniose visceral do Brasil, o estado do
94 Maranhão.

95 **2. Material e Métodos**

96 **2.1 Aspectos éticos e obtenção dos isolados clínicos**

97 Os isolados clínicos de pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral, provenientes de
98 um Centro de Referência em Doenças Infectocontagiosas, São Luís, MA, foram obtidos
99 através de aspirado de medula óssea. Todos os isolados eram oriundos de pacientes que não
100 foram expostos ao tratamento antimonial com antimoniato de meglumina (Glucantime®). As
101 informações clínico-epidemiológicas desses pacientes encontram-se disponíveis na Tabela 1.
102 Os parasitos foram isolados através de diluição seriada do aspirado em placa de 24 poços e
103 em seguida foram congelados a -80°C para posterior utilização. Os isolados estão disponíveis
104 no biorrepositório do Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM/UFMA) e o
105 projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário da
106 Universidade Federal do Maranhão (HU/UFMA) sob N° 2.793.599.

107 **2.2 Fármaco**

108 O fármaco utilizado foi: o antimônio trivalente – tartarato de antimônio e potássio trihidratado
109 (Sigma, St. Louis, MO, EUA). A diluição da droga foi feita em água ultra-pura, sendo
110 armazenada a 4°C.

111 **2.3 Parasitas**

112 Os parasitas utilizados no estudo foram: a cepa referência de *L. (L.) infantum*
113 MHOM/BR/1970/BH46 e cinco isolados clínicos. O local de origem de cada isolado clínico
114 está indicado na Figura 1. As formas promastigotas foram mantidas *in vitro* em meio de
115 cultura Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino
116 inativado (Gibco®), 2% de urina masculina estéril, 10 U/mL de penicilina (Gibco®) e
117 10µg/mL de estreptomicina (Gibco®). As culturas foram mantidas em estufa a 25°C e os
118 repiques foram realizados semanalmente durante a fase logarítmica de crescimento dos
119 parasitos.

120 **2.4 Identificação molecular dos isolados clínicos**

121 O DNA total dos parasitos foi extraído utilizando o método fenol/clorofórmio/ álcool
122 isoamílico [13]. A detecção de DNA de *Leishmania* spp. foi realizada através da Reação em
123 Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando a região do espaçador transcrito interno 1 (ITS1), que

124 amplifica um fragmento de aproximadamente 300-350 pares de bases. As reações foram
125 realizadas de acordo com Schönian et al. (2003) [14], utilizando os iniciadores: LITSR 5'-
126 CTGGATATCATTTTCCGATG-3' e L5.8S 5'-TGATACCACTTATCGCACTT-3'. Os
127 ciclos de amplificação utilizados seguiram as recomendações de El Tai et al. (2001) [15]. Os
128 produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% (UltraPure™
129 Agarose, Invitrogen™).

130 A identificação das espécies de cada isolado clínico foi realizada através do método de PCR-
131 RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição). Os produtos amplificados
132 através da PCR-ITS1 foram submetidos a digestão enzimática utilizando a enzima de restrição
133 *HaeIII* (Promega™, MA, EUA) durante 2 horas a 37°C. Os fragmentos obtidos foram
134 analisados por eletroforese em gel de agarose 4% (UltraPure™ Agarose, Invitrogen™) e
135 comparados com controles positivos de *L. (L.) amazonensis* (IFLA/BR/1967/PH8), *L. (V.)*
136 *braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903), *L. (V.) lainsoni* (MHOM/BR/81/M6426), *L. (V.)*
137 *naiffi* (MDAS/BR/1979/M5533), *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1970/BH46) e *L. (L.)*
138 *mexicana* (MHOM/BZ/1982/BEL21).

139 **2.5 Atividade do antimônio trivalente contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum***

140 A atividade do fármaco contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foi avaliada
141 utilizando o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). O
142 protocolo utilizado foi previamente descrito por Zauli-Nascimento et al (2010) [16]. Os
143 parasitos foram plaqueados a uma densidade de 2×10^6 promastigotas/poço e incubados em
144 uma série crescente do fármaco (0, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 μ M e 1mM) durante 48
145 horas a 25°C. Após esse período foi adicionado 30 μ L de MTT (5mg/mL) (Sigma, St. Louis,
146 MO, EUA), e após 3 horas, a reação foi interrompida utilizando 50 μ L de SDS (docedil sulfato
147 de sódio) 20%. A leitura da densidade óptica (D.O) foi feita por espectrometria no leitor de
148 microplacas Epoch™, BioTek®, medindo-se a absorbância em 595nm, utilizando como
149 referência o comprimento 690nm. Os ensaios foram realizados em triplicada e repetidos
150 independentemente duas vezes. Os valores de IC₅₀ (concentração da droga que inibe a
151 viabilidade celular em 50%) foram determinados através de curvas de regressão sigmoide
152 utilizando o programa GraphPad Prism® 5.0.

153

154

155 **2.6 Ensaios de infecção de *L. (L.) infantum* em macrófagos**

156 Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas
157 redondas estéreis. As células foram plaqueadas a uma densidade de 3×10^5 macrófagos/poço
158 em presença de meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e incubadas por 24 horas em
159 estufa a 37°C e 5% CO₂. As células não aderidas foram retiradas com PBS estéril 1X. Os
160 macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) infantum* em uma
161 proporção de 20:1 (parasitas:macrófago) por 24 horas. Após esse período, os poços foram
162 lavados duas vezes com PBS estéril 1X para a remoção dos parasitas não internalizados,
163 fixados com metanol e corados com o Kit Instant Prov (NewProv, Paraná, Brasil) segundo as
164 orientações do fabricante. As lâminas preparadas foram observadas em microscópio óptico,
165 avaliando 100 macrófagos por lâmina, identificando as células infectadas e o número de
166 amastigotas em cada macrófago. Os ensaios foram realizados em triplicada e repetidos
167 independentemente duas vezes. O percentual de infecção e o índice de infecção foram
168 determinados utilizando o programa GraphPad Prism[®] 5.0.

169 **2.7 Extração de RNA e síntese de cDNA**

170 O RNA total de promastigotas (1×10^8 /mL), fase logarítmica de crescimento, foi extraído
171 utilizando o método TRIzol[™] (Thermo Fisher, MA, EUA) conforme descrito pelo fabricante.
172 A concentração do RNA extraído foi avaliada usando o espectrofotômetro Nanodrop
173 2000/2000c (Spectrophotometer, Uniscience), sendo consideradas para síntese de DNA
174 complementar (cDNA) as amostras que apresentaram concentração ≥ 100 ng/ μ L. Para a
175 síntese de cDNA foi utilizado o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo
176 Fisher, MA, USA) utilizando o sistema *Random Primer* de acordo com as especificações do
177 fabricante.

178 **2.8 Expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real**

179 As reações de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foram realizadas utilizando o sistema
180 Platinum[®] SYBR[®] Green (Invitrogen[™], Life Technologies[™]) de acordo com a
181 recomendações do fabricante. As sequencias dos iniciadores dos alvos utilizados foram *AQPI*
182 *Forward* 5'- TGG CTA TTG GAC TAC TGT TG -3' e *Reverse* 5' - GGT GGA ATG ATG
183 AAA AAG AC-3' e do gene *MRPA* *Forward* 5'- GAG GGT GTG CAG ATG CGG TA-3' e
184 *Reverse* 5'- CAT GAA CGT CAG CAG CAG CG -3' [17]. Os níveis de expressão gênica
185 foram normalizados utilizando o gene constitutivo gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

186 (*GAPDH*) *Forward* 5'- GAA GTA CAC GGT GGA GGC TG-3' e *Reverse* 5'- CGC TGA
187 TCA CGA CCT TCT TC-3' [18] . As reações foram realizadas independentemente duas
188 vezes em triplicata. A expressão relativa foi calculada segundo Livak & Schmittgen (2001)
189 [19]. Os genes que apresentaram $-2 \leq \textit{fold change} \leq 2$ foram considerados diferencialmente
190 expressos.

191

192 **2.9 Análise estatística**

193 As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism v.5.0., CA,
194 EUA. O teste de variância *One-Way* ANOVA seguido do pós-teste de comparações múltiplas
195 de Tukey foram utilizados para analisar diferenças entre os valores de IC₅₀ dos isolados e para
196 as análises de correlação entre duas variáveis foi utilizado o teste de Spearman. O valor de
197 $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo em todas as análises.

198

199 **3. Resultados**

200 **3.1 Identificação dos isolados clínicos**

201 O método de PCR-RFLP foi adotado como uma ferramenta para identificar as espécies dos
202 isolados clínicos. Entre as amostras analisadas, foi observada amplificação do fragmento ITS1
203 de aproximadamente 300-350bp, variando em tamanho para as diferentes espécies de
204 *Leishmania* (Figura 2A). A digestão do fragmento obtido confirmou que todos os isolados
205 clínicos analisados pertenciam à espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (Figura 2B).

206 **3.2 Suscetibilidade dos isolados de *L. (L.) infantum* ao antimônio trivalente**

207 Os valores de IC₅₀ de Sb⁺³ contra promastigotas dos isolados clínicos e da cepa de referência
208 MHOM/BR/1970/BH46 variaram de $66,2 \pm 9,8$ a $133,8 \pm 14,1 \mu\text{M}$, apresentando mediana de
209 $114,6 \mu\text{M}$. Entre os isolados clínicos, somente o PV008 apresentou valor de IC₅₀ superior ao
210 da cepa de referência, porém, esse valor não foi estatisticamente significativo. Em relação ao
211 perfil de sensibilidade ao Sb⁺³, os isolados PV017 e PV008 foram, respectivamente, o mais e
212 o menos sensível ao fármaco, com o valor de IC₅₀ variando aproximadamente 2,00 vezes,
213 observando diferença significativa entre esses dois isolados ($p < 0,01$ ANOVA seguido do
214 pós-teste de *Tukey*). Além disso, quando comparado o valor de IC₅₀ entre os demais isolados

215 clínicos, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o isolado PV006 em
216 relação ao PV017 ($p < 0,05$ ANOVA seguido do pós-teste de *Tukey*). O índice de resistência
217 para cada isolado foi calculado observando uma variação de 0,53 a 1,10 vezes (Tabela 2).

218

219 **3.2 Taxa de infecção e infectividade dos isolados de *L. (L.) infantum***

220 A figura 3 mostra os perfis de infecção de cada isolado e a correlação desta variável à
221 sensibilidade ao Sb^{+3} . Observou-se que as taxas de infecção dos isolados de *L. (L.) infantum*
222 variaram de 59% a 81% (Figura 3A). O índice de infectividade também apresentou variação,
223 observando uma razão do número de amastigotas por macrófago de 3,4 e 5,6 para o isolado
224 mais e menos infeccioso, respectivamente. O número total de amastigotas intracelulares para
225 cada isolado está presente na Figura 3B. Uma correlação positiva forte foi observada entre o
226 índice de infectividade e a taxa de infecção ($r = 0,9856$; $P = 0,002$ correlação de *Spearman*)
227 (Figura 3C), observando diferença estatisticamente significativa. Quando correlacionada as
228 variáveis de taxa de infecção e suscetibilidade ao Sb^{+3} foi observada uma correlação positiva
229 moderada ($r = 0,5218$; $P = 0,297$ correlação de *Spearman*), porém, não foi estatisticamente
230 significativa (Figura 3D).

231 **3.3 Análise de expressão gênica de *AQPI* e *MRPA***

232 O gene *AQPI* estava superexpresso em todos os isolados clínicos, apresentando nível de
233 expressão na ordem de 10^7 cópias de mRNA transcrito (Figura 4). O gene *MRPA* também
234 estava diferencialmente expresso nos isolados clínicos (Figura 5), com exceção do isolado
235 PV017 que apresentou expressão abaixo do critério utilizado no estudo ($-2 \leq \text{fold change} \leq 2$).
236 Os níveis de expressão de *MRPA* é 2 a 3,4 vezes maiores quando comparado a expressão do
237 gene na cepa de referência MHOM/BR/1970/BH46. Porém, estes níveis de expressão de
238 *MRPA* estavam comparativamente mais baixos que os apresentados por *AQPI*.

239

240 **4. Discussão**

241 O Maranhão representa o segundo estado com a maior endemicidade para a LV no Brasil,
242 superado somente por Minas Gerais. Em 2017, o estado foi responsável por 39% dos casos
243 notificados da doença na região Nordeste e por apresentar cerca de 19,2% do número de

244 óbitos causados pela LV no país [3]. A importância dessa doença para a saúde pública deve-se
245 principalmente pelas suas altas taxas de letalidade. Diante disso, a busca de novas alternativas
246 para o controle da doença se tornou recorrente. O antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) é
247 droga de primeira linha para tratamento da LV no Brasil. Porém, o surgimento de falhas
248 terapêuticas e da ocorrência de resistência a esse fármaco tornaram-se frequentes em áreas de
249 endemia da doença, tornando-se variáveis preocupantes [2, 20]. Devido a escassez de dados
250 referentes a caracterização de isolados do Maranhão de pacientes com LV o presente trabalho
251 foi desenvolvido, sendo realizado um estudo inicial com 5 isolados clínicos.

252 Os isolados clínicos utilizados no estudo foram provenientes de pacientes diagnosticados com
253 LV através de exame clínico e também de confirmação laboratorial por meio de exames
254 parasitológicos. Esses métodos considerados convencionais são rápidos e econômicos, porém,
255 suas sensibilidades são variáveis [21]. Desse modo, foi utilizado a PCR como um método
256 molecular de diagnóstico para corroborar com a anamnese clínica e também para discriminar
257 a espécie de *Leishmania*. A PCR tem sido relatada como de alta sensibilidade no diagnóstico
258 das leishmanioses e isso está correlacionado principalmente com a eficiência de amplificação
259 da região alvo [22]. Entretanto, não há um alvo padronizado para a realização do ensaio,
260 sendo diferentes regiões genômicas utilizadas [23]. A região do espaçador do transcrito
261 interno 1 (ITS-1) foi o alvo utilizado no estudo, sendo possível verificar a amplificação dessa
262 região em todas as amostras dos isolados clínicos, mostrando-se também eficaz na
263 discriminação da espécie, após a digestão enzimática por *Hae*III. Esse alvo possui alta
264 sensibilidade e especificidade em casos de LV [24] e os resultados encontrados demonstram
265 similaridade com o previsto na literatura.

266 A utilização da formulação de antimônio trivalente em formas promastigotas contrapõe-se
267 com a utilizada por Azeredo-Coutinho et al. (2007) [25], no qual utilizou o Glucantime[®],
268 formulação pentavalente, para verificar a sensibilidade de diferentes espécies de *Leishmania*.
269 O presente trabalho utilizou o Sb^{+3} nos ensaios de sensibilidade devido ao Sb^{+5} não apresentar
270 atividade leishmanicida em formas promastigotas, atuando somente em amastigotas do
271 parasito [26]. Encontrou-se uma variação na sensibilidade dos isolados de *L. (L.) infantum* ao
272 Sb^{+3} , como esperado com base na variabilidade intrínseca que as espécies de *Leishmania*
273 possuem aos antimoniais [9]. Observou-se que o valor de IC_{50} da cepa de referência
274 MHOM/BR/1970/BH46 foi de $125,1 \pm 1,5\mu M$, este achado opõe-se com o IC_{50} encontrado
275 por Liarte & Murta (2010) [27] que encontraram o valor de IC_{50} de $0,33 \pm 0,09\mu M$ para a

276 cepa de referência MHOM/BR/74/PP75, ambas cepas de *L. (L.) infantum*. Essa diferença
277 entre os valores de IC₅₀ pode ser explicada devido a distintas metodologias empregadas nos
278 ensaios de suscetibilidade, bem como o tempo de exposição a droga, as concentrações de
279 Sb⁺³, o tipo de ensaio de viabilidade celular e as diferentes cepas utilizadas.

280 Uma variação intraespecífica da sensibilidade dos isolados clínicos ao Sb⁺³ também foi
281 observada, com valores que variaram de 66,2 ± 9,8 a 133,8 ± 14,1 μM. Estes resultados
282 também mostram que as formas promastigotas de isolados de *L. (L.) infantum* possuem uma
283 maior variação de suscetibilidade e tolerância ao Sb⁺³ que isolados de *L. (L.) donovani*,
284 espécie causadora da LV no Velho Mundo, que apresentaram variação de 22,4 ± 4 a 97,8 ±
285 19,9 μM em um estudo realizado no Nepal [28]. Quando comparado a outra espécie do
286 subgênero *Leishmania*, observou-se que valor médio de IC₅₀ dos isolados de *L. (L.) infantum*
287 do presente estudo também era maior que o valor de *L. (L.) amazonensis*, que apresentou IC₅₀
288 de 83 μM [18]. Ademais, os isolados PV007, PV009 e PV017, provenientes de pacientes
289 LV/HIV, apresentaram valores de IC₅₀ menores que o isolado do paciente sem coinfeção, o
290 isolado PV006. Esses resultados discordam com um estudo que demonstrou que isolados de
291 pacientes coinfectados são mais tolerantes ao Sb⁺³ que isolados de pacientes sem coinfeção
292 [29], porém, é importante ressaltar que devido a representação de um único paciente não
293 coinfectado no estudo não há como inferir relação entre suscetibilidade e coinfeção. O índice
294 de resistência também foi avaliado, observando um valor de 0,53 para o isolado mais sensível
295 e 1,10 para o mais tolerante ao Sb⁺³. Esse parâmetro é importante para demonstrar a razão de
296 resistência de um isolado a um determinado fármaco.

297 Um modelo de infecção com macrófagos RAW 264.7 foi utilizado no estudo para avaliar a
298 taxa de infecção e o índice de infectividade para cada isolado. Esse modelo foi previamente
299 estabelecido e utilizado em estudos anteriores com *L. (L.) infantum* [30,31]. A taxa de
300 infecção dos isolados variou entre 59% a 81%. Essa variação pode ser explicada devido a
301 diferença no potencial de infecção por *Leishmania* em diferentes modelos de linhagens
302 celulares de macrófagos, sendo os derivados de medula óssea os mais permissíveis a infecção
303 [16]. Além disso, já foi demonstrado que ocorre uma variabilidade intraespecífica referente a
304 infectividade, como já foi observado em isolados de *L. (V.) braziliensis* [32], acreditando que
305 essa variação também pode ocorrer em *L. (L.) infantum*. Adicionalmente, alguns estudos já
306 demonstraram que parasitos que possuem fenótipo de resistência podem perder sua aptidão de

307 infecção [33], no entanto, a correlação entre o perfil de suscetibilidade e o potencial de
308 infecção não foi estatisticamente significativa no presente estudo.

309 Os níveis de expressão dos genes *AQPI* e *MRPA*, relacionados a resistência ao antimônio,
310 foram avaliados através de PCR quantitativa em tempo real. O transportador *AQPI* foi
311 identificado como um canal de membrana que medeia a captação de Sb^{+3} e é considerado
312 como um forte modulador na sensibilidade do parasito à drogas [34]. A baixa expressão de
313 *AQPI* é observada em cepas resistente ao antimônio, enquanto que sua superexpressão leva
314 ao parasito ter hipersensibilidade a droga [35]. No presentes estudo, a superexpressão desse
315 gene foi observada em todos os isolados clínicos, o que reforça o papel desse gene na
316 suscetibilidade ao antimônio. Esses dados corroboram com os resultados obtidos na Tabela 2,
317 demonstrando que o isolados são fenotipicamente sensíveis ao Sb^{+3} . Resultados semelhantes
318 foram demonstrados em um estudo anterior, no qual foi observado a superexpressão do gene
319 *AQPI* em isolados clínicos de *L. (L.) major* sensíveis a antimônio [36].

320 Curiosamente, a superexpressão de *MRPA* também foi observada nos isolados clínicos. Esse
321 gene codifica um transportador que confere resistência ao antimônio através do sequestro de
322 conjugados Sb -tiol em vesículas intracelulares, sendo que a regulação positiva desse gene já
323 foi observada em várias cepas de *Leishmania* resistentes a droga [37]. Os resultados
324 encontrados neste estudo contrastam-se ao demonstrado na literatura, uma vez que os isolados
325 clínicos analisados demonstraram serem sensíveis ao Sb^{+3} . Uma possível explicação para esse
326 fenômeno, poderia ser devido a ocorrência de mutações que podem ter afetado o nível de
327 expressão do gene ou até mesmo na eficiência do produto codificado, destacando que nem
328 sempre os níveis de expressão gênica refletem à característica fenotípica apresentada, pois
329 possíveis eventos pós-transcricionais e pós-transducionais podem ocorrer. Além disso, é
330 importante salientar que *Leishmania* possui expressão estágio regulada, o que destaca a
331 importância de analisar a expressão desse transportador em amastigotas intracelulares, para
332 verificar uma possível correlação com a suscetibilidade ao fármaco [38]. Os resultados
333 encontrados no presente trabalho diferem-se aos encontrados em estudos anteriores, estes
334 demonstraram a superexpressão de um transportador que conferia sensibilidade a antimônio
335 em isolados clínicos resistentes [36, 39], enquanto que os resultados encontrados neste
336 trabalho indicaram o perfil oposto, a superexpressão de um transportador que confere
337 resistência em isolados sensíveis a Sb^{+3} .

338 Os resultados obtidos mostraram uma variabilidade fenotípica dos isolados de *L. (L.) infantum*
339 de pacientes do estado do Maranhão. Faz-se necessário caracterizar um número maior de
340 isolados clínicos, afim de compreender melhor essa variabilidade, principalmente no que se
341 refere a suscetibilidade dessas cepas à drogas. Ressalta-se o pioneirismo deste trabalho, pois é
342 a primeira investigação de isolados clínicos de *L. (L.) infantum* do estado. Este trabalho
343 demonstra a sua contribuição para a saúde pública, uma vez que a caracterização de isolados
344 clínicos pode aumentar o sucesso quimioterápico dos pacientes com leishmaniose.

345 **5. Conclusões**

346 Através deste estudo, foi possível observar uma variabilidade intraespecífica dos isolados
347 clínicos de *L. (L.) infantum* provenientes do estado do Maranhão. Esses isolados foram
348 caracterizados como fenotipicamente sensíveis ao antimônio trivalente e apresentaram uma
349 variação quanto ao seu potencial de infecção em um modelo experimental de macrófagos. A
350 caracterização molecular demonstrou uma superexpressão do gene *AQPI*, o que é esperado
351 em cepas suscetíveis aos antimoniais.

352

353 **Fomento**

354 Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento
355 Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA.

356

357 **Referências bibliográficas**

358 [1] Guerin P J, Olliaro P, Sundar S, Boelaert M, Croft S L, et al. Visceral leishmaniasis: current status of
359 control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* 2002;
360 2:494-501.

361 [2] Torres D C, Ribeiro-Alves M, Romero G A, Dávilla A M, Cupolillo E. Assessment of drug resistance related
362 genes as candidate markers for treatment outcome prediction of cutaneous leishmaniasis in Brazil. *Acta Trop.*
363 2013; 126:132–141.

364 [3] Brasil. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]. Ministério da Saúde,
365 Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. 2018.

- 366 [4] Moreira D S, Monte-Neto R L, Andrade J M, Santi A M, Reis P G, et al. Molecular characterization of the
367 MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to
368 antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2013; 3:143-153
- 369 [5] Frézard F, Demicheli C, Ribeiro R R. Pentavalents antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules.*
370 2009; 14:2317-2336.
- 371 [6] Vanaerschot M, Dumetz F, Roy S, Ponte-Sucre A, Avarelo J, et al. Treatment failure in leishmaniasis: drug-
372 resistance or another (epi-) phenotype. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014; 12:937-946.
- 373 [7] Sundar S, More D K, Singh M K, Singh V P, Sharma S, et al. Failure of pentavalent antimony in visceral
374 leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:1503-1106
- 375 [8] Romera G A, Guerra M V, Paes M G, Macêdo V O. Comparasion of cutaneous leishmaniasis due to
376 *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine
377 antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65:456-465.
- 378 [9] Da Luz R I, Vermeersch M, Dujardin J, Cos P, Maes L. In vitro sensitivity testing of *Leishmania* clinical
379 field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. *Antimicrob*
380 *Agents and Chemother.* 2009; 53:5197-5203.
- 381 [10] Jeddi F, Piarroux R, Mary C. Antimony resistance in *Leishmania*, focusing on experimental research. *J Trop*
382 *Med.* 2011; 2011:1-15.
- 383 [11] Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Assessing aquaglyceporin gene status and
384 expression profile in antimony-susceptible and-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *J*
385 *Antimicrob Chemother.* 2010; 65:496-507.
- 386 [12] Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Int Health.*
387 2001; 6:874-882.
- 388 [13] Sambrooke J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* Cold Spring Laboratory
389 Press, New York. 2ed.1989.
- 390 [14] Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig H D, et al. PCR diagnosis and
391 characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003; 47:
392 349-58.
- 393 [15] El Tai N O, El Fari M, Mauricio I, Miles M A, Oskam L, et al. *Leishmania donovani*: intraspecific
394 polymorphisms of Sudanese isolates revealed by PCR based analyses and DNA sequencing. *Exper Parasitol.*
395 2001; 97: 35-44.
- 396 [16] Zauli-Nascimento R C, Miguel D C, Yokoyama-Yasunaka J K, Pereira L I, Pelli de Oliveira M A, et al. In
397 vitro sensitivity of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* Brazilian
398 isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2010; 15:68-76.

- 399 [17] Jeedi F, Mary C, Aoun K, Harrat Z, Bouratbine A, et al. Heterogeneity of molecular resistance patterns in
400 antimony-resistant field isolates of *Leishmania* species from the western Mediterranean area. *Antimicrob Agents*
401 *Chemother.* 2014; 58:4866-4874.
- 402 [18] Monte-Neto R L, Coelho A C, Raymond F, Légaré D, Corbeil J, et al. Gene expression profiling and
403 molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;
404 5:e1167.
- 405 [19] Livak K J, Schmittgen, T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and
406 the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. *Methods.* 2001; 25:402–408.
- 407 [20] Croft S L, Sundar S, Fairlamb, A H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:111-
408 126.
- 409 [21] Fraga J, Veland N, Montalvo A M, Praet N, Boggild A K, et al. Accurate and rapid species typing from
410 cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of New World. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 74:142-
411 150.
- 412 [22] Montalvo A M, Fraga J, Maes I, Dujardin J C, Van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat-
413 shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;
414 31:1453-1461.
- 415 [23] Rotureau B, Ravel C, Couppie F, Pratlong F, Nacher M, et al. Use of PCR-restriction fragment length
416 polymorphism analysis to identify the main new world *Leishmania* species and analyze their taxonomic
417 properties and polymorphism by application of the assay to clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2006; 44:459-
418 467.7
- 419 [24] Ismail S K, Fadime E, Soner U, Derya A. A comparative analysis of different molecular targets using PCR
420 for diagnosis of Old World Leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 2016; 164:43-48.
- 421 [25] Azeredo-Coutinho R B, Mendonça S C, Callahan H, Portal AC, Max G. Sensitivity of *Leishmania*
422 *braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (Glucantime) is higher than that of other *Leishmania*
423 species and correlates with response to therapy in American tegumentary leishmaniasis. *J Parasitol.* 2007; 93:
424 688–693.
- 425 [26] Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony
426 against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999; 43:278–282.
- 427 [27] Liarte D B, Murta S M F. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-
428 resistant populations of four New World *Leishmania* species. *Parasitol Res.* 2010; 107:205-212.7
- 429 [28] Dumetz F, Cuypers B, Imamura H, Zander D, D’Haenens E, et al. Molecular preadaptation to antimony
430 resistance in *Leishmania donovani* on the Indian Subcontinent. *mSphere.* 2018; 3:e00548-17.

431 [29] Inocência da Luz R, Romero G A, Dorval M E, Cruz I, Cañavate C, et al. Drug susceptibility of *Leishmania*
432 *infantum* (syn, *Leishmania chagasi*) isolates from Brazilian HIV-positive and HIV-negative patients. *J*
433 *Antimicrob Chemother.* 2011; 66:667-669.

434 [30] Carrió J, Colmenares M, Riera C, Gállego M, Arboix M, et al. *Leishmania infantum*: stage-specific activity
435 of pentavalent antimony related with assay conditions. *Exp Parasitol.* 2000; 95:209-214.

436 [31] Carrió J, Riera C, Gállego M, Ribera E, Pórtus M. In vitro susceptibility of *Leishmania infantum* to
437 meglumine antimoniate in isolates from repeated leishmaniasis episodes in HIV-coinfected patients. *J*
438 *Antimicrob Chemother.* 2001; 47:120-121.

439 [32] Espada C R, Ribeiro-Dias F, Dorta M L, Pereira L I, Carvalho E M, et al. Susceptibility to Miltefosine
440 Brazilian clinical isolates of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 2017. 96:656-659.

441 [33] Natera S, Machuca C, Pádrón-Nieves M, Romero A, Díaz E, et al. *Leishmania* spp: proficiency of drug-
442 resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:637-642.

443 [34] Marquis N, Gourbal B, Rosen B P, Mukhopadhyay R, Ouellette M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1
444 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* 2005; 57:1690–1699.

445 [35] Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, et al. Drug uptake and modulation of drug
446 resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem.* 2004; 279: 31010–31017.

447 [36] Eslami G, Zarchi M V, Moradi A, Hejazi S H, Sohrevardi S M, et al. Aquaglyceroporin-1 gene expression in
448 antimony resistance and susceptible *Leishmania major* isolates. *J Vector Borne Dis.* 2016; 53:370-374.

449 [37] L'égaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof Y D, Rosen B P, et al. The *Leishmania* ATP-binding
450 cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276:26301-26307.

451 [38] Drummelsmith J, Brochu V, Girard I, Messier N, Ouellette M. Proteome mapping of the protozoan parasite
452 *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics.* 2003;
453 2:146-155.

454 [39] Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake
455 in antimonyresistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 79: 69–75.

456

457

458

459

460

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica do local de origem dos isolados clínicos no estado do Maranhão. Mapa gerado a partir do software QGIS 3.2.2

Figura 2. Identificação molecular dos isolados clínicos. Em (A) gel de agarose 1%, mostrando os produtos amplificados para o fragmento do gene *ITS-1* de *Leishmania* spp. E em (B) gel de agarose 4%, mostrando os perfis de restrição dos produtos utilizando a enzima *HaeIII*. M – marcador molecular de 100bp; 1 – controle positivo de *L. (L.) amazonensis*; 2 – controle positivo de *L. (V.) braziliensis*; 3 – controle positivo de *L. (V.) lainsoni*; 4 – controle positivo de *L. (L.) mexicana*; 5 – controle positivo de *L. (V.) naiffi*; 6 – controle positivo de *L. (L.) infantum*; 7 – isolado PV006; 8 – isolado PV007; 9 – isolado PV008; 10 – isolado PV009; 11 – isolado PV017; 12 – controle negativo; as setas horizontais (←) indicam os fragmentos obidos após digestão enzimática por *HaeIII*.

Figura 3. Perfil de infecção dos isolados clínicos e correlações. Em (A) a taxa de infecção de cada isolado de *L. (L.) infantum*; (B) índice de infectividade de cada isolado, com o número total de amastigotas intracelulares; (C) correlação entre índice de infectividade e a taxa de infecção; (D) correlação entre taxa de infecção e suscetibilidade ao Sb^{+3} . C.R – cepa de referencia MHOM/1970/BR/BH46. *r* – correlação de Spearman.

Figura 4. Expressão relativa de mRNA do gene AQP1 dos isolados clínicos de *L. (L.) infantum*. Os genes que apresentaram $-2 \leq \text{fold change} \leq 2$ foram considerados diferencialmente expressos.

Figura 5. Expressão relativa de mRNA do gene MRPA dos isolados clínicos de *L. (L.) infantum*. Os genes que apresentaram $-2 \leq \text{fold change} \leq 2$ foram considerados diferencialmente expressos.

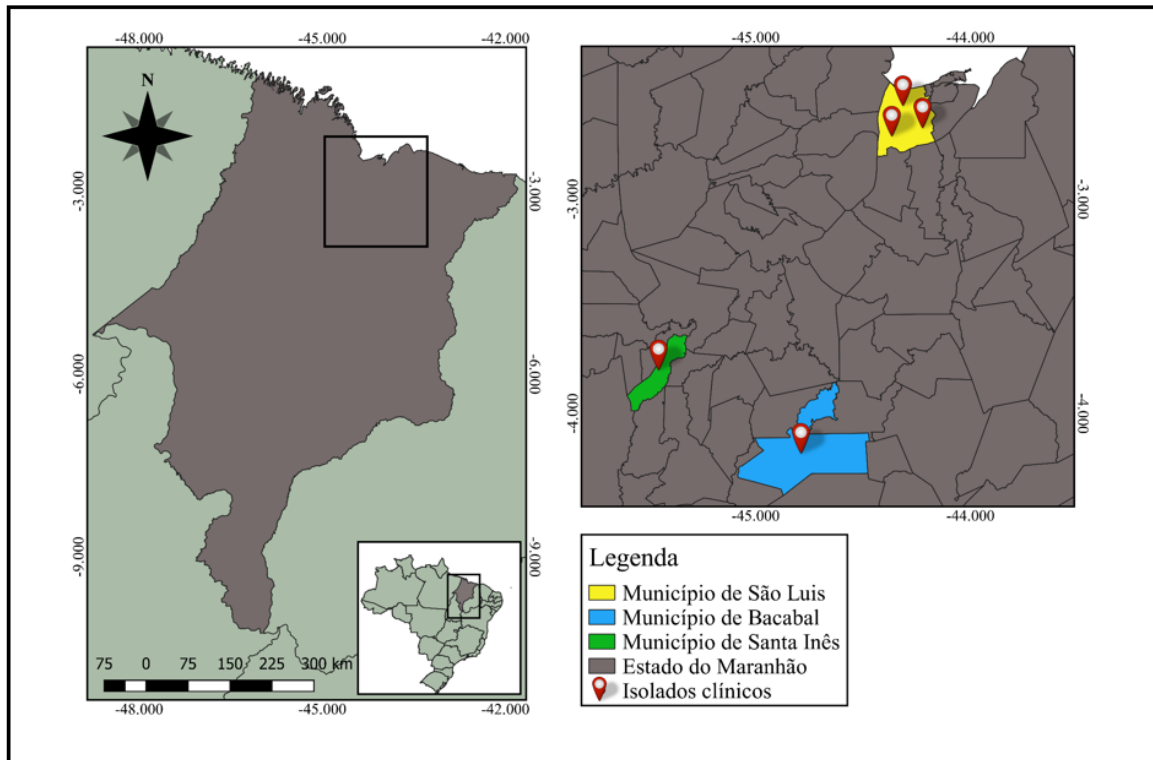


Figura 1.

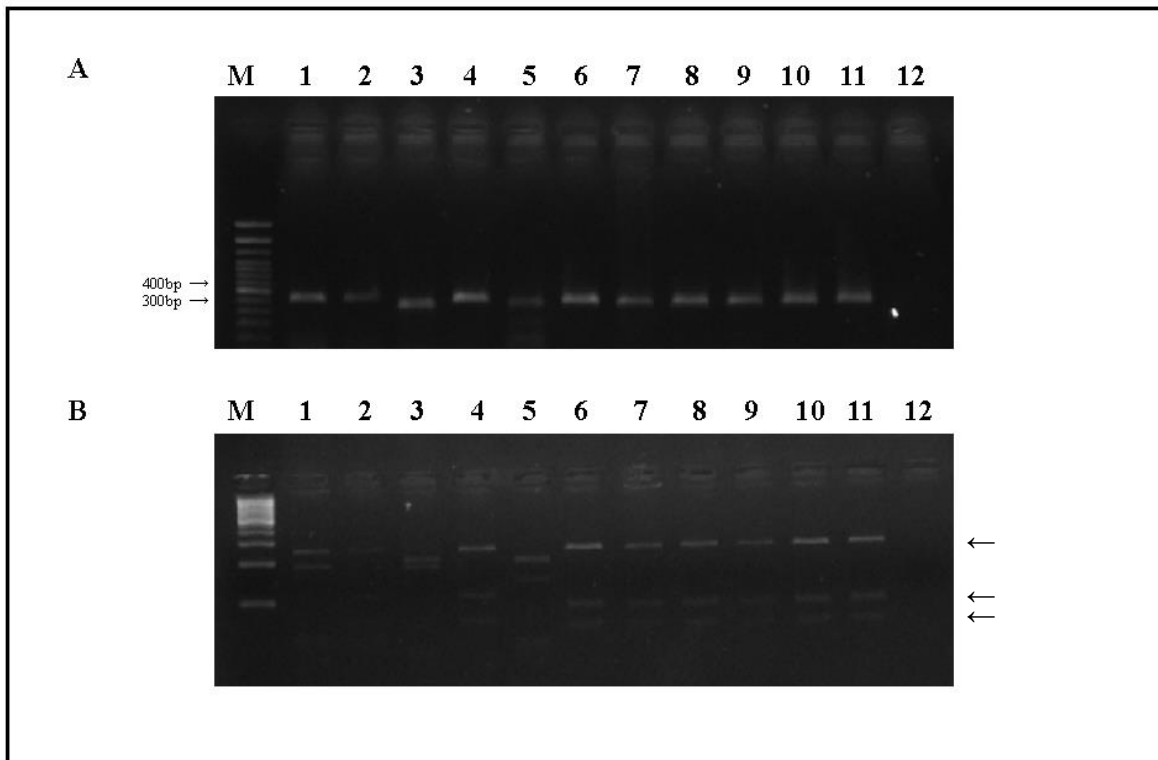


Figura 2.

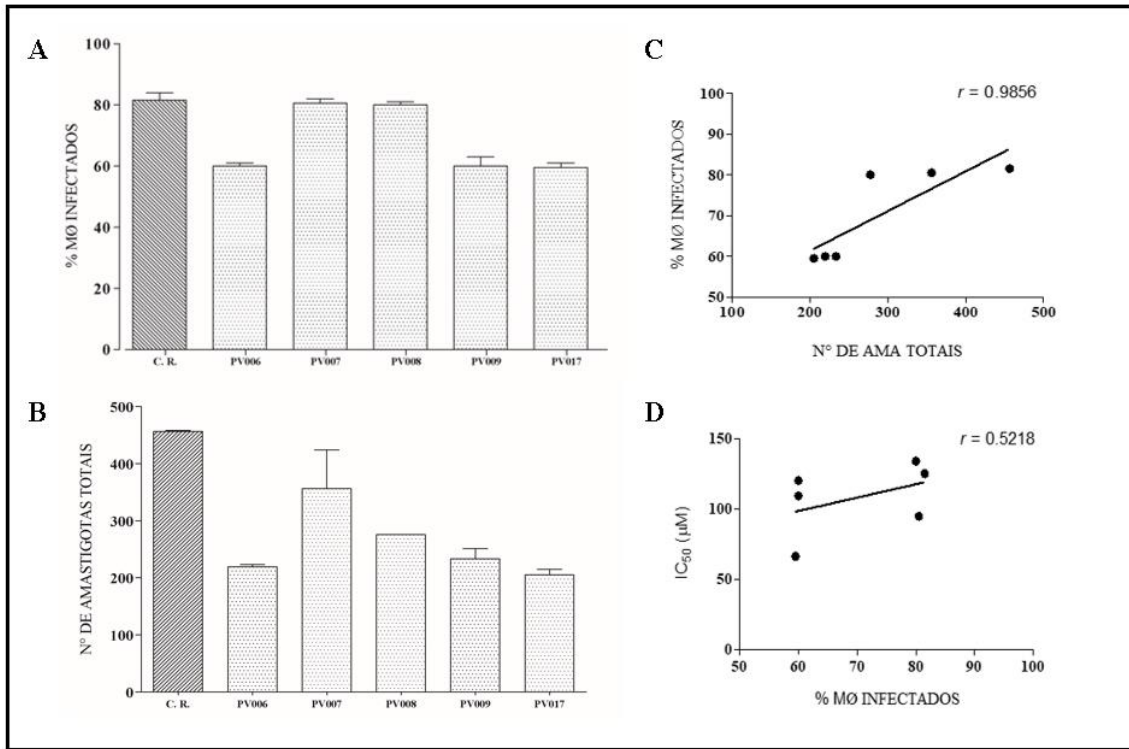


Figura 3.

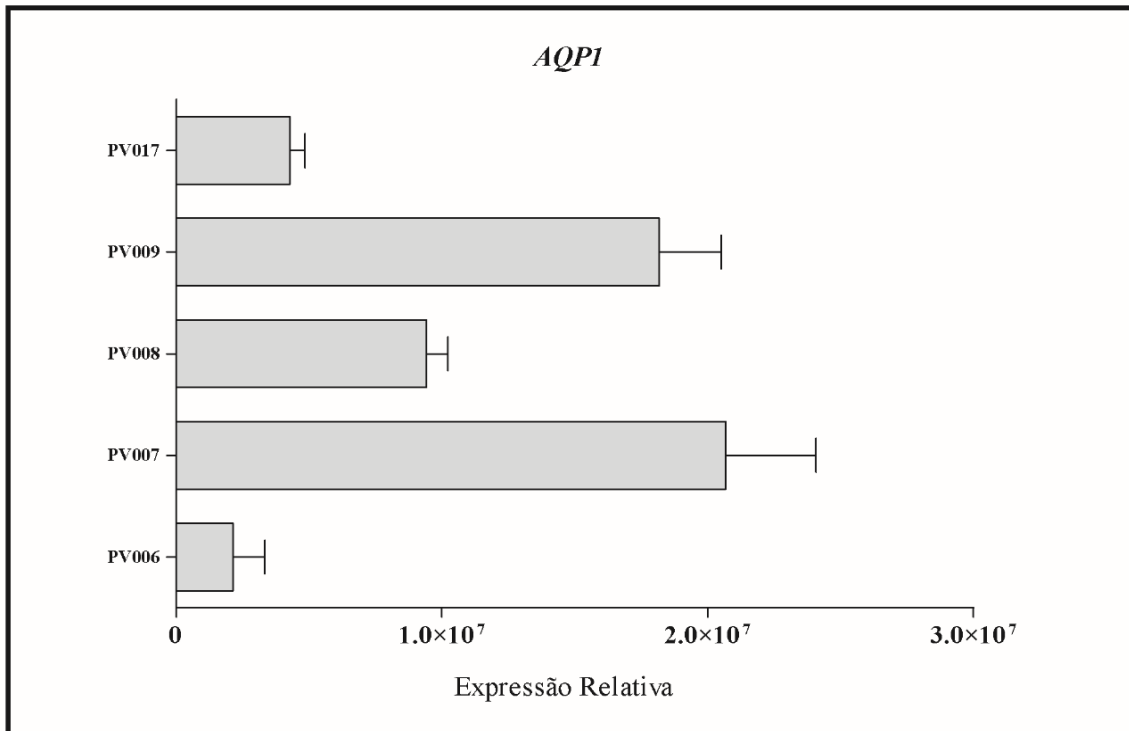


Figura 4.

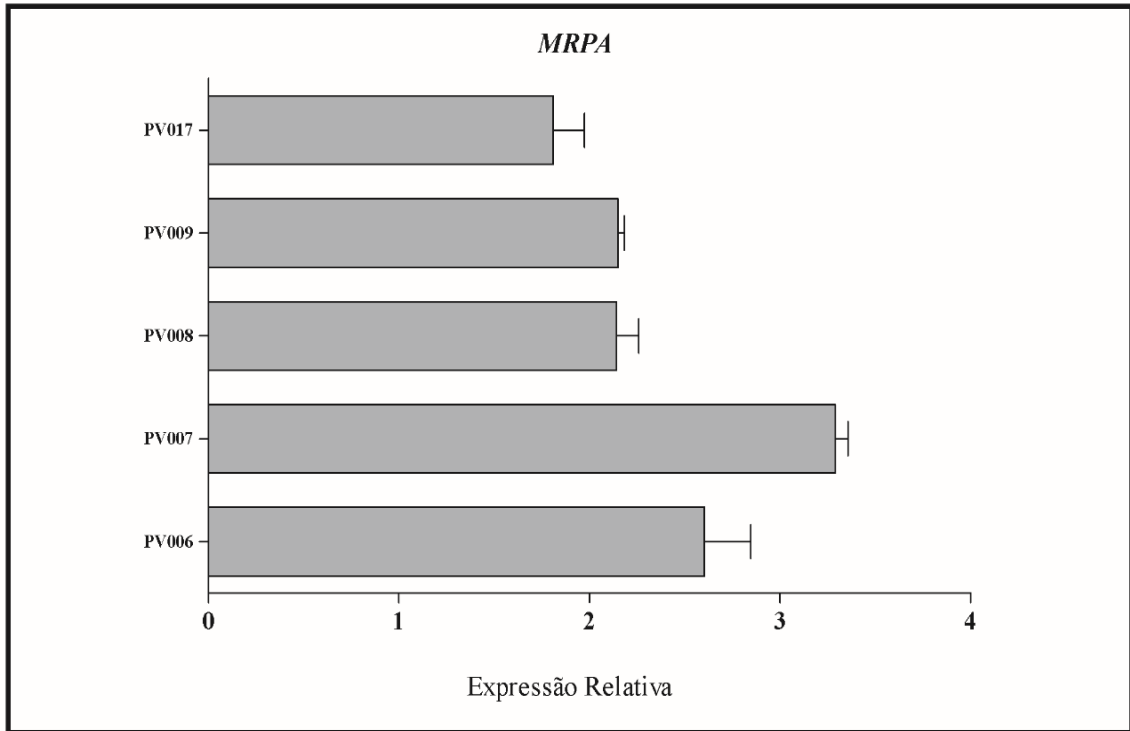


Figura 5.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações clínico-epidemiológicas dos pacientes com leishmaniose visceral.

Tabela 2. Suscetibilidade de isolados de *L. (L.) infantum* ao Sb⁺³

Tabela 1.

Isolado	Local de moradia	Idade	Manifestação clínica	Coinfecção <i>Leishmania</i> /HIV	Tratamento
PV006/LFFS	São Luís	37 anos	LV	Negativo	ND
PV007/LCS	São Luís	32 anos	LV	Positivo	AmBisome [®]
PV008/RMN	Santa Inês	47 anos	LV	Positivo	AmBisome [®]
PV009/ASFF	Bacabal	41 anos	LV	Positivo	AmBisome [®] (Abandono)
PV017/JPM	São Luís	24 anos	LV	Positivo	AmBisome [®] (2 ^o ciclo terapêutico)

LV – leishmaniose visceral; ND – não determinado; AmBisome[®] - anfotericina lipossomal

Tabela 2.

Isolado	Promastigotas	
	IC ₅₀ ± DP (µM)	IR
MHOM/BR/1970/BH46	125.1 ± 1.5 ^a	1.00
PV006/LFFS	120 ± 5.3 ^b	0.96
PV007/LCS	94.7 ± 0.8	0.76
PV008/RMN	133.8 ± 14.1 ^c	1.10
PV009/ASFF	109.2 ± 6.2	0.87
PV017/JPM	66.2 ± 9.8 ^{a, b, c}	0.53

Média de dois experimentos independentes realizados em triplicata. IR: índice de resistência – a razão entre o valor de IC₅₀ do isolado clínico e da cepa de referência. *a* e *b* – * ($p < 0,05$ ANOVA seguido do pós-teste de Tukey); *c* – ** ($p < 0,01$ ANOVA seguido do pós-teste de Tukey).



INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS

Official journal of the [International Society of Antimicrobial Chemotherapy](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0924-8579

DESCRIPTION

The *International Journal of Antimicrobial Agents* provides comprehensive and up-to-date peer reviewed reference information on the physical, pharmacological, *in vitro* and clinical properties of individual **antimicrobial agents** (**antiviral** agents, **antiparasitic** agents, **antibacterial** agents, **antifungal** agents, etc.). In addition, the journal signals new trends and developments in the field through highly authoritative review articles on antimicrobial agents. Special attention is given to articles providing insight into the problems of **antimicrobial resistance** both in the hospital and in the community. Both solicited reviews by top experts in the mentioned fields and high-quality original research papers are published.

Additional information on the ISAC and its activities can be found at the ISAC Web site at: <http://www.ischemo.org>

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Clinical Microbiologists, Pharmacists, Pharmaceutical Scientists, Bacteriologists, Pharmacologists, Clinical Virologists, Medical Practitioners.

IMPACT FACTOR

2017: 4.253 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents/Life Sciences
 Pascal et Francis (INST-CNRS)
 EMBASE
 Cambridge Scientific Abstracts
 MEDLINE®
 Scopus
 Elsevier BIOBASE
 BIOSIS

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

J.M. Rolain, Marseille, France

Scientific Assistant

Sophie Baron, Marseille, France

Editorial Office

J. Merrison, Oxford, England, UK

Editors

R. Allaker, London, UK
C. Bertelli, Lausanne, Switzerland
R. Bharadwaj, Pune, India
P. Colson, Marseille, France
G. Coombs, Murdoch, Western Australia, Australia
C. Costelloe, London, England, UK
S. Dancer, Scotland, UK
H. Derendorf, Gainesville, Florida, USA
S. Diene, Geneva, Switzerland
M. Ellington, Cambridge, England, UK
M. Falagas, Athens, Greece
E.J. Giamarellos-Bourboulis, Athens, Greece
H. Giamarellou, Athens, Greece
B. Gold, New York, New York, USA
J. Gray, Birmingham, England, UK
P.R. Hsueh, Taiwan
S.H. Jeong, Seoul, The Republic of Korea
J.C. Lagier, Marseille, France
D. Law, Manchester, England, UK
G Levy Hara, Buenos Aires, Argentina
J. Li, Parkville, Australia, Victoria
J. Lipman, Brisbane, Queensland, Australia
K.G. Naber, Munich, Germany
B. Pradines, Brétigny sur Orge, France
J. Roberts, Brisbane, Queensland, Australia
E. Roilides, Thessaloniki, Greece
A. Seaton, Glasgow, Scotland, UK
U. Serhat, Ankara, Turkey
S. Simjee, Basingstoke, England, UK
S. Stefani, Catania, Italy
S. Straus, Vancouver, British Columbia, Canada
A. Tsakris, Athens, Greece
P.M. Tulkens, Brussels, Belgium
J Walochnik, Vienna, Austria
M.G. Wang, Shanghai, China

International Advisory Board

H.E. Akalin, Erenkoy, Istanbul, Turkey
J. Andrews, West Midlands, UK
B. Barsic, Zagreb, Croatia
E. Bergogne-Berezin, Paris, France
K.A. Brogden, Iowa City, Iowa, USA

K. Bush, Bloomington, Indiana, USA
E. De Clercq, Leuven, Belgium
D. Denning, Manchester, UK
M. Enright, London, UK
R. Feld, Toronto, Ontario, Canada
A.P. Fraise, Birmingham, England, UK
J. Garau, Province of Barcelona, Spain
J.A. Garcia-Rodriguez, Salamanca, Spain
I.M. Gould, Aberdeen, UK
M.L. Grayson, Heidelberg, Victoria, Australia
K.A. Hiramatsu, Tokyo, Japan
I.M. Hoepelman, Utrecht, Netherlands
N. Høiby, Copenhagen K, Denmark
R. Jones, North Liberty, Iowa, USA
G. Kahlmeter, Växjö, Sweden
K.P. Klugman, Seattle, Washington, USA
G Kronvall, Solna, Sweden
D. Lew, Geneva, Switzerland
A. MacGowan, Bristol, UK
F. MacKenzie, Aberdeen, UK
L.A. Mandell, Hamilton, Ontario, Canada
T. Matsumoto, Fukuoka Prefecture
T. Mazzei, Firenze, Italy
C.E. Nord, Solna, Sweden
M. Pelemis, Belgrade, Serbia
T.V. Riley, Perth, Western Australia, Australia
V. Rolny, Bratislava, Slovakia
R. Saginur, Ottawa, Ontario, Canada
F. Scaglione, Milan, Italy
A.M. Sefton, London, UK
J.H. Song, Seoul, The Republic of Korea
M. Stegger, København S, Denmark
M.J. Struelens, Bruxelles, Belgium
F. Tenover, Sunnyvale, California, USA
J. Verhoef, Utrecht, Netherlands
M. Yagisawa, Tokyo, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Types of paper

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words and 40 references (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 20 references and a maximum of 3 figures or tables.

Hot Topics: These tend to be invited papers but unsolicited Hot Topic articles are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

It is required that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail and phone number) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 2 of the potential reviewers are from a different country to the authors. Please ensure that you include the Institution and country for each potential reviewer.

Contact details for submission

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Please ensure that the following are including in your submission: | One author designated as corresponding author: | Their E-mail address | Full postal address | Telephone and fax numbers | Keywords | Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere | All figure captions | All tables (including title, description, footnotes) | All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail | Manuscript has been spell checked | All text pages have been numbered | References are in the correct format for this journal | All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa | Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Please complete the questions in 'Additional Information' when submitting your manuscript that cover Funding, Competing Interests, Ethical Approval and Randomized Clinical Trials.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The [CONSORT checklist and template flow diagram](#) are available online.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with [International Committee of Medical Journal Editors](#) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any

research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3000**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/ijaa/default.asp>.

It is required that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (including the Institution, country, email and phone numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, are not located in the same Institution and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 2 of the potential reviewers are from different countries to the authors. These suggested reviewers cannot be members of the Editorial Board of IJAA. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (before submission), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Embedded math equations

If you are submitting an article prepared with Microsoft Word containing embedded math equations then please read this ([related support information](#)).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork*Electronic artwork**General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites). [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be uploaded separately and not be included as part of the manuscript text. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/international-journal-of-antimicrobial-agents>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE**Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

For further guidance on our online proofing tool Proof Central please see: <https://www.elsevier.com/authors/journal-authors/proof-central>.

Please note that once a paper has been accepted, the only changes possible are in relation to any queries raised by the Technical Editor or Typesetter.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).