

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 31/10/2020.

**UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO
 μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II)
(CP2) SOBRE O METABOLISMO DE *Leishmania*
amazonensis (KINETOPLASTIDA,
TRYPANOSOMATIDAE)**

KELY BRAGA IMAMURA

Tese de Doutorado
2018



Instituto de Química

KELY BRAGA IMAMURA

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DO
 μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II)
(CP2) SOBRE O METABOLISMO DE *Leishmania*
amazonensis (KINETOPLASTIDA,
TRYPANOSOMATIDAE)**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
Título de Doutora em Biotecnologia.

Orientadora: **Prof^a. Dra. Márcia Aparecida Silva Graminha**

Araraquara
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

I31e Imamura, Kely Braga
Estudo do mecanismo de ação do μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II) (CP2) sobre o metabolismo de *Leishmania amazonensis* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) / Kely Braga Imamura. – Araraquara : [s.n.], 2018
113 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha
Coorientador: Carla Raquel Fontana Mendonça

1. Complexos metálicos. 2. Morte celular. 3. Biologia molecular. 4. Ciclo Celular. 5. *Leishmania*. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo do mecanismo de ação do u-diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II) (CP2) sobre o metabolismo de *Leishmania amazonensis* (kinetoplastida, trypanosomatidae)"

AUTORA: KELY BRAGA IMAMURA

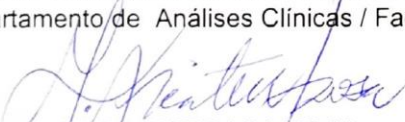
ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORDINADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



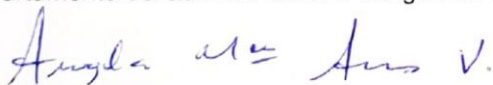
Prof.^a. Dr.^a. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. JOÃO ARISTEU DA ROSA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. ADELINO VIEIRA DE GODOY NETTO
Departamento de Química Geral e Inorgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Dr.^a. ANGELA MARIA ARENAS VELASQUEZ
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. PIO COLEPICOLO NETO
Departamento de Bioquímica / Instituto de Química - USP - São Paulo

Araraquara, 31 de outubro de 2018

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais:

Nome: Kely Braga Imamura

Nome em citações bibliográficas: Imamura, K. B.

Formação: Tecnóloga em Alimentos (2011), Especialista em Microbiologia (2013) e Mestre em Biotecnologia (2015)

Sexo: Feminino

Endereço Profissional:

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Instituto de Química (IQ)

Av. Prof. Francisco Degni, nº 55

Quitandinha – 14800-900

Araraquara-SP, Brasil.

Endereço eletrônico: kely.imamura@hotmail.com

Atividades acadêmicas relevantes, no período do doutorado

1. Trabalhos publicados e/ou submetidos a periódicos indexados:

Artigos Publicados

- FALKENBERG, M.; NAKANO, E.; VILLELA, L. Z.; ZATELLI, G. A.; PHILIPPUS, A. C.; IMAMURA, K.B.; Velásquez, A.M.A; FREITAS, R. P. ; TALLARICO, L.F.; COLEPICOLO NETO, P. ; GRAMINHA, M. A. S. . Bioactive Compounds against Neglected Diseases Isolated From Macroalgae: A Review. Journal of applied phycology, 2018.

- GIANNONI, JULIANA AUDI; IMAMURA, K.B.; VENANCIO, A. C.; NASCIMENTO, R. R.; FREITAS, V. J.; MARINELLI, P.S. Aproveitamento de resíduos orgânicos para o desenvolvimento de beijinho à base de mandioca amarela e rosada. Revista da associação brasileira de nutrição, v. 8, p. 50-57, 2018.

- DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA, T.G.; DUTRA, L.A.; FONSECA, J.N.V.; NASCIMENTO, R.F.Q.; IMAMURA, K.B.; ANDRADE, C. R.; SANTOS, J. L.; GRAMINHA, M.A.S. In Vivo Antileishmanial Activity and Histopathological Evaluation in *Leishmania infantum* infected Hamsters after Treatment with a Furoxan Derivative. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017.

- ALMEIDA, L.; FUJIMURA, A.T.; CISTIA, M.L.; FONSECA-SANTOS, B.; IMAMURA, Kely B.; MICHELS, P.A.; CHORILLI, M.; GRAMINHA, M.A.S. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis- a review. Journal of Biomedical Nanotechnology, 2017.

- IMAMURA, Kely Braga, FERREIRA, Tatiane Cristina, GIANNONI, Juliana Audi, DORTA, Cláudia. Qualidade microbiológica da couve-manteiga (*Brassica oleracea* L.) minimamente processada comercializada em supermercado na cidade de Marília/SP. Revista Brasileira de Análises Clínicas, 2017.

- LIMA, D. P. S. A; IMAMURA, Kely Braga; Desleucocitação de hemocomponentes sanguíneos e sua utilização na transfusão de sangue no Brasil. Revista Newslab, 2017.

2. Participação em eventos científicos:

I jornada de Bioprocessos e Biotecnologia, 2017

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Unesp- Araraquara-SP, 20h

II Congresso Farmacêutico, 2017

Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Unesp- Araraquara-SP, 20h

XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology / XLIV Annual Meeting on Basic Research in Chagas Disease. 2017

Caxambú- MG, 30h

3. Cursos realizados:

Mecanismos de Reparo de DNA em Câncer, 2017.

Faculdade de Ciências farmacêuticas-UNESP, 2h.

Quimioprevenção do câncer com compostos bioativos dos alimentos, 2017.

Faculdade de Ciências farmacêuticas-UNESP, 2h.

Medicina regenerativa e o uso de células-tronco, 2017.

Faculdade de Ciências farmacêuticas-UNESP, 2h.

Efeito de Probióticos no Transtorno do Espectro Autista, 2017.

Faculdade de Ciências farmacêuticas-UNESP, 4h

4. Disciplinas ministradas:

Professora de cursos EAD, Universidade Unyleya

Disciplina: Interpretação e diagnóstico de exame de urina (60h/a) do curso de Pós-Graduação Lato Sensu Urinálise e parasitologia clínica (área: Parasitologia).

Disciplinas: Hemoterapia e banco de sangue (60h/a) e Terapêutica Transfusional (40h/a) do curso de Pós-Graduação Lato Sensu Banco de sangue e Hematologia clínica (área: Microbiologia).

Disciplina: Fundamentos em Citopatologia Ginecológica (40h/a) do curso de Pós-Graduação Lato Sensu Curso Citologia Oncótica (área: Análises clínicas).

5. Estágio Docência

Estágio de Docência no curso de graduação em Farmácia e Bioquímica, nas disciplinas de Parasitologia Clínica, e Parasitologia Aplicada, com carga horária de 55 horas, Professor responsável: Márcia Ap. S. Graminha

6. Palestras, cursos e oficinas ministradas

PCR: Aula introdutória

Aula teórico-prática. Disciplina de Biotecnologia

Faculdade de Tecnologia de Marília- FATEC-Marília – SP
05-2018 Duração: 08h

P&D: Como as indústrias desenvolvem novos produtos

Palestra ministrada na 1º Jornada de Iniciação Científica

Faculdade de Tecnologia de Marília- FATEC-Marília – SP
11-2018 Duração: 2h

P&D: Como as indústrias desenvolvem novos produtos

Oficina conduzida na 1º Jornada de Iniciação Científica

Faculdade de Tecnologia de Marília- FATEC-Marília – SP
11-2017 Duração: 4h

Biotoxinas Naturais: Micotoxinas

Aula teórico-prática. Disciplina de Toxicologia

Faculdade de Tecnologia de Marília- FATEC-Marília – SP
05-2017 Duração: 08h

7. Participação em Conselhos e Comissões

Membro da Comissão Avaliadora da 1ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp dos trabalhos apresentados na área de Exatas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2018

Membro da Comissão Avaliadora dos resumos e apresentações de trabalhos científicos In: VII Congresso Farmacêutico da UNESP e III Jornada de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, oferecidos pela 64ª Jornada Farmacêutica da UNESP, 2017.

Membro da Comissão Avaliadora da 2ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp dos trabalhos apresentados na área de Exatas. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017

Membro titular da Comissão Permanente de Pesquisa. CPP, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017-2018.

Membro suplente do Conselho de pós-graduação de Biotecnologia, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2017-2018.

Membro titular da Comissão Permanente de Pesquisa. CPP, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016-2017.

Membro suplente do Conselho de pós-graduação de Biotecnologia, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2016-2017.

8. Pedido de Patente

GRAMINHA, M. A. S.; da SILVA, A.; CISTIA, M. L.; IMAMURA, K. B.; COSTA, P. I. da; TGMACK, um novo teste molecular para o diagnóstico, identificação e controle da leishmaniose visceral. Invenção: nº 16CI057. Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Pedido de depósito 07/07/2016.

9. Supervisão Científica

Co-orientação da aluna de Iniciação Científica Daphne Duberger Teodoro, Graduação em Farmácia Bioquímica, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP no projeto intitulado “Avaliação do envolvimento do antileishmanial **14e** no desacoplamento da membrana mitocondrial em *Leishmania*”.

10. Participação em Bancas de Iniciação Científica

- Participação em banca de Jéssica Naiara Veronez da Fonseca. “Aspectos mecanísticos do antileishmanial 14e em *Leishmania amazonensis*”. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia Bioquímica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP.

- Participação em banca de Amanda França Siqueira e Carolina Oliveira Vanzelli. “Alimentação no comportamento dos portadores de autismo: uma revisão”. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Faculdade de Tecnologia de Marília, 2017.

- Participação em banca de Sandra Mara Ribeiro da Silva e Thamires Heloíse Marcolino Escatambulo. Agricultura familiar e orgânica dentro do programa de alimentação escolar. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Tecnologia em Alimentos) - Faculdade de Tecnologia de Marília, 2017.

*Ao meu amor Jufner, por todo apoio e por sempre
acreditar que eu posso ir além .*

Dedico.

*“(...) Estamos apenas começando a aventura
que aguarda nosso descobrimento de como as
células lidam com o estresse”*

Wynn et al, 1994.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dr^a Márcia Aparecida Silva Graminha, por todo apoio e confiança em meu trabalho.

Aos professores Flávio Henrique Silva, Luiz Tosi, Juliana Audi Giannoni e Carla Raquel Fontana Mendonça e alunos Stela e Adelita que contribuíram imensamente para o meu crescimento profissional, pessoal e acadêmico.

Ao pessoal do laboratório, especialmente à Jéssica, Daphne, Angela, Amanda, Letícia, Thaís e Leandro pelas discussões científicas e experimentais ao longo desses anos.

À minha família pelo carinho, amor, incentivo, e conselhos ao longo desses anos.

Agradeço com todo coração ao meu amor Jufner Toni, por seu amor, carinho, dedicação, ajuda, paciência e por acreditar que eu posso ir além.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e a Biblioteca do Instituto de Química. A todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

Aos amigos que fiz em Araraquara.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro durante o período que estive desenvolvendo a pesquisa.

Resumo

As leishmanioses são doenças mundialmente distribuídas, encontradas nas áreas tropicais e subtropicais do mundo e são causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania* spp. A limitada disponibilidade de fármacos para o tratamento, somado à diversidade de efeitos colaterais e o surgimento de cepas resistentes, mostram a importância de pesquisas que sejam focadas no desenvolvimento de novas moléculas com alvos moleculares específicos e que contribuam para o tratamento destas, entre outras doenças negligenciadas. Como alternativa terapêutica, muitos complexos metálicos utilizados como quimioterápicos no tratamento do câncer têm sido testados em Tripanossomatídeos. Dentre estas moléculas, destaca-se o composto metálico **CP2** (μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II)). Em estudos prévios, **CP2** apresentou atividade leishmanicida e, em estudos *in vivo*, utilizando camundongos BALB/c, infectados com *L. (L.) amazonensis*, **CP2** não apresentou toxicidade hepática ou renal e foi capaz de reduzir a carga parasitária dos animais de maneira similar à anfotericina B. **CP2** demonstrou, ainda, capacidade de inibir a etapa de clivagem da DNA Topoisomerase IB do parasito. Dessa forma, neste estudo, realizou-se a avaliação dos efeitos relacionados à pós-inibição da DNA TopoIB de *Leishmania* por **CP2**. Os resultados revelaram que **CP2** induziu uma série de eventos celulares e moleculares em *L. (L.) amazonensis*. Promastigotas tratadas com **CP2** em diferentes concentrações apresentaram a intensidade de marcação de Rho123 reduzida (apresentando valores negativos), nos tempos de 4 e 24h de tratamento ($p < 0,01$), o que indica que o tratamento com **CP2** induziu a despolarização da membrana mitocondrial. O nível de ROS aumentou nos parasitos dentro de 1h de tratamento após pré-incubação com o reagente H_2DCFDA por 3h, e permaneceram aumentados ao longo de todo o período analisado (90 min). Estes resultados sugerem que há geração de ROS induzida por **CP2**. Quando as células de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com **CP2** ($4 \times IC_{50}$), Nac + **CP2** ($4 \times IC_{50}$), e Nac + **CP2** ($10 \times IC_{50}$), respectivamente, as células não conseguiram progredir para a fase M do ciclo celular, ficando paradas na fase S ao longo de todo o tempo analisado (8h). Interessantemente, as células tratadas somente com NAC progrediram naturalmente ao longo do ciclo, indicando que o efeito de parada no ciclo celular não é causado por ROS e sim, possivelmente, como consequência da inibição da DNATopoIB. A *L. (L.) amazonensis* respondeu a presença de HU, aumentando a fosforilação de H2A, em até 4,5 vezes. Entretanto, quando comparada à *L. (L.) major* percebe-se que a *L. (L.) amazonensis* apresenta níveis de fosforilação mesmo na ausência de estresse, indicando que naturalmente as células de *L. (L.) amazonensis* apresentam níveis basais de estresse celular. Quando as células foram expostas ao **CP2**, a porcentagem de células apoptóticas-like foi maior quando comparado às células necróticas em 6h de tratamento. Entretanto, o inverso foi obtido quando a porcentagem de células mortas foi observada após 48h de tratamento com **CP2**, indicando um aumento da população necrótica pós-apoptótica-like.

Palavras-chave: Compostos ciclopalladados. Instabilidade genômica. Ciclo Celular. Membrana mitocôndrial. Morte celular. Estresse oxidativo. *Leishmania*.

Abstract

Leishmaniasis are diseases globally distributed in tropical and subtropical areas of the world and *Leishmania* spp. are the etiological agents of the diseases. The limited availability of drugs for treatment, added to the diversity of collateral effects and the emergence of resistant strains, show the importance of research that is focused on the development of new molecules with specific molecular targets and that contribute to the treatment of these, among other diseases neglected. As a therapeutic alternative, many metal complexes used as chemotherapeutics in the treatment of cancer have been tested in trypanosomatids. Among these molecules, the metal compound **CP2** (μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II)). In previous studies stands out. **CP2** showed leishmanicidal activity and in in vivo studies using BALB/c mice infected with *L. (L.) amazonensis*, **CP2** showed no hepatic or renal toxicity and was able to reduce the parasitic load of the animals in a manner similar to amphotericinB, **CP2** has also been shown to inhibit the DNA cleavage stage Topoisomerase IB of the parasite. Thus, in this study, the effects related to post-inhibition of *Leishmania* TopoIB DNA by **CP2** were evaluated. The results revealed that **CP2** induced a series of cellular and molecular events in *L. (L.) amazonensis*. Promastigotes treated with **CP2** in the different concentrations Showed Rho123 low intensity (exchange of negative values), at treatment times 4 and 24h ($p < 0.01$), indicating **CP2** treatment induced mitochondrial membrane depolarization. The level of ROS increased in the parasites within 1h of treatment after preincubation with the H₂DCFDA reagent for 3h, and remained increased throughout the analyzed period (90 min). These results suggest that there is generation of ROS induced by **CP2**. When *L. (L.) amazonensis* cells were treated with **CP2** (4xIC₅₀), Nac + **CP2** (10xIC₅₀), and Nac + **CP2** (10xIC₅₀) respectively, the cells failed to progress to the M phase of the cell cycle, stops in the S phase throughout the analyzed time (8h). Interestingly, cells treated with NAC alone progressed naturally over the cycle, indicating that the stop effect on the cell cycle is not caused by ROS but possibly as a consequence of inhibition of DNATopoIB. The *L. (L.) amazonensis* responded to the presence of HU, increasing phosphorylation of H2A by up to 4.5 times. However, when compared to *L. (L.) major* it is noticed that *L. (L.) amazonensis* presents levels of phosphorylation even in the absence of stress, indicating that naturally *L. (L.) amazonensis* cells present basal levels of cellular stress. When cells were exposed to **CP2**, the percentage of apoptotic-like cells was higher when compared to necrotic cells in 6h of treatment. However, the inverse was obtained when the percentage of dead cells was observed after 48h **CP2** treatment, indicating an increase in the necrotic post-apoptotic-like population.

Keywords: Cyclopalladated compounds. Genomic instability. Cell Cycle. Mitochondrial membrane. Cell death. Oxidative stress. *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição geográfica das leishmanioses.....	21
Figura 2 -	Formas evolutivas durante o ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	22
Figura 3 -	Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	23
Figura 4 -	Estruturas do composto ciclopaladado binuclear denominado CP2 [Pd(dmba)(μ -N3)] ₂	31
Figura 5 -	Estrutura monomérica da DNA topo1B humana (hTopo1) e estrutura heterodimérica da DNA topo1B de <i>L. (L.) donovani</i>	32
Figura 6 -	Fases do ciclo celular em eucariotos.....	37
Figura 7 -	Modelo do controle do ciclo celular de células eucarióticas em função de danos no DNA.....	38
Figura 8 -	Respostas ao dano no DNA de eucariotos.....	39
Figura 9 -	Diferenças entre dois tipos de morte celular comuns em eucariotos.....	42
Figura 10 -	Modelo de MCP em <i>Leishmania</i>	43
Figura 11 -	2D-PAGE de proteínas totais (250 μ g) de <i>L. (L.) amazonensis</i> após exposição ao CP2 por 72h.....	55
Figura 12 -	<i>Fold</i> das proteínas diferencialmente expressas por <i>L. (L.) amazonensis</i> em resposta ao CP2	59
Figura 13 -	Quantificação da expressão de genes por RTq-PCR de células de <i>L. (L.) amazonensis</i> após exposição ao CP2 por 72h.....	60
Figura 14 -	Sincronização das células de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) major</i> durante a progressão do ciclo celular.....	63
Figura 15 -	Efeito de CP2 no ciclo celular de <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
Figura 16 -	Efeito de CP2 na expressão yH2A.....	67
Figura 17 -	Histograma das análises de citometria de fluxo de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonenses</i>	72
Figura 18 -	Efeito de CP2 no potencial de membrana mitocôndrial de <i>L. (L.) amazonensis</i>	73
Figura 19 -	Efeito de CP2 na geração de ROS de <i>L. (L.) amazonensis</i>	75
Figura 20 -	Marcação de células necróticas/apoptóticas-like com brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA).....	78
Figura 21 -	Porcentagem de células de <i>L. (L.) amazonensis</i> vivas, necróticas e apoptóticas-like após incorporação de brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a quantificação por RTq-PCR dos genes que codificam para as proteínas diferencialmente expressas observadas na análises proteômicas após a exposição de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> ao CP2	49
Tabela 2 -	Categorização biológica das proteínas encontradas de <i>L. (L.) amazonensis</i> após o tratamento com CP2 de acordo com <i>UNIPROT</i>	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AnfB	Anfotericina B
BE/LA	Brometo de Etídio/Laranja de Acridina
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
cDNA	DNA complementar
CP2	[Pd(dmba)(μ -N ₃)] ₂ ⁻ Ciclopaladado binucleado
CPT	Camptotecina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNATopoIB	DNA Topoisomerase do tipo IB
DTs	Doenças Negligenciadas
DSB	Double Strand Break
FCCP	Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone]]
GRP78	Putative glucose-regulated protein 78
HSP10	Putative 10 kDa heat shock protein
HSP70	Heat-shock protein hsp70
hTopol	DNA topoisomerase I humana
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ DCFDA	2'7' diclorodihidro fluoresceína diacetato
HU	Hidroxiureia
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
LC	leishmaniose cutânea
LCL	leishmaniose cutânea localizada
LCD	leishmaniose cutânea disseminada
LCDF	leishmaniose cutâneo difusa
LIT	Infusão de fígado e triptose
LMC	leishmaniose mucocutânea
LV	leishmaniose visceral
LVC	leishmaniose visceral canina
LdTopo1B	DNA topoisomerase 1B de <i>Leishmania donovani</i>
MCP	Morte Celular Programada
NAC	N-acetil-L-cisteína
NHEJ	Reparo de ligação das extremidades não-homólogas
NTC	Mix de reação sem amostra
p<0,01	99% de significância TUKEY

PBS-T	Salina tamponada com fosfato e tween
PCR	Reação da Polimerase em Cadeia
PM	Peso Molecular
PI	Iodeto de Propídeo
PKDL	leishmaniose cutânea pós kala-azar
PDI	Dissulfeto Isomerase
qPCR	Real time PCR quantitativo
RH	Recombinação homóloga
ROS	Reactive Oxygen Species
Rho123	Rodamina 123
Sb ^V	Antimônio pentavalente
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Tpri	Triparedoxina peroxidase
Tryr	Trypanotona reductase
UNIPROT	Universal Protein Resource
yH2A	Histona H2A fosforilada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Doenças Negligenciadas: leishmanioses	20
1.2. Diagnóstico e tratamento das leishmanioses	26
1.3. O efeito dos compostos ciclopaladados em tripanossomatídeos.....	28
1.4. DNAs topoisomerases como alvos terapêuticos.....	31
1.5. Pós-genômica: A eletroforese bidimensional aplicada à análise proteômica associada à expressão gênica.....	34
1.6. O ciclo celular como regulador da sobrevivência da <i>Leishmania</i>	36
1.7. Estresse e Morte celular em eucariotos.....	40
2. OBJETIVOS.....	44
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1. Linhagens de <i>Leishmania</i> spp.....	47
3.2. Meios de cultura	47
3.3. Análise da expressão gênica de <i>L. amazonensis</i> após exposição ao CP2. 47	
3.3.1. Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	47
3.3.2. PCR quantitativo (qPCR).....	48
3.4. Análises do ciclo celular.....	49
3.5. Expressão da histona γ H2A.....	50
3.5.1. Separação das proteínas por SDS-PAGE e análise por W. blotting..	50
3.6. Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria ($\Delta\psi$ m).....	51
3.7. Medida do acúmulo de ROS intracelular.....	52
3.8. Detecção de morte celular por laranja de acridina / brometo de etídio (AO / EB) coloração.....	52
3.9. Análise estatística.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. CP2 induz o aumento na expressão de genes e proteínas em <i>L. (L.) amazonensis</i> relacionados com processos de detoxificação celular e disfunção mitocondrial.....	55
4.2. CP2 induz parada na progressão do ciclo celular em <i>L. (L.) amazonensis</i> .	62
4.3. <i>L. (L.) amazonensis</i> apresenta níveis de histona γ H2A aumentados após tratamento com CP2.....	66
4.4. CP2 induz a despolarização do potencial da membrana mitocondrial em <i>L. (L.) amazonensis</i>	70
4.5. CP2 induz a formação de ROS intracelular, provoca estresse oxidativo em <i>L. (L.) amazonensis</i>	74
4.6. CP2 induz a morte celular em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	76
CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO.....	102

Introdução

1.1 Doenças Negligenciadas: leishmanioses

As doenças negligenciadas (DTs) afetam a vida de aproximadamente um bilhão de pessoas no mundo, principalmente em países subdesenvolvidos (CHATELAIN; IOSET, 2011). Entre as DTs, destacam-se as leishmanioses, doença de Chagas e doença do sono. A família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida compreende um grande número de protozoários parasitos, destacando-se a *Leishmania* spp., agente responsável por causar a leishmaniose. Essas doenças são consideradas negligenciadas, pois os investimentos em pesquisa e desenvolvimento, geralmente, não revertem em crescimento e ampliação para a busca e desenvolvimento de novos fármacos, testes diagnósticos e vacinas (ZUCCA, 2013).

Estima-se que por ano, no mundo, ocorram aproximadamente dois milhões de novos casos de leishmaniose, com aproximadamente 70 mil mortes a cada ano. Esses números provavelmente são subestimados, pois somente 33 países de 98 considerados endêmicos possuem notificação obrigatória (WHO, 2018).

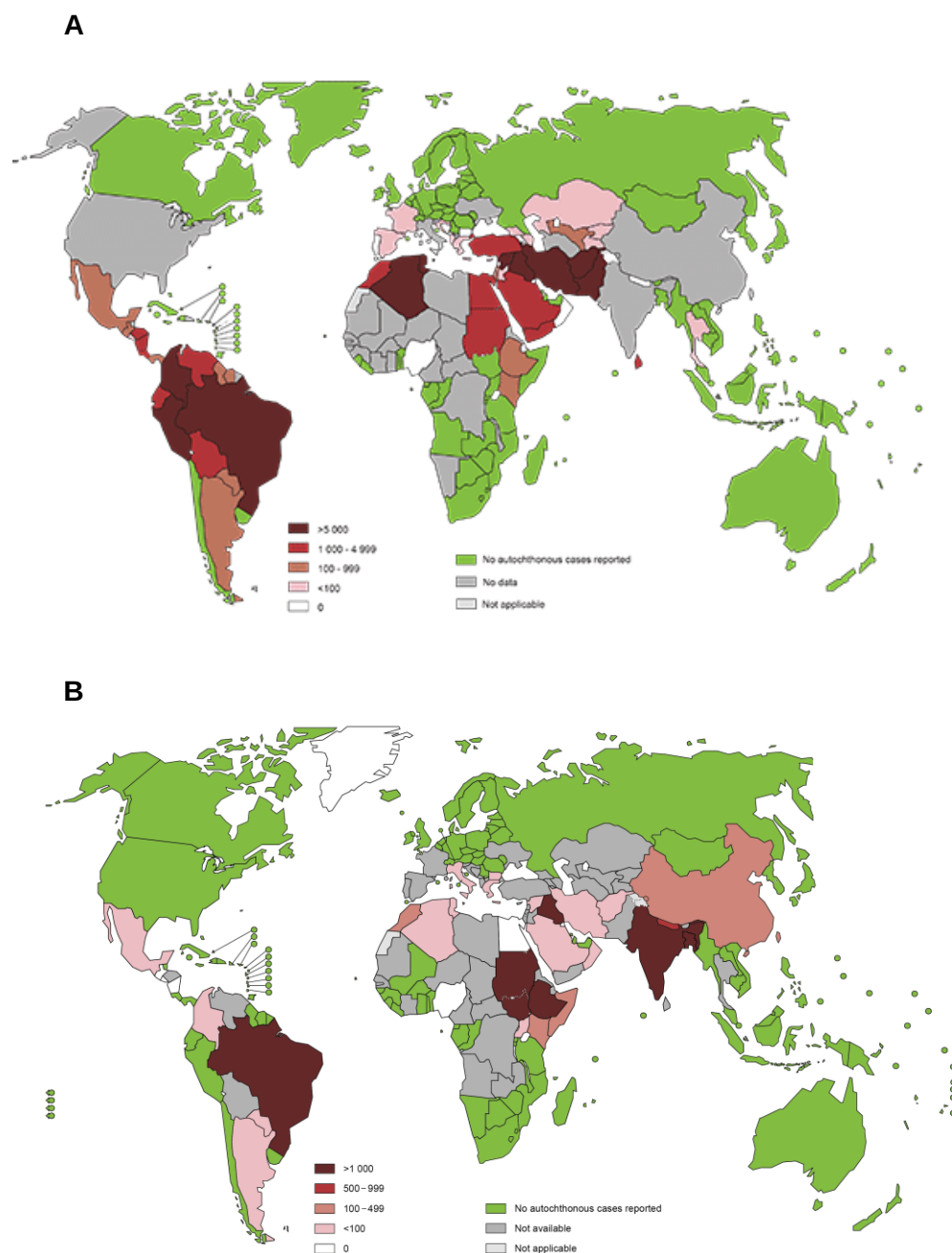
No Brasil, novos casos foram descritos não apenas em zonas rurais, mas também em regiões peri-urbanas e urbanas (CAMARGO-NEVES et al., 2002; JERONIMO et al., 2004; SAVOIA, 2015). Esses parasitos infectam uma grande variedade de hospedeiros mamíferos silvestres e domésticos, considerados como reservatórios naturais, incluindo o homem que, em geral, participa do ciclo como hospedeiro acidental. O curso das infecções varia de acordo com a idade, constituição genética, estado nutricional, estado imunológico, espécie infecciosa, mudanças ambientais e migração de pessoas não imunes para áreas endêmicas (BHARGAVA; SINGH, 2012).

As leishmanioses são caracterizadas por representarem uma série de doenças que possuem diversas manifestações clínicas provocando lesões ulceradas na pele, inflamação e destruição na mucosa ou infecção visceral disseminada, dessa forma é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis doenças mais importantes no mundo, por sua alta prevalência e pelas deformidades que ela provoca (WHO, 2018). Esses parasitos são capazes de invadir diferentes tipos de tecidos e células, apresentando diferenças marcantes no curso da infecção causada por eles (MCCONVILLE et al., 2002) e apresentando processos bioquímicos únicos e altamente conservados.

O gênero *Leishmania* é subdividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que são provenientes da bifurcação de um ancestral, apresentando diferenças tanto na distribuição geográfica como na localização quando coloniza o intestino do inseto vetor

(LAINSON; SHAW, 1987). *Leishmania* é o subgênero que está disseminado tanto no novo como no velho mundo (SHAW, 2002) e inclui espécies que desenvolvem-se no intestino médio e anterior do inseto vetor (LAINSON; SHAW, 1987). O subgênero *Viannia* está presente no novo mundo (SHAW, 2002) e as espécies pertencentes a ele localizam-se no intestino posterior do inseto vetor (LAINSON; SHAW, 1987).

Figura 1. Distribuição Geográfica das leishmanioses. Em (A) estão representados os casos de leishmaniose cutânea no mundo. Em (B) estão representados os casos de leishmaniose visceral no mundo.

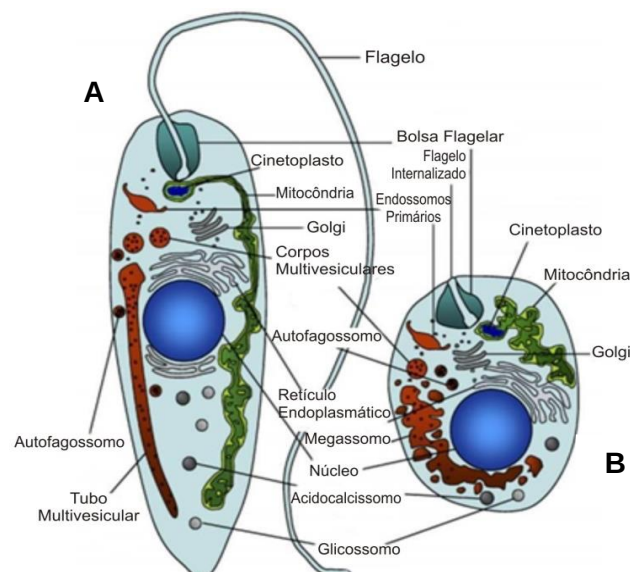


Fonte: Disponível em: <WHO (<http://www.who.int/en/>)>. Acesso em: 05-11-2018.

Os agentes etiológicos das leishmanioses foram identificados por Cunningham que descreveu, em 1885, as formas amastigotas em casos de Kala-azar na Índia. Em 1903, Leishman e Donovan descreveram pela primeira vez o protozoário responsável pela leishmaniose visceral (Kala-azar), que foi denominado por Ross como *Leishmania donovani*. No mesmo ano Wright denominou de *Leishmania tropica* o parasito isolado de uma criança com leishmaniose cutânea e a partir de 1904, relatos demonstraram a existência de alguns casos de leishmaniose na China (HOARE, 1938; REY, 2001). As primeiras descrições sobre o parasito nas Américas foram realizadas por Carini e Paranhos, no Sul do Brasil, em 1909. Atualmente são conhecidas mais de 30 espécies de *Leishmania*, dessas, 20 são capazes de causar leishmaniose em humanos (ASHFORD, 2000). Em 2003 foi confirmada a presença da doença em todos os estados brasileiros (WHO, 2005).

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxeno e envolve hospedeiros invertebrados e vertebrados. Os hospedeiros invertebrados são insetos conhecidos como flebotomíneos e os principais hospedeiros vertebrados são os humanos, os mamíferos silvestres e os animais domésticos, como o cão. Durante o ciclo, o parasito apresenta-se sob duas formas distintas: a forma amastigota, que não possui flagelo livre e está presente no interior das células dos hospedeiros vertebrados, e a forma promastigota flagelada que se desenvolve no tubo digestivo dos hospedeiros invertebrados (MOLYNEUK; KILLICK-KENDRICK, 1987).

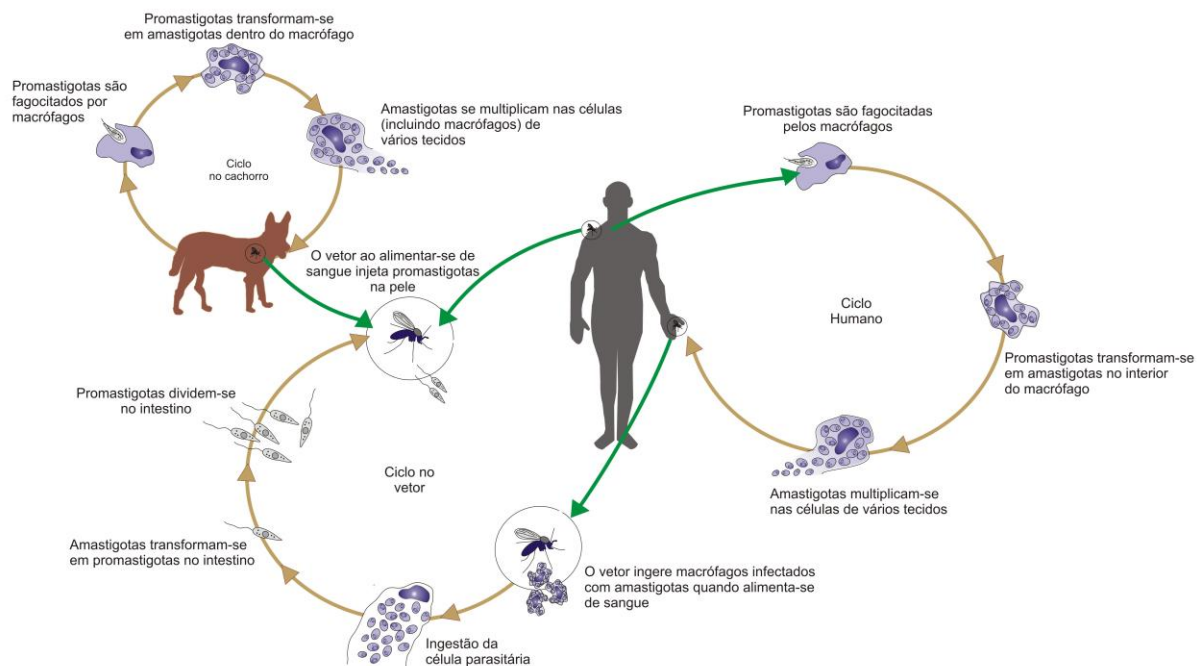
Figura 2. Formas evolutivas durante o ciclo de vida da *Leishmania* spp. Em (A) está representada a forma promastigota de *Leishmania* spp. Em (B) está representada a forma amastigota de *Leishmania* spp.



Fonte: Adaptada de Besteiro, Williams et al. (2007).

As amastigotas ingeridas pelo vetor junto com o bolo alimentar se transformam em promastigotas procíclicas no intestino médio do flebotomíneo. Essas são as formas replicativas que apresentam um curto flagelo. Para não serem excretados os parasitos migram para o lúmen do intestino médio e posteriormente para a parte anterior, e nesse processo as formas promastigotas passam por diferentes transformações e se multiplicam. Quando os parasitos colonizam a válvula estomodeal eles se transformam em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide do inseto, até o próximo repasto sanguíneo. No hospedeiro mamífero, as promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelas células de defesa do sistema imune inato e os macrófagos são as principais células infectadas. No interior dos macrófagos ocorre a formação de um vacúolo digestivo (fagolisossomo) a partir da fusão do lisossomo com o fagossoma. Nessa organela ocorre a diferenciação das promastigotas em amastigotas. As formas amastigotas se multiplicam constantemente e devido ao elevado número de amastigotas intracelulares há rompimento celular, liberando as *Leishmanias* para meio intercelular, infectando, conseqüentemente, outras células fagocíticas (ROGERS et al., 2004).

Figura 3. Ciclo de vida do parasito *Leishmania spp.* O ciclo infeccioso pode ser dividido em dois estágios: um dependente do vetor e outro dependente do mamífero hospedeiro. No inseto, ocorre a diferenciação do parasito em formas promastigotas metacíclicas infectantes. No mamífero, o parasito diferencia-se em amastigotas, multiplica-se e pode ser novamente ingerido por flebotomíneos.



Fonte: Adaptada de Almeida et al., (2017).

A sobrevivência do parasito no hospedeiro mamífero depende do balanço entre a capacidade do sistema imune em ativar os mecanismos de defesa do macrófago infectado pelo parasito e a capacidade do parasito em sobreviver aos efeitos citotóxicos do macrófago (BHARGAVA; SINGH, 2012).

A diversidade genética do parasito em combinação com as características do sistema imunológico do hospedeiro contribuem extremamente para a diversidade dos quadros clínicos das leishmanioses. Assim, a infecção pode resultar em diferentes manifestações clínicas incluindo leishmaniose visceral (LV), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose cutânea (LC), sendo a última subdividida em formas localizada (LCL), difusa (LCDF) e disseminada (LCD). Somado a essas manifestações, há a leishmaniose cutânea pós Kala-azar (PKDL), forma mais rara observada em alguns pacientes após reincidência da sintomatologia clínica visceral (WHO, 2018).

A LC, a forma mais frequente da doença, é endêmica em mais de 70 países (DESJEUX, 2004). Está amplamente distribuída no continente americano, com registros de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Já a LV, acomete principalmente os países da África e foi descrita em pelo menos 12 países da América Latina, sendo que 90% dos casos de LV americana ocorrem no Brasil, especialmente na região nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

Na área do tegumento onde o parasito é inoculado pela picada do inseto ocorrem modificações histológicas que produzem uma reação inflamatória caracterizada por hiperplasia e hipertrofia, ou seja, aumento do número e do tamanho dos macrófagos podendo causar ulcerações indolores, arredondadas ou ovaladas (SCHWARTZ et al., 2006). São responsáveis pela LC nas Américas as espécies de *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) venezuelensis* e no Velho Mundo *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica*. No Brasil existem sete espécies que são responsáveis pela leishmaniose cutânea, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergl* e *L. (V.) shawi* foram identificadas nas regiões Norte e Nordeste (MURRAY et al., 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

A LMC é causada principalmente por *L. (V.) braziliensis* e por *L. (V.) panamensis*. Essa forma da leishmaniose se complica com o aparecimento de lesões ulcerosas nas mucosas do nariz, boca e faringe. A propagação acontece, provavelmente por via hematogênica. Nódulos com focos de macrófagos infiltrados podem surgir com raros

parasitos e tendência à ulceração, localizando-se na porção cartilaginosa do septo nasal. Essas úlceras costumam progredir em extensão e profundidade, com destruição das cartilagens e dos ossos do nariz, da região palatina ou do maxilar facial. Progressivamente ocorre a perfuração do septo ou do palato e o processo inflamatório se estende à faringe e à laringe, sendo possível o encontro de metástases cutâneas (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003).

A LCD é causada por *L. (L.) pifanoi*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* nas Américas; e *L. (L.) aethiopica*, na África e tem início com o desenvolvimento de lesão única no ponto de inoculação dos parasitos pelos flebotomíneos, seguida por uma dispersão metastática que dará origem a lesões múltiplas, não ulcerativas, disseminadas por toda a pele (MOLYNEUX e KILLICK-KENDRICK, 1987). Já a LCDF é uma manifestação rara e severa relacionada à anergia do sistema imunológico e tem como agente etiológico a *L. (L.) amazonensis*. Essa manifestação não é limitada à América do Sul, ocorrendo também na Índia e África em pacientes co- infectados por *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* e HIV (KHANDELWAL et al., 2011). As lesões são nodulares e atingem diversas áreas do corpo como face, orelha e troncos (ASHFORD, 2000).

Nas formas viscerais, os parasitos atacam o sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e dos tecidos linfoides, determinando a leishmaniose visceral ou Kala-azar. A hipertrofia e a hiperplasia do sistema macrofágico das vísceras é a razão da esplenomegalia (aumento do baço), da hepatomegalia (aumento do fígado), bem como das alterações da medula óssea. Os macrófagos aumentam consideravelmente em número e seu citoplasma torna-se abundante. São responsáveis pela LV, a *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) chagasi* (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; BHATTACHARYA et al., 2006). No Brasil, a leishmaniose visceral é tipicamente causada por *L. (L.) chagasi*, mas há relatos de casos encontrados no estado da Bahia em que a *L. (L.) amazonensis* era a causa da doença (BARRAL et al., 1991).

Apresentações clínicas atípicas e graves têm sido descritas em associação com imunodepressão, principalmente em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS). O primeiro caso de co-infecção *Leishmania*-HIV na América foi relatado no Brasil (NICODEMO et al., 1990) cinco anos após o primeiro relato mundial ocorrido em 1985 no sul da Europa (DE LA LOMA et al., 1985). Em 1999, foram diagnosticados mais de 1.400 casos de co-infecção *Leishmania*-HIV e 90% dos casos foram observados na Itália, Espanha e França. Foram encontrados também casos de co-infecção em outras áreas do mundo como na Índia e no Oeste da África (PINTADO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2001; ALVAR et al., 2008). Essa co-infecção tem um efeito sinérgico,

em que a leishmaniose muda a progressão da doença pelo HIV acelerando o início da AIDS, e a imunossupressão causada pelo vírus facilita a disseminação da leishmaniose.

1.2 Diagnóstico e tratamento das leishmanioses

O diagnóstico das leishmanioses é baseado em exames parasitológicos, imunológicos e moleculares. Os exames parasitológicos incluem a demonstração do parasito e o isolamento em cultivo *in vitro* ou *in vivo* (inoculações em animais), realizado a partir da raspagem ou punção das lesões. Os exames imunológicos utilizam principalmente os testes sorológicos, como o teste de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) e o IFI (Imunofluorescência Indireta). Esses testes detectam anticorpos anti-*Leishmania* presentes no soro dos pacientes, entretanto, devido à reação cruzada com outras doenças parasitárias ou bacterianas, esses testes não devem ser realizados isoladamente. Os exames moleculares, que incluem primordialmente a PCR (reação em cadeia da polimerase) apesar de apresentar alta sensibilidade sendo capazes de detectar e identificar a espécie da *Leishmania* são métodos pouco utilizados na rotina diagnóstica por apresentarem custo relativamente alto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Atualmente a terapêutica da leishmaniose é um dos tópicos mais importantes, pois constitui-se em um grande problema mundial. O aumento de casos que não respondem ao tratamento tradicional leva cada vez mais indivíduos à óbito. Além disso, existem dificuldades relacionadas ao tratamento disponível, toxicidade, efeitos colaterais severos e desenvolvimento de resistência dos parasitos frente aos fármacos, sendo esses um dos principais motivos para o insucesso na terapia da doença (CROFT; COOMBS, 2003; NEUMANN et al., 2010).

Em 1912, Gaspar de Oliveira Vianna descreveu que o tártaro emético era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana. Três anos mais tarde, na Itália, foi relatado o tratamento da leishmaniose visceral com essa droga. Em 1922, a primeira droga à base de antimônio pentavalente (Sb^V) tendo efeito contra *L. (L.) donovani* foi sintetizada por Brahmchari na Índia (PETER, 1981 *apud* SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

Apesar do tempo de tratamento ser prolongado, de possuir efeitos colaterais graves, como nefrotoxicidade, pancreatotoxicidade e hepatotoxicidade, de ter incidência de falha terapêutica e de ser comprovada a existência de parasitos resistentes aos Sb^V , esses ainda são os fármacos de primeira escolha para o tratamento de LV e LC na maior parte das áreas endêmicas. Mesmo com o seu uso difundido por mais de meio século, o mecanismo de ação dos Sb^V ainda não estão completamente esclarecidos.

Acredita-se que sua eficácia contra o parasito possa estar relacionada à sua conversão a antimônio trivalente (Sb^{III}). No entanto, a biomolécula envolvida e o local onde ocorre a redução do Sb^{V} ao Sb^{III} ainda não foram identificados (FREZARD et al., 2001; CROFT et al., 2006). O Sb^{III} é letal para as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e acredita-se que ele interfere no processo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, levando à depleção dos níveis de ATP intracelular (BALANA-FOUCE et al., 1998). A eficiência desses compostos tem-se reduzido significativamente devido à seleção de parasitos resistentes observada durante os últimos 15 anos, principalmente no Nordeste da Índia onde mais de 60% dos pacientes com LV não respondem mais à terapia com antimoniais (MUNIARAJ, 2014; SUNDAR et al., 2014).

A anfotericina B (AnfB) é o fármaco de segunda escolha para o tratamento da LV e LC. Durante a última década a AnfB, formulada como desoxicolato de anfotericina, foi amplamente utilizada no tratamento da LV, mas seu uso é limitado pela toxicidade e reações adversas. Para tentar contornar esses problemas, formulações lipídicas menos tóxicas foram desenvolvidas. Desde então, a AnfB lipossomal tem apresentado o melhor índice terapêutico dentre as drogas anti-*Leishmania* atuais, particularmente em áreas onde a resistência aos antimoniais tem sido reportada (BERMAN, 2005; DESJEUX, 2004). Nestas formulações, os lipídios agregados à molécula de AnfB reduzem a toxicidade do fármaco por facilitar sua absorção pelas células do sistema retículo endotelial, aumentando sua eficácia (BERMAN, 2005; DESJEUX, 2004; MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007), porém o alto custo tem restringido o seu uso (NONATA et al., 1997). O principal mecanismo de ação da AnfB está relacionado à formação de poros na membrana plasmática do parasito, capazes de alterar o balanço iônico e resultar na morte celular (revisado em CROFT; COOMBS, 2003; NEUMANN et al., 2010).

Na última década foi descrito o primeiro fármaco de uso oral para o tratamento de leishmaniose, a miltefosina, que demonstrou atividade no tratamento da LV e LC (SUNDAR et al., 2000; SOTO et al., 2001) nos casos de resistência ao antimônio (JHA et al., 1999). O mecanismo de citotoxicidade exato da miltefosina em *Leishmania* spp. ainda não está completamente esclarecido, mas sua atividade tem sido relacionada com morte celular programada (PARIS et al., 2004; VERMA; RAKOTOMANGA et al., 2005; RAKOTOMANGA et al., 2007). No Novo Mundo a LC pode ser tratada com pentamidina, que é utilizada em casos não responsivos aos antimoniais ou nos casos de hipersensibilidade ao antimônio. Apresenta maior toxicidade quando comparada aos antimoniais, (CROFT e COOMBS, 2003; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; MURRAY et al.,

2005) e possui efeitos colaterais severos, como nefrotoxicidade, hipotensão, hipoglicemia, hiperglicemia, alterações cardiológicas, e o aparecimento de diabetes mellitus em alguns pacientes (RATH et al., 2003; BHATTACHARYA et al., 2006; JHA, 2006). Não se sabe o exato mecanismo de ação da pentamidina, mas acredita-se que a droga age interferindo na síntese do DNA, alterando o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (CROFT e COOMBS, 2003; SUNDAR e CHATTERJEE, 2006). Existem vários compostos com atividade leishmancida, entretanto, poucos podem ser utilizados em humanos (SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico, testado como tratamento alternativo para a LC e LV na Tunísia, Equador e Panamá (ARMIJOS et al., 2004; BEN SALAH et al., 2009; BEN SALAH et al., 2013; SOSA et al., 2013). Mas, estudos realizados por Sundar et al., (2008), demonstraram uma eficácia variável para o tratamento com paromomicina de acordo com a espécie de *Leishmania* spp. envolvida e dependente da região geográfica. Atualmente, a paromomicina tem sido utilizada como alternativa para o tratamento da LV na Índia, geralmente em pacientes com contra-indicação para o uso de Sb^V. O mecanismo de ação da paromomicina pode estar relacionado à despolarização da membrana mitocondrial da *Leishmania* spp. resultando em inibição da respiração celular (CROFT; COOMBS, 2003).

A limitada disponibilidade de fármacos para o tratamento, somado à diversidade de efeitos colaterais e o surgimento de cepas resistentes, mostram a importância de pesquisas que sejam focadas no desenvolvimento de novas moléculas com alvos moleculares específicos e que contribuam para o tratamento das leishmanioses, entre outras doenças negligenciadas.

1.3 O efeito dos compostos ciclopaladados em Tripanossomatídeos

Os metais são capazes de se ligarem e interagirem com moléculas biológicas como proteínas e DNA. Os compostos de coordenação possuem um íon metálico central, coordenado à ligantes, por meio de átomos que contem um par de elétrons disponíveis para formar ligação. Esses compostos oferecem uma série de vantagens frente aos compostos orgânicos tradicionais, como: (i) multiplicidade de características inerentes aos centros metálicos, (ii) seu estado de oxidação, (iii) número de coordenação, (iv) tipos de ligantes que permitem o desenho e a síntese de uma imensidade de compostos, variando a carga, geometria e propriedades cinéticas e termodinâmicas dos mesmos (FREZZA et al., 2010; RONCONI; SADLER, 2007). O interesse por compostos de coordenação para o tratamento de doenças, principalmente

o câncer, começou no final de 1960, quando foi descoberta a atividade antitumoral do complexo cis-diamindicloroplatina (II) (cisplatina)-cis-[PtCl₂(NH₃)₂], (ROSEMBERG et al., 1969).

Desde então, como alternativa terapêutica, muitos complexos metálicos utilizados como quimioterápicos no tratamento do câncer foram desenvolvidos como análogos da cisplatina e utilizados frente a diversos parasitos, devido à similaridade entre as vias metabólicas presentes entre células cancerígenas e tripanossomatídeos. O estudo conduzido por Das e Livingstone (1978) representou um marco importante nas pesquisas terapêuticas dos derivados de Pd (II) demonstrando a sua eficiência frente às células tumorais. Sendo assim, nos últimos anos, ciclometalados de paládio (II), conhecidos também como ciclopaladados, foram empregados com sucesso na área médica, como espécies antitumorais (ALBERT et al., 2014; CAIRES, et al., 2007).

Esses compostos bioinorgânicos são explorados para a descrição de novos agentes anti-Trypanosomatidae, incluindo complexos de metais de ouro, platina, irídio, ródio, ósmio, ferro e paládio (CROFT et al., 1992; SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004; FRICKER et al., 2008; MATSUO et al., 2010; NAVARRO et al., 2010; PALADI et al., 2012; FRANCO et al., 2013; VELÁSQUEZ et al., 2014, 2016; ZINSSTAG et al., 1991). Farrell; Williamson e McLaren (1984), demonstraram a atividade tripanocida de compostos quimioterápicos de platina, como a cisplatina e a carboplatina. Esses complexos também apresentaram efetiva bioatividade contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em concentrações que não são tóxicas para o hospedeiro (PALADI et al., 2012) e estão sendo postulados no tratamento da doença de Chagas por Fricker et al., (2008), Matsuo et al., (2010) e Albert et al., (2014).

Sabe-se que entre os mecanismos de ação da cisplatina o seu principal efeito antitumoral está relacionado com a interação covalente com o DNA. Ao ligar-se ao DNA, o complexo de platina causa lesões que alteram a estrutura conformacional da molécula, interferindo nas funções de replicação e transcrição, culminando em eventos de morte celular (KEENE; SMITH, COLLINS, 2009; KELLAND, 2007). Entretanto, muitos testes foram realizados com os complexos de platina (II), indicando efeitos colaterais como imunossupressão (KELLAND, 2007).

Os ciclometalados geralmente estão associados à diversos efeitos colaterais, entretanto, derivados de compostos ciclopaladados têm sido sintetizados e utilizados como alternativa terapêutica uma vez que o anel quelato proporciona a estabilidade termodinâmica e a labilidade apropriada para garantir que o complexo mantenha a sua estrutura intacta tempo suficiente no meio biológico até atingir o seu alvo (MATSUO et

al., 2010; CAIRES et al., 1999). Além disso, complexos quelatos tendem a apresentar uma menor toxicidade (FRICKER et al., 2008; NAVARRO et al., 2010; SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004).

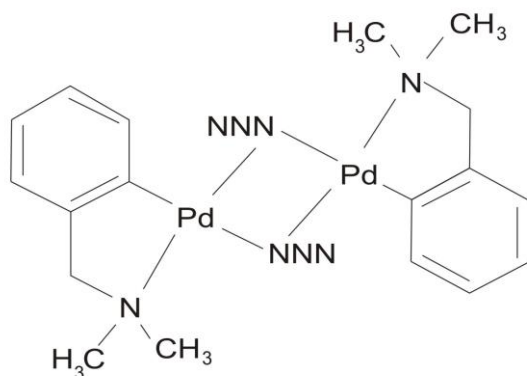
Estudos conduzidos por Gorbacheva, et al., (2008); Kashanian, et al. , (2008) e Matesanz, et al. (1999) indicaram que os complexos de paládio (II), assim como os de platina, interagem com o DNA. Ao estudarem a interação do complexo $[PdCl_2(bipy)+(bipy=2,2'bipiridina)]$ com o DNA, Gao et al., (2008) notaram que diferente do que ocorre com a cisplatina, (que se liga preferencialmente ao nitrogênio N7 da base guanina, seguido por N7-adenina, N1-adenina e N3-citosina) a interação do complexo de paládio (II) com a base adenina ocorreu por meio dos átomos de nitrogênio N3 e N9. Além disso, o complexo e paládio (II) intercalou na fita dupla de DNA (MANSY, et al., 1987).

Mansouri, et al., (2008) ao trabalharem com complexos de Pd(II) e Pt(II) do tipo $[M(Bu-dtc)(bipy)]NO_3$ ($M = Pd(II)$ ou $Pt(II)$, Bu-dtc = butilditiocarbamato) perceberam que o composto de paládio (II) interagiu mais fortemente com o DNA quando comparado ao complexo análogo com platina. Em outros estudos envolvendo os complexos de Pd (II), $[Pd(C_2,N-S(-)dmpa)(dppf)]Cl$, Barbosa et al., (2006) observaram que o ciclopaladado exerce ação biológica sobre os lisossomos. Os resultados apresentados no estudo destes autores sugerem que este complexo desencadeia a permeabilização da membrana lisossômica com a liberação de enzimas lisossômicas, principalmente a catepsina B para o citosol.

Velásquez et al., (2017), conduziram estudos demonstrando que o complexo ciclopaladado binuclear, μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II), denominado **CP2** ($[Pd(dmba)(\mu-N_3)]_2$) (figura 4) possui atividade leishmanicida e tripanocida frente às formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis*, espécie relacionada à LC e LMC, principalmente, e *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas, respectivamente. Em estudos *in vivo*, utilizando o modelo BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, **CP2** não apresentou toxicidade, quando testados frente à marcadores bioquímicos de função renal e hepática, mostrou baixa citotoxicidade quando testados em macrófagos peritoneais de camundongo ($CC_{50} = 506,0 \pm 10,7 \mu M$) e alta seletividade para as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* ($SI = 49,90$) e *T. cruzi* ($SI = 224,88$). Nesse mesmo estudo, Velásquez et al., (2017), determinaram o valor de IC_{50} do ciclopaladado **CP2** sob as formas promastigotas ($IC_{50} = 13,2 \pm 0,7 \mu M$), e amastigotas intracelulares ($IC_{50} = 10,2 \pm 2,2 \mu M$) de *L. (L.) amazonensis*. Os autores demonstraram ainda, que **CP2** é capaz de inibir a etapa de clivagem da DNA Topoisomerase IB do

parasito, enzima essencial nos processos de transcrição e replicação da *Leishmania* spp.

Figura 4. Estruturas do composto ciclopaladado binuclear denominado **CP2** [Pd(dmba)(μ-N₃)₂]. N₃ = azida, dmba: N',N'-dimetilbenzilamina,



Fonte: De Souza, (2013).

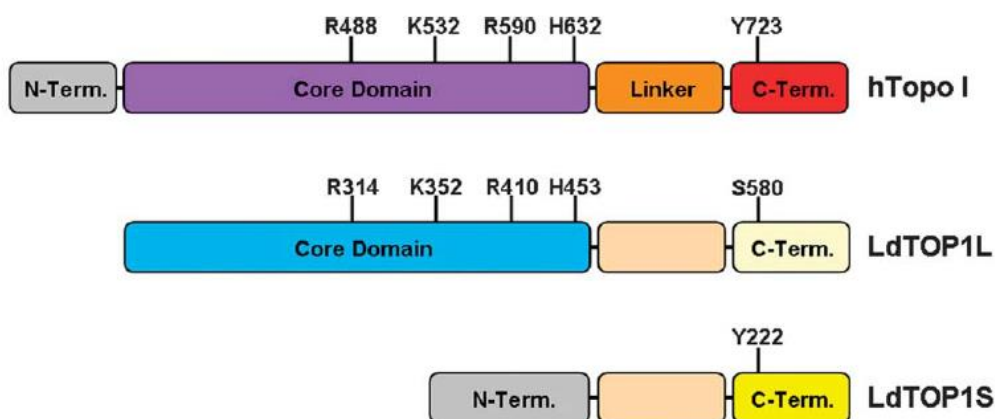
1.4 DNAs topoisomerases como alvos terapêuticos

DNAs topoisomerases (DNATopo) constituem uma família de enzimas que desempenham um importante papel nos processos de replicação e atuam na regulação da topologia do DNA, inserindo uma quebra temporária em uma ou em ambas as fitas do DNA. As topoisomerases IB (TopoIB) produzem quebras numa cadeia do DNA e permitem o giro da cadeia quebrada sobre a cadeia intacta. A TopoIB conserva a energia do rompimento da ligação fosfodiéster, estocando-a na forma de ligação covalente que ocorre entre ela e os grupamentos fosfatos no ponto de clivagem. Depois, a enzima utiliza essa energia para restaurar a ligação fosfodiéster e selar a quebra. Algumas topoisomerases do tipo I podem relaxar super-enovelamentos positivos e negativos no DNA. Essas enzimas são potenciais alvos para drogas citotóxicas. Alguns compostos já foram descritos como capazes de interferir na atividade de TopoI (ALBERTS, et al., 2015).

A DNATopoI, por ser uma enzima essencial em diversos processos celulares, como (i) replicação, (ii) transcrição, (iii) recombinação e (iv) reparo do DNA, tem sido utilizada, testada e explorada como um potente alvo para o desenvolvimento de novos fármacos contra a leishmaniose (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; D'ANNESSA; CASTELLI; DESIDERI, 2015;). De acordo com Das et al., (2004), a DNATopoIB de *Leishmania* está localizada tanto no núcleo quanto no cinetoplasto do parasito.

As DNA Topoisomerases do tipo I foram isoladas de *Leishmania (L.) donovani* (CHAKRABORTY; GUPTA; MAJUMDER, 1993), *T. cruzi* (RIOU et al., 1983) e *T. brucei* (BODLEY et al., 2003), e caracterizadas em *L. (L.) donovani* e *T. cruzi* (BROCCOLI et al., 1999; CHAKRABORTY; GUPTA; MAJUMDER, 1993; D'ANNESSA; CASTELLI; DESIDERI, 2015; RIOU et al., 1983). Interessantemente, e extremamente importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos fármacos, a DNA TopoIB de *Leishmania* possui uma estrutura diferente da DNA TopoIB humana (hTopoI) (D'ANNESSA; CASTELLI; DESIDERI, 2015). A hTopoI é uma enzima monomérica composta por 765 resíduos de aminoácidos, enquanto a DNA TopoIB da *Leishmania* é expressa por dois genes diferentes, produzindo um heterodímero, onde a primeira subunidade possui 635 aminoácidos, denominada de subunidade maior, e a segunda, de 262 resíduos de aminoácidos, denominada de subunidade menor, como mostra a figura 5 (DAVIES et al., 2006; BALAÑA-FOUCE et al., 2014).

Figura 5. Estrutura monomérica da enzima DNA TopoIB humana (hTopoI) e estrutura heterodimérica da DNA TopoIB de *L. (L.) donovani* (LdTOP1L e LdTOP1S).



Fonte: Davies et al., (2006)

Os inibidores das DNATopo podem ser classificados em dois grupos, (i) os considerados venenos e (ii) os inibidores catalíticos. Os venenos atuam ligando-se à enzima e ao DNA ao mesmo tempo, formando um complexo DNA-inibidor-Topoisomerase que não se desliga, impedindo a etapa de religação das cadeias do DNA. Já os inibidores catalíticos se ligam à DNATopo impedindo que a enzima se ligue ao DNA (DAS, 2018). Os primeiros inibidores descritos da enzima DNA TopoIB pertencem à família das camptotecinas (CPT) (alcaloide 4-etil-4-hidroxi-1,12-diidro-4H-2-oxa-6,12a-diaza-dibenzo[b,h]-fluoreno-3,13-diona) a CPT, atua como um veneno nas

células, formando um complexo DNA-CPT-Topoisomerase, que não se desliga (DAS, et al., 2004). A CPT é uma droga antitumoral, que impulsiona o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células (TAGLIARINO, 2001) e estão sendo ligadas à morte celular em tripanossomatídeos, mas com elevada toxicidade (BODLEY; SHAPIRO, 1995). Existem alguns análogos da CPT, *topotecan*, *irinotecan*, *belotecan* e *gimatecan*, desenvolvidos com o intuito de diminuir a sua toxicidade. Estes análogos têm se mostrado menos tóxicos, entretanto, também são menos eficientes quando comparados aos efeitos da CPT (DETERDING et al., 2005).

Prada et al., (2013) ao analisarem os efeitos do gimatecan em *L. (L.) infantum* elucidaram a eficácia do mesmo em causar inibição da DNATopoIB e a morte do parasito. Das et al., (2006), ao estudarem alguns compostos naturais perceberam que os flavonóides como a baicaleína, luteolina e quercetina também foram capazes de bloquear a atividade de religação da TopoIB em *L. (L.) donovani*. Chowdhury et al., (2011), estudando a ação de triterpenos naturais, evidenciaram que derivados betulínicos (isolada da planta *Betula* spp.) a betulina disuccinil, diidrobetulina diglutaril e diidrobetulina disuccinil, exerceram atividade inibitória no processo de relaxamento do DNA de *L. (L.) donovani*.

OLIVEIRA (2012) mostrou que o lapachol, uma naftoquinona natural, e alguns de seus derivados sintéticos como o α - e o β -lapachona, estão sendo associados à inibição de topoisomerasas. Experimentos realizados por Balaña-Fouce et al., (2012) utilizando macrófagos murinos infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com Indotecan ou AM13-55 mostraram atividade anti-amastigota. Ensaios de relaxamento e clivagem do DNA foram realizados *in vitro* na presença do indotecan e o AM13-55, mostrando que estes compostos são capazes de promover a formação do complexo de clivagem comparável à CPT.

Alguns autores indicam que diferentes complexos metálicos possam inibir DNAs topoisomerasas do tipo I ou II (CASINI et al., 2009; CASTELLI et al., 2012; NEVES; VARGAS, 2011; WU; YALOWICH; HASINOFF, 2011). Os antimoniais pentavalentes, utilizados no tratamento da leishmaniose atuam, inibindo as topoisomerasas (CHAKRABORTY; MAJUMDER, 1988), assim como alguns complexos metálicos como o ciclometalado de ouro (III) (CASTELLI, et al., 2011), os complexos de platina (II) (NEVES, et al., 2013) e de cádmio (WU, WALOWICH, HESNOSS, 2011).

Diante das potencialidades do **CP2** e seu promissor uso para o desenvolvimento de análogos mais potentes para o tratamento das leishmanioses, estudos aprofundados do mecanismo de ação dessa molécula e de entendimento das vias “pós-inibição” da

DNA TopolB de *L. (L.) amazonensis*, são extremamente importantes e interessantes, uma vez que em função da inibição enzimática pode-se gerar na célula quebra e/ou acúmulo de danos no DNA do parasito. Pensando em cascata, quebras no DNA promovidas por antileishmaniais podem alterar o funcionamento do ciclo celular e causar aumento na expressão de genes que estão relacionados à processos de reparo do DNA, detoxificação celular e ligados à eventos de sinalização da morte celular do parasito.

1.5 Pós-genômica: A eletroforese bidimensional aplicada à análise proteômica associada à expressão gênica

A revolução propiciada pela genômica tem levado à utilização de técnicas de análise em larga escala de transcritos de todos os genes (transcriptoma) ou análise de todas as proteínas (proteoma) de uma célula. As inter-relações entre essas análises, bem como a investigação da interação entre proteínas (interatoma), têm criado oportunidades de estudo da expressão fisiológica de um determinado micro-organismo. O estudo da expressão de mRNA e de proteínas tem sido fundamental para o entendimento dos mecanismos moleculares presentes em parasitos, uma vez que a expressão de proteínas pode estar intimamente relacionada à expressão dos genes que codificam para essas proteínas (SINGH; NAGARAJ, 2006; COX; MANN, 2007). A proteômica funcional refere-se ao estudo das proteínas de um organismo expressas em um momento específico, envolvendo a caracterização de proteínas diferencialmente expressas de células expostas a diferentes condições ambientais. A análise proteômica comparativa de células baseia-se principalmente na separação de milhares de proteínas por eletroforese bidimensional (2D-PAGE) em combinação com a identificação por espectrometria de massas (MS) (GYGI et al., 1999; SIMPSON, 2002), seguida de estudos de expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR) (GORG; WEISS; DUNN, 2004).

Nesse contexto, é extremamente interessante o estudo aprofundado de novas moléculas candidatas ao desenvolvimento de novos fármacos, mais eficientes e menos tóxicas para o tratamento das leishmanioses. O estudo dessas novas moléculas está acoplado ao entendimento do seu mecanismo de ação, elucidando como o composto é capaz de eliminar formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. Desta forma, Velásquez, (2017) realizaram análises proteômicas comparativas, por meio da técnica

de 2D-PAGE seguida por espectrometria de massas, para identificar proteínas diferencialmente expressas em *L. (L.) amazonensis* na ausência/presença de **CP2**.

Dentre as proteínas encontradas nos ensaios supracitados, destacam-se cinco proteínas envolvidas no processo de tradução/síntese de proteínas (ribonucleoproteína P18 mitocondrial, fator translacional de elongação 1 β , proteína 60S ribossomal, fator de elongação 1 α e fator de elongação 2), duas associadas ao metabolismo de proteínas (carboxipeptidase e subunidade α do proteasomo), seis chaperoninas associadas à resposta ao estresse (GRP78, calreticulina, HSP70, dissulfureto isomerase (PDI), proteína de choque térmico 10KDa (HSP10 e HSP83-1), duas proteínas que atuam no processo de detoxificação celular (triptanotona redutase e triptaredoxina peroxidase (peroxiredoxina), duas proteínas associadas à cadeia respiratória (citocromo c oxidase subunidade IV e ATP sintase subunidade β) e duas proteínas relacionadas com o citoesqueleto (β tubulina e α tubulina). Durante a isoeletrofocalização, as proteínas migram de acordo com os seus pontos isoelétricos (pI). A adição de fosfato à proteína resulta no aumento de duas cargas negativas, isso faz com que a proteína desloque o seu pI para o lado ácido (+), dessa forma, foi possível identificar as várias isoformas de algumas proteínas, de acordo com o pI de cada uma delas, como é o caso da calreticulina, GRP78, citocromo c-oxidase, triptanotona peroxidase e ATP sintase subunidade β , já que os eventos de fosforilação são dinâmicos e variam de acordo com as condições ambientais em que a célula se encontra (VELÁSQUEZ, 2017).

Algumas dessas proteínas, como é o caso da HSP70, triptanotona redutase e subunidade α do proteasomo estão envolvidas na sobrevivência intracelular do parasito e na ativação da morte celular, assim como a HSP10kDa (SILVERMAN et al., 2008), mostrando que muitas proteínas relacionadas à tentativa de sobrevivência ou ativação da sinalização da cascata de morte celular estão sendo mais expressas com o intuito de reestabelecer a homeostase celular, ou levar o parasito à morte. A maioria das proteínas super-expressas na célula do parasito na presença de **CP2** estão presentes em duas organelas importantes para as células: a mitocôndria e o reticulo endoplasmático (RE). Dentre as proteínas mitocondriais de membrana, o citocoromo C subunidade IV, a ATP sintase, e a ribonucleoproteína p18 que participam da fosforilação oxidativa e do transporte de íons foram encontradas (KOWALTOWSKI, 2004). Variações na integridade e funcionalidade da mitocôndria podem afetar a viabilidade celular, sendo que, vários fenômenos mitocondriais participam como iniciadores, amplificadores e reguladores de sinais que levam aos processos de despolarização da membrana

mitocondrial e morte celular (ADAMS; CORY, 2001; CROMPTON, 1999; DANIAL; KORSMEYER, 2004; DUCHEN et al., 1993; HESS; MANSON, 1984).

Dentre os achados proteômicos (VELÁSQUEZ, 2017), a calreticulina também foi encontrada super-expressa, essa enzima está intimamente ligada ao RE, uma vez que ela é a principal proteína ligadora de Ca^{2+} dessa organela (DOCAMPO; HUANG, 2015; GROENENDYK; LYNCH; MICHALAK, 2004). Em condições fisiológicas, o nível de calreticulina no RE está diretamente relacionado à concentração do Ca^{2+} , que varia de acordo com o metabolismo celular. Modificações nos níveis de calreticulina por superexpressão/subexpressão podem acarretar uma rápida modificação na homeostase do Ca^{2+} , traduzido no processo de morte celular (GROENENDYK; LYNCH; MICHALAK, 2004). Inúmeros tipos de estresse celular podem aumentar os níveis de calreticulina, contribuindo para defeitos de sinalização por Ca^{2+} , interferindo no balanço intracelular desse cátion em *L. (L.) amazonensis*, aumentando, como consequência, os níveis de ROS nas células (GROENENDYK; LYNCH; MICHALAK, 2004; LIM et al., 2008). Esses níveis aumentados de ROS nas células também podem ser consequência indireta do aumento da expressão da proteína dissulfeto isomerase (PDI) que esta envolvida, juntamente com a enzima oxidoreductina (Ero1p), na formação de ligações dissulfeto no RE para transferir elétrons dos grupos tióis de proteínas para o oxigênio molecular, gerando ROS como subproduto (TU; WEISSMAN, 2004).

De fato, a geração de ROS em excesso, promovida pela despolarização da membrana mitocondrial, ou pela atividade da PDI, podem justificar o aumento observado nos níveis de tripanotona redutase e triparedoxina peroxidase (peroxiredoxina), enzimas envolvidas no processo de detoxificação celular, e enzimas relacionadas com diferentes respostas aos estresses celulares, como a GRP78, HSP70, HSP83-1 e a HSP10kDa.

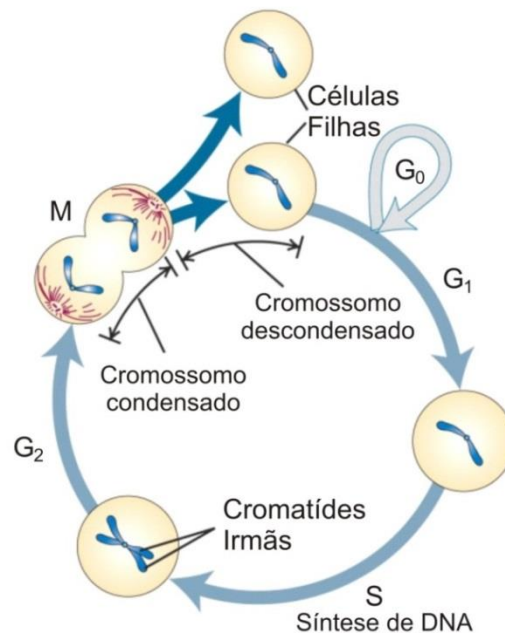
1.6 O ciclo celular como regulador da sobrevivência da *Leishmania* spp.

O entendimento dos mecanismos de ação dos compostos que interferem na atuação de enzimas importantes para a homeostase do organismo, depende da compreensão dos processos de estabilidade genômica. Essa estabilidade é condição essencial à sobrevivência e ao funcionamento dos organismos vivos e, portanto, é constantemente desafiada por danos causados na estrutura primária do DNA por fatores que incluem desde metabólitos celulares até agentes externos. No intuito de preservar a integridade genômica e contornar os efeitos deletérios dessas modificações, uma via constituída de proteínas especializadas em reconhecer e reparar esses danos foi

selecionada ao longo do curso evolutivo. A detecção do dano ao DNA ou a organelas e enzimas essenciais para a sobrevivência do parasito é sinalizada por proteínas que medeiam e executam uma determinada resposta, que pode incluir modificação da cromatina (WANG; HAN et al., 2012), expressão de genes envolvidos no reparo de DNA (YOUSEFZADEH; WOOD, 2013), parada do ciclo celular (GRANDIN; CHARBONNEAU, 2013) e morte celular (HUANG; ZHANG et al., 2012).

A proliferação celular é um processo extremamente coordenado onde a progressão pelas fases do ciclo celular é regulada, de modo muito preciso, por uma rede bioquímica complexa, que sinaliza o andamento e as passagens entre G1 (transcrição do RNA e síntese de proteínas), S (replicação do DNA), G2 (transcrição do RNA e síntese de proteínas), e M (divisão celular). Esse controle é vital para a manutenção do ritmo de proliferação, para garantir a correta replicação do material genético, segregação dos cromossomos, e coordenar os processos de diferenciação, senescência e morte (MALUMBRES; BARBACID, 2009) dos organismos.

Figura 6. Fases do ciclo celular em eucariotos. **G1/G2:** Fase do ciclo celular em que ocorre a transcrição do RNA e síntese de proteínas. **G0:** Fase quiescente **S:** Fase do ciclo celular em que ocorre a síntese de DNA. **M:** Fase do ciclo celular em que a ocorre a mitose.

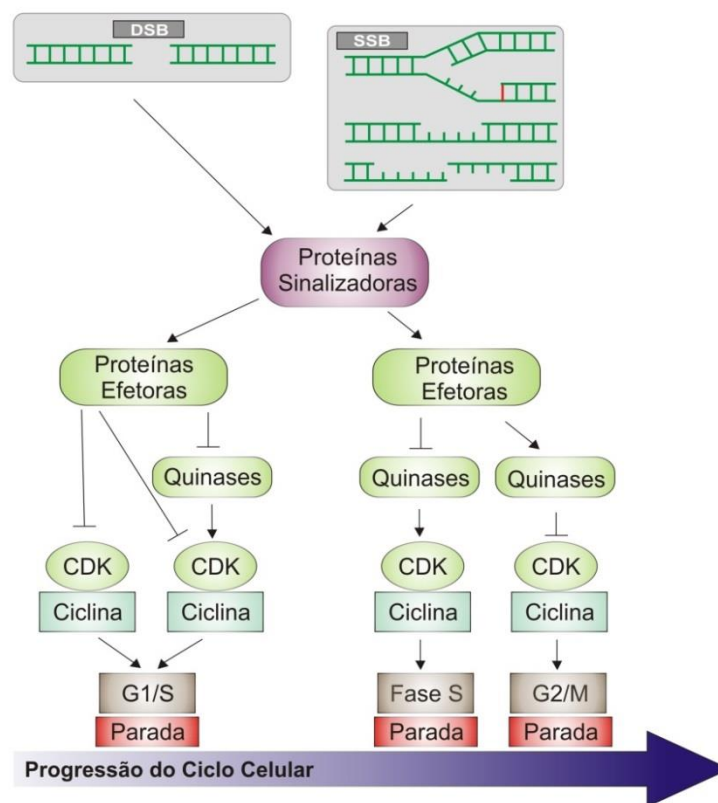


Fonte: Adaptado de: Apostila divisão celular – USP. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/guellitymarcel/apostila-diviso-celular-usp>>. Acesso em 06-11-2018.

Se as condições extracelulares são desfavoráveis, as células retardam a progressão celular, parando em G₁. Se as condições intracelulares não estão

favoráveis, as células podem parar nas fases S ou G1, para decidirem se completam o ciclo celular ou sinalizam para a morte celular. O sistema de controle do ciclo celular bloqueia a progressão, fazendo com que as células parem nos *checkpoints* se detectarem problemas dentro ou fora das células. Em cada ponto de checagem a célula deve responder uma série de “perguntas fisiológicas”, como, “todo o DNA está replicado?”, “todos os cromossomos estão ligados ao fuso?”, “o ambiente é favorável?”, para saber se deve progredir ou parar até que a homeostase seja retomada (ALBERTS, et al., 2015).

Figura 7. Modelo do controle do ciclo celular de células eucarióticas. Em Função de Danos no DNA. DSB (Double Strand Break - quebra da fita dupla de DNA) e SSB (Single Strand Break – quebra de uma única fita do DNA) são reconhecidas por quinases e o recrutamento destas enzimas acarreta na ativação de vias que denotam consequente parada do ciclo celular em G1 ou S, dependendo das enzimas recrutadas e do tipo de dano causado ao DNA.



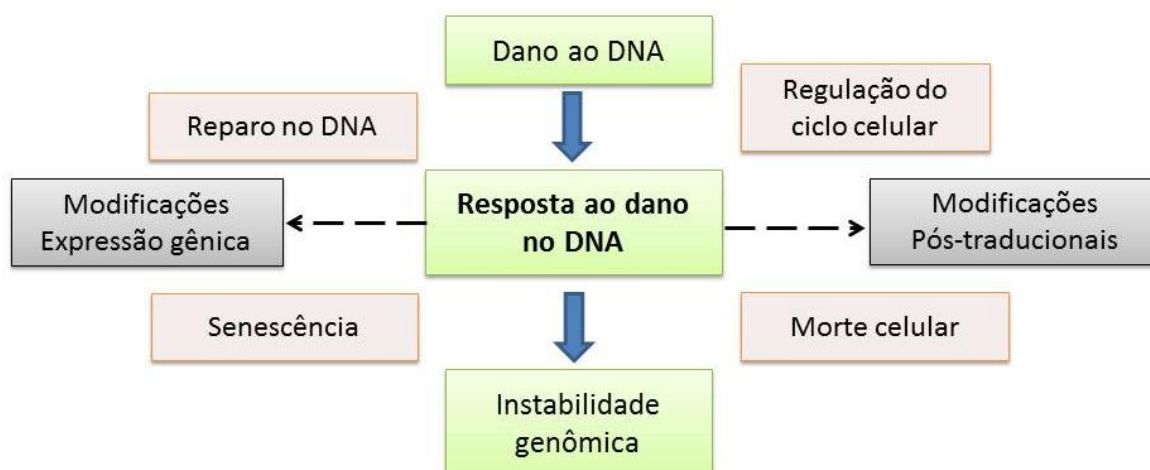
Fonte: Adaptada de Curtin, (2012) *apud* Damasceno, et al., 2016.

Inicialmente, essas vias respondem a fatores extracelulares que, através de uma cascata de sinalização, fornecem o estímulo para que a célula saia de G1 e se prepare para entrar em S. Desse modo, a célula permanece durante G1 em um estado quiescente, conhecido como G0, até que ocorra o estímulo mitótico extracelular que sinalize a saída de G1 (EKHOLM et al., 2001). Ao fim de G1, o sistema que regula a

progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular, passando a ser controlado por mecanismos intracelulares que envolvem a sequencial ativação de uma família de proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs) (NELSON; COX, 2005) que são responsáveis por sinalizarem a fosforilação e desfosforilação de muitas proteínas envolvidas nos eventos que envolvem as fases do ciclo (ALBERTS, et al., 2015).

Para o estabelecimento de uma resposta apropriada aos danos no DNA é necessário que o controle da progressão do ciclo celular esteja acoplado às vias de detecção e reparo de DNA. Dessa forma, é possível garantir que as lesões no DNA sejam reparadas antes que se tornem mutações permanentes e herdáveis durante a mitose. A quebra da dupla fita do DNA ativa uma cascata de sinalização incluindo muitas proteínas quinases que desencadeiam a parada do ciclo celular na fase G1. Estruturas de DNA na forma de fita simples, se danificadas desencadeiam a inibição de ciclinas, e paralisa o ciclo celular na fase S ou G2 (AMBIT, et al., 2008). Dessa forma, agentes leishmanicidas como CPT e **CP2** podem ser centrais na coordenação entre detecção de danos no DNA e progressão da divisão celular.

Figura 8. Respostas ao dano no DNA de eucariotos. A geração de danos ao DNA acarreta ativação de vias que denotam desde regulação do ciclo celular, até a morte celular dos organismos.



Fonte: Adaptada de: Alberts, (2015).

Defeitos em proteínas sinalizadoras e efetoras que compõem o ciclo celular causam instabilidade genômica e podem resultar em elevada taxa de mutações e quebras no DNA (ALBERTS, et al., 2004). Um conjunto de mecanismos especializados em reconhecer e reparar os danos estruturais no DNA foi selecionado durante a

evolução dos organismos para escapar dos efeitos deletérios decorrentes das alterações no material genético (HARPER; ELLEDGE, 2007). Células defeituosas para esses mecanismos apresentam maior sensibilidade a agentes tóxicos e genotóxicos e, em mamíferos, podem originar doenças como o câncer, em tripanossomatídeos, podem levar os parasitos à morte celular. Cada tipo de lesão no DNA pode desencadear uma resposta distinta (AMBIT, et al., 2008). Se há dano ao DNA, existe uma resposta à este dano, que inclui modificações da expressão gênica e modificações pós-traducionais com o intuito de reparar o dano ao DNA e regular o ciclo celular (ALBERTS, et al., 2015), mas se estes eventos não são bem sucedidos, há instabilidade genômica que pode ser traduzida nos processos de senescência e morte celular.

1.7 Estresse e Morte celular em Eucariotos

A terminologia *Reactive Oxygen Species* (ROS) inclui os radicais livres, como o radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), ânion hidroxila (OH^-), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), ânion superóxido (O_2^-), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcóxila ($\text{RO}\cdot$) e os não-radicalares, como o oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipocloroso que embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativos em decorrência de sua instabilidade (BERGENDI et al., 1999; WISEMAN; KAUR; HALLIWELL, 1995; CADET et al., 1999). Essas moléculas têm propriedades químicas inerentes que conferem a reatividade a diferentes alvos biológicos. As maiores fontes produtoras de ROS incluem a mitocôndria, o retículo endoplasmático, a membrana plasmática, o peroxissomo e o citosol. Em concentrações fisiológicas, as ROS têm funções biológicas definidas, atuando como moléculas de sinalização que regulam os processos biológicos e fisiológicos com o intuito de manter a homeostase celular (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Entretanto, caso os elétrons escapem da membrana externa da mitocôndria ou sob adversidades ambientais, há o aumento de ROS no interior das células.

Em geral, níveis elevados de ROS, que excedem a capacidade antioxidante celular, são prejudiciais às células, induzindo estresse oxidativo. Esse aumento de ROS pode causar a despolarização do $\Delta\Psi_m$, resultando em aumento no Ca^{2+} intracelular e liberação de citocromo C no citosol (KUMARI et al., 2017), oxidação dos lipídios de membrana, danos às proteínas e ao DNA com consequente rompimento da homeostase celular (SIES, 2017). Em condições de homeostase, as ROS podem ser consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários, exercendo (i) regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox e (ii) alterações da homeostase celular,

através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012). Em células de mamíferos, o aumento da produção de ROS celular foi sugerido como responsável pela despolarização da membrana mitocondrial e subsequente morte celular (BANKI et al., 1999).

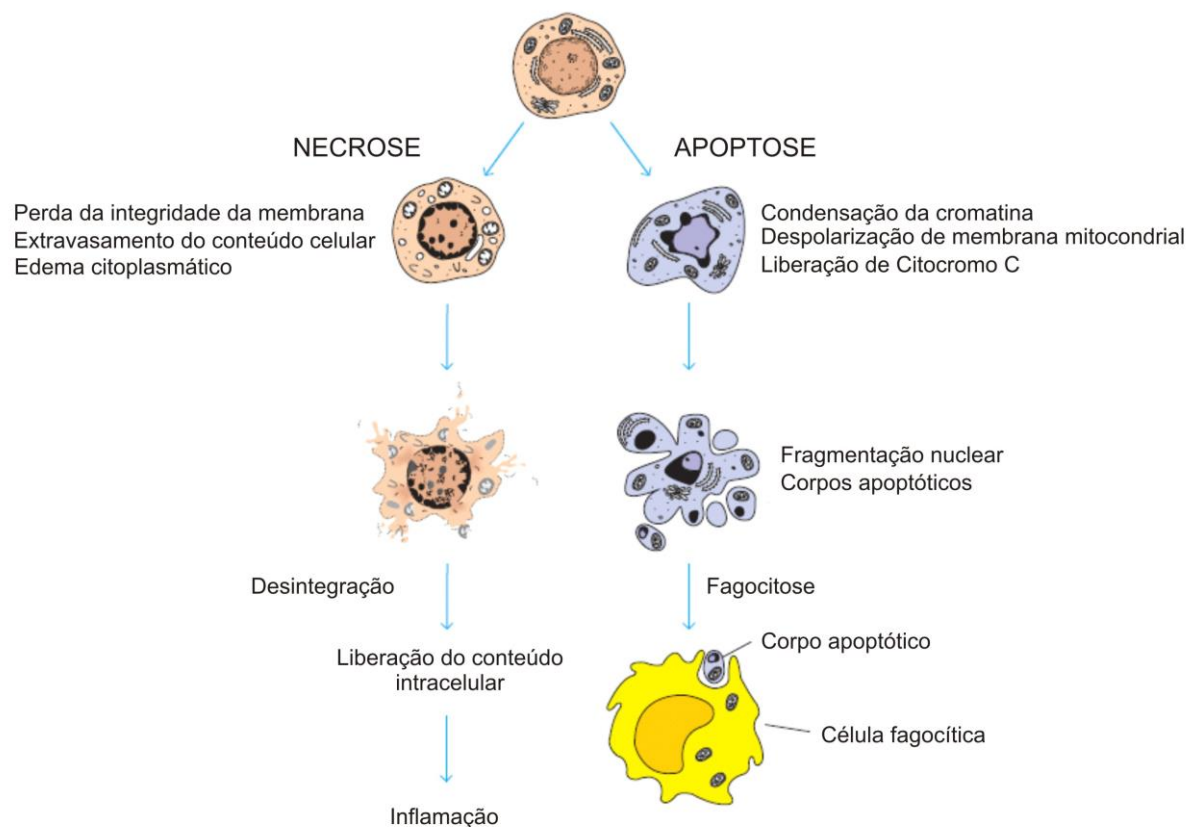
O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação cromatínica (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA, exposição da fosfatidilserina (PS), alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática e liberação do citocromo C no citosol (HEISKANEN et al., 1999; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais (MARIA, 1998; KERR, 1995; KERR, 2002).

Por outro lado, a morte celular por necrose ocorre, geralmente, em resposta à injúria severa às células e é caracterizada morfolologicamente por edema citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Consequentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar injúria e até morte de células vizinhas (figura 9), ou seja, nessa condição um grande número de células são afetadas e lesadas ao mesmo tempo (CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002). Já a autofagia contribui primordialmente para a sobrevivência celular através da degradação de macromoléculas e reciclagem de organelas, atuando assim na manutenção da homeostase (DUSZENKO et al., 2011). Entretanto, algumas substâncias podem induzir uma exacerbação desse processo, culminando na morte celular em tripanosomatídeos (BERA et al., 2003).

A célula tem quatro sistemas interdependentes que quando alterados podem levar à morte celular: (i) danos às membranas, responsáveis por manter a homeostasia iônica e osmótica da célula e das organelas, (ii), danos à mitocôndria, responsável pela respiração aeróbica e fosforilação oxidativa com produção de ATP, (iii), dano à síntese de proteínas e manutenção do citoesqueleto e (iv) danos ao DNA. Dessa forma, muitos eventos podem levar uma célula à morte celular. Interessantemente, alguns reguladores do ciclo celular podem influenciar tanto a divisão quanto a morte celular programada

(MCP). A correlação entre ciclo celular e apoptose está comprovada devido às funções de muitas proteínas envolvidas em ambos os processos, entre elas: c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, ciclinas e CK1. A fosforilação e desfosforilação de proteínas controladas por quinases e fosfatases constitui um dos principais mecanismos que regulam uma variedade de processos celulares incluindo o ciclo celular e a morte celular (VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003).

Figura 9. Diferenças entre dois tipos de morte celular comuns em eucariotos.

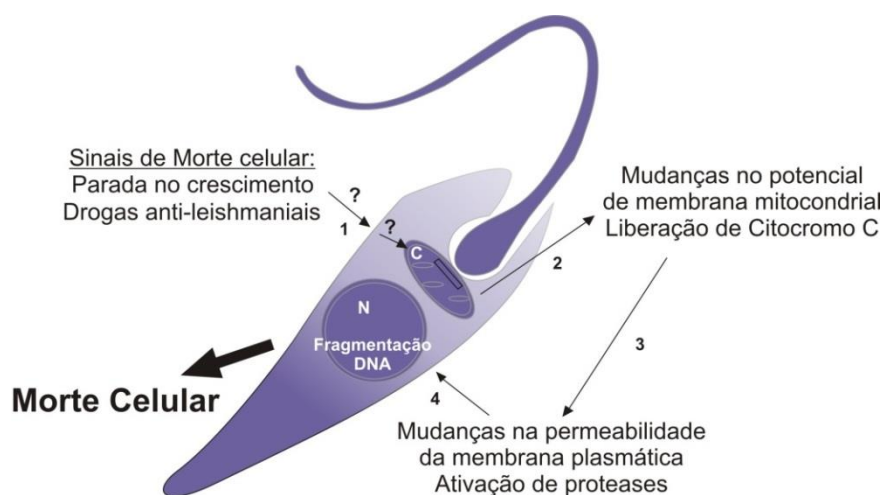


Fonte: Adaptado de Freeman, et al., (2007).

Embora a ocorrência de apoptose em protozoários permaneça controversa (AMBIT et al., 2008), é importante considerar que muitos eventos externos ou internos levam o parasito à morte celular (LEE et al., 2007; RAINA; KAUR, 2012; GONZALEZ, 2009, AMBIT, et al., 2008). Contudo, existe uma grande lacuna na compreensão da MCP em organismos unicelulares porque apenas alguns dos componentes celulares da via da apoptose foram identificados. Por exemplo, não é conhecido como os sinais iniciados externamente resultam na alteração do $\Delta\Psi_m$, ou se de fato as metacaspases (MCAs) fazem o papel das caspases na via de ativação da apoptose (DEBRABANT, et

al., 2003; GANNAVARAM, DEBRABANT, 2012) em *Leishmania* spp.

Figura 10. Modelo de MCP em *Leishmania* spp. Este modelo descreve os vários eventos na indução da MCP em *Leishmania*, por diminuição de proliferação, drogas antileishmaniais, mudança no potencial de membrana, ativação de proteases. Setas indicam a possível sequência de acontecimentos, 1-2-3 e 4. O ponto de interrogação indica o desconhecimento de como esses eventos de fato acontecem no parasito. Núcleo N; C-cinetoplasto.



Fonte: Adaptado de Debrabant, et al., (2003).

A *Leishmania* possui um ciclo de vida difásico alternando entre promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares. De acordo com Gonzales et al., (2007) apenas uma parte dos promastigotas diferenciam-se na forma metacíclica, dessa forma, esses autores propuseram que as restantes formas pró-cíclicas passam por MCP para limitar a utilização de nutrientes, que são restritos no intestino do flebotomíneo e, dessa forma, permitir a sobrevivência da forma mais capaz de transmitir a doença, a metacíclica. Além disso, no hospedeiro mamífero, em contraste com a necrose, as células que morrem pelos processos semelhantes à apoptose não são lisadas, e sim fagocitadas, evitando o desenvolvimento de uma resposta inflamatória, desempenhando, desse modo, um papel importante no estabelecimento inicial da infecção e progressão para a fase crônica da doença, promovendo um equilíbrio entre proliferação e morte celular (GONZALES et al., 2007)

Conclusões

-
- ❑ **CP2** é considerado um bom candidato para o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L. (L.) amazonensis*;
 - ❑ **CP2** induz o aumento na expressão de genes e proteínas em *L. (L.) amazonensis* relacionados com processos de detoxificação celular e disfunção mitocondrial;
 - ❑ **CP2** induz parada na progressão do ciclo celular em *L. (L.) amazonensis* na fase S;
 - ❑ *L. (L.) amazonensis* apresenta níveis de histona γ H2A aumentados após tratamento com **CP2**;
 - ❑ **CP2** induz a despolarização do potencial da membrana mitocondrial em *L. (L.) amazonensis*;
 - ❑ **CP2** aumenta a formação de ROS intracelular, provocando estresse oxidativo em *L. (L.) amazonensis*;
 - ❑ **CP2** induz a morte celular em *L. (L.) amazonensis*.

Referências

ADAMS, J. M.; CORY, S. Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. **Trends Biochem Sci**, Jan; v. 26, n.1, p.61-6, 2001.

ALBERT, J. et al. A new family of doubly cyclopalladated diimines. A remarkable effect of the linker between the metalated units on their cytotoxicity. **Organometallics**, v. 33, n. 11, p. 2862–2873, 2014.

ALBERTS, B. et al. Molecular biology of the cell. 6th ed. New York: Garland Science, 2015.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; WALTER, P. Biologia Molecular da Célula, 4.ed. Porto Alegre: Artmed Editora, p.1586, 2004.

ALMEIDA, L. et. al. Nanotechnological strategies for treatment of leishmaniasis. Review. **J. Biomed. Nanotech.**, 2017.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J. et. al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **Hist. Cienc. Saude Manguinhos**, v.10, n. 3, p. 852-882, 2003.

ALVAR, J. et. al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

AMBIT, A. et al. An essential role for the *Leishmania major* metacaspase in cell cycle progression. **Cell Death Differ.**, v. 15, n. 1, p. 113-122, 2008.

AMEISEN, J.C. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. **Cell Death Differ.** v.2, p.285-300, 1995.

ARMIJOS, R. X. et al. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. **Acta. Trop.**, v. 91, n. 2, p. 153-160, 2004.

ARNOULT, D. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilisation. **Cell Death Differ.** v.9, n.1, p.65-81, 2002.

ARRUDA D. C, et al. Cyclopalladated compound 7^a induces apoptosis- and autophagy-like mechanisms in *Paracoccidioides* and is a candidate for paracoccidioidomycosis treatment. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 59 p.7214 –7223, 2015.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int. J. Parasitol.** v.30, n.12-13, p.1269-1281, 2000.

BAKSH, S. et al. Interaction of calreticulin with protein disulfide isomerase. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 52, p. 31338–31344, 1995.

- BALANA-FOUCE, R. et al. Indotecan (LMP400) and AM13-55: Two Novel Indenoisoquinolines Show Potential for Treating Visceral Leishmaniasis. **Antimicrob. Agents Chem.**, v. 56, n. 10, p. 5264–5270, 1 out. 2012.
- BALANA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmacol.**, v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.
- BALANA-FOUCE, R., Garcia-Estrada, et al. "Gene disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*." **BMC Microbiol.** v.8, p.113, 2008.
- BANKI, K. et al. A Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. **J. Immunol.**, v. 162, p.1466–1479, 1999.
- BARBOSA, C.M.V. et al. Biphosphinic palladacycle complex mediates lysosomal-membrane permeabilization and cell death in K562 leukaemia cells. **Eur. J. Pharmacol.**, Aug v. 7, n. 542, p. 37-47, 2006.
- BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 44, n. 5, p. 536-546, 1991.
- BARROS-ALVAREZ, X. et al. Glycosomal Targets for Anti-Trypanosomatid Drug Discovery. **Curr. Med. Chem.** v.21, n.15 p.1679-706, 2014.
- BEN SALAH, A.; et al. Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, n. 6, p. 524-532, 2013.
- BEN SALAH, A.; et al., a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, n. 5, p. 432, 2009.
- BERA, A. et al. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 127, n. 1, p. 23-35, 2003.
- BERTRAND, P.; et al. Physical interaction between components of DNA mismatch repair and nucleotide excision repair. **Natl. Acad. Sci.**, v.95, p.14278, 1998.
- BERGENDI, L. at al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, Elmsford, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.
- BERMAN, J. D. et al. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull. World Health Organ.**, v. 76, n. 1, p. 25-32, 1998.
- BERRIDGE, M. J. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. **Cell calcium**, v. 32, n. 5–6, p. 235–249, 2002.

- BESTEIRO, S., R. A. et al. "Protein turnover and differentiation in *Leishmania*." **Int. J. Parasitol** v.37, n.10, p.1063-1075, 2007.
- BHARGAVA, P.; SINGH R. Developments in diagnosis and antileishmanial drugs. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2012.
- BHATTACHARYA, S. K.; SUR, D.; KARBWANG, J. Childhood visceral leishmaniasis. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 353-356, 2006.
- BODLEY, A. L. et al. An unusual type IB topoisomerase from African trypanosomes. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 100, n. 13, p. 7539–7544, 2003.
- BODLEY, A. L.; SHAPIRO, T. A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on *trypanosomes* and *Leishmania*. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 92, n. 9, p. 3726–3730, 25 abr. 1995.
- BOONSTRA, J. e POST, J.A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene** v. 337, n.1 p.13, 2004.
- BRECKENRIDGE, D. G. et al. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. **Oncogene**, v. 22, n. 53, p. 8608–8618, 24 nov. 2003.
- BROCCOLI, S. et al. Characterization of a *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 13, p. 2745–2752, 1 jul. 1999.
- BUERMEYER, A. B. et al. Mammalian DNA mismatch repair. **Annu. Rev. Genet.**, v. 33, p. 533, 1999.
- BUSTIN, S.A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Special Report Clinical Chemistry. **Clin. Chem.** v.4, p.611–622, 2009.
- CADET, J.; et al. Hydroxyl radicals and DNA base damage. **Mutat. Res.**, v. 424, n. 1/2, p. 9-21, 1999.
- CAIRES, A C. F. Recent advances involving palladium (II) complexes for the cancer therapy. **Anticancer Agents Med. Chem.** , v. 7, n. 5, p. 484–491, 2007.
- CAIRES, A. C. F. et al. Síntese e atividade citotóxica de alguns azido-ciclopalladados estabilizados com ligantes bifosfínicos. **Quim Nova**, v. 22, n. 3, p. 329–334, jun. 1999.
- CAMARGO-NEVES, V.L., GOMES, A. DE C., ANTUNES, J.L. Correlation of the presence of phlebotominae species (Diptera: Psychodidae) with records of American tegumentary leishmaniasis cases in the State of São Paulo. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** v.35. p.299-306. 2002.
- CARINI, A. e PARANHOS, U. Identification de l'ulcera de Baurú avec le bouton d'Orient. **Bull. Soc. Path. Exot.** v.2, p.225-2266, 1909.

- CASINI, A. et al. Chemistry, antiproliferative properties, tumor selectivity, and molecular mechanisms of novel gold(III) compounds for cancer treatment: A systematic study. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 14, n. 7, p. 1139–1149, 2009.
- CASTELLI, S. et al. Inhibition of human DNA topoisomerase IB by a cyclometalated gold III compound: analysis on the different steps of the enzyme catalytic cycle. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 516, n. 2, p. 108–112, 15 dez. 2011.
- CASTELLI, S. et al. Interaction between natural compounds and human topoisomerase I. **Biol. Chem.** v. 393, n. 11, p. 1327–1340, 2012.
- CHAKRABORTY, A. K.; GUPTA, A.; MAJUMDER, H. K. A type 1 DNA topoisomerase from the kinetoplast hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 30, n. 5, p. 257–263, 1993.
- CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: Specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 152, n. 2, p. 605–611, 1988.
- CHATELAIN, E.; IOSET, K. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Des. Devel. Ther.**, v. 5, p. 175-181, 2011.
- CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania* **J Parasit Dis.** v. 34, n.1, p.1-13, 2010.
- CHEN, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. **Annu Rev Cell Biol.** v.4, p.155-181, 1988.
- CHOWDHURY, S. et al. Novel betulin derivatives as antileishmanial agents with mode of action targeting type IB DNA topoisomerase. **Mol. Pharmacol.**, v. 80, n. 4, p. 694–703, 2011.
- COSTA, R. M. A. et al. The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. **Biochimie.**, v. 85, p. 1083, 2003
- COSTA, R. M. A. et al. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Gen. Mol. Biol.** v. 24, p. 131, 2001.
- COX, J.; MANN, M. Is proteomics the new genomics? **Cell**, v. 130, n. 3, p. 395-398, 2007.
- CROFT, S. L. et al. The activity of platinum, iridium and rhodium drug complexes against *Leishmania donovani*. **Trop Med Parasitol.** v. 43, n. 1, p. 24–28, mar. 1992.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Review. **Trends Parasitol.**, v.19, n. 11, p. 502-508, 2003.
- CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian. J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 399-410, 2006.

CROMPTON, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, v. 341 n. 2, p. 233–249, 1999.

CUERVO, P. et al. Proteomic characterization of the released/secreted proteins of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes. **J. Proteomics**, v. 73, n. 1, p. 79-92, 2009.

CUERVO, P.; DOMONT, G.; DE JESUS, J. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **J. Proteomics**, v. 73, n. 5, p. 845-867, 2010.

CUNNINGHAM, A.C. "Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania" EXP. **Mol. Pathol.** v.72. n.2. p.132-141. 1885.

CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, n. 265, p. 49-72, 2002.

CURTIN, N. J. "DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target." **Nat. Rev. Cancer**, v.12, n.12, p.801-817, 2012.

D'ANNESSA, I.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A. Topoisomerase 1B as a target against leishmaniasis. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 15, n. 3, p. 203–210, 2015.

DA SILVEIRA, et al. Envolvimento da proteína Telomérica Replication Protein A-1 na resposta a danos nos telômeros de *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1) Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011.

DAMASCENO, J. D., R. et al.. "Functional compartmentalization of Rad9 and Hus1 reveals diverse assembly of the 9-1-1 complex components during the DNA damage response in *Leishmania*." **Mol. Microbiol.** v.101, n.6, p.1054-1068, 2016.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell.** v.116, n.2, p.205-19, 2004.

DAS, B. B. et al. Reconstitution and functional characterization of the unusual bi-subunit type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*. **FEBS letters**, v. 565, n. 1–3, p. 81–8, 7 maio 2004.

DAS, B. B. et al. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. **Indian J. Med. Reser.**, v. 123, n. 3, p. 221–32, mar. 2006.

DAS, M.; LIVINGSTONE, S. E. Cytotoxic action of some transition metal chelates of schiff bases derived from s-methyldithiocarbamate. **Br J. Cancer** , v. 37, n. 3, p. 466-469, 1978.

DAS, S. K. et al. Neutral Porphyrin Derivative Exerts Anticancer Activity by Targeting Cellular Topoisomerase I (Top1) and Promotes Apoptotic Cell Death without Stabilizing Top1-DNA Cleavage Complexes. **J. Med. Chem.**, n. 61, p. 804-817, 2018.

- DAVIES, D. R. et al. The structure of the transition state of the heterodimeric topoisomerase I of *Leishmania donovani* as a vanadate complex with nicked DNA. **J. Mol. Biol.**, v. 357, n. 4, p. 1202–1210, 2006.
- DE LAAT, W. L.; JASPERS, N. G. J.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; Molecular mechanism of nucleotide excision repair. **Genes Dev.** v. 13, p. 768, 1999.
- DE LA LOMA, A. et al. Leishmaniasis or AIDS? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 3, p. 421-422, 1985.
- DE SOUZA, R. A. Compostos de Pd(II) contendo ligantes piridínicos: potencialidades biológicas e aspectos estruturais. [s.l.] Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Tese (doutorado) Araraquara, 2013.
- DEBRABANT, A., et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **Intern. J. Parasitol.**, v.33, p.257–267, 2003.
- DEMAUREX, N.; DISTELHORST, C. Cell biology. Apoptosis: the calcium connection. **Science (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5616, p. 65–67, 2003.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.**, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.
- DETERDING, A. et al. Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. **Acta tropica**, v. 93, n. 3, p. 311–316, mar. 2005.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic. Res.**, v. 46, p. 382-419, 2012.
- DOCAMPO, R.; HUANG, G. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell calcium**, v. 57, n. 3, p. 194–202, mar. 2015.
- DONOVAN, C. The etiology of one of the heterogeneous fevers in India. **Br. Med. J.**, v.2, n.12, p.1401. 1903.
- DUCHEN, M. R. et al. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. **Cardiovas. Res.**, v. 27, n. 10, p. 1790–1794, 1993.
- DUSZENKO, M., FIGARELLA, K., MACLEOD, E. T., AND WELBURN, S. C. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends Paras. Itol.** v.22, p. 536–542. 2011.
- EKHOLM, S.V.; ZICKERT, P.; REED, S.I. ZETTERBERG, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. **Mol. Cell Biol.** v.21, p.3256–3265, 2001.
- FARRELL, N. P.; WILLIAMSON, J.; MCLAREN, D. J. M. Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal and platinum-metal-drug dual-function complexes. **Biochem. Pharmacol.**, v. 33, n. 7, p. 961–971, 1984.

FERNANDES, J. F.; CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 18, p. 195-202, 1966

FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. DNA damage-induced G₂–M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. **Nat. Cell Biol.**, v.4, p. 993–997, 2012.

FERREIRA, E. G. Potencial citotóxico de alcalóides guanidínicos isolados da esponja *Monanchora arbuscula* coletada no parque estadual marinho pedra da risca do meio – CE. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Universidade Federal do Ceará. Janeiro, 2009.

FIGURA 1. Distribuição Geográfica das leishmanioses. Disponível em: <WHO (<http://www.who.int/en/>)>. Acesso em: 05-11-2018.

FIGURA 6. Fases do ciclo celular em eucariotos. G1/G2: Adaptado de: Apostila divisão celular – USP. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/guellitymarcel/apostila-diviso-celular-usp>>. Acesso em: 06-11-2018.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FONTANA L. et al. The effects of palladium nanoparticles on the renal function of female Wistar rats. **NLM.** ; v. 9, n. 7, p. 843-51, 2015.

FOSTER, E. R.; DOWNS, J. A. Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. **FEBS J.**, v. 272, n. 13, p. 3231–3240, 2005.

FRANCO, L. P. et al. Palladium(II) imine ligands cyclometallated complexes with a potential leishmanicidal activity on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Med. Chem. Res.**, v. 22, n. 3, p. 1049–1056, 2013.

FREZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, n. 3, p. 913-916, 2001.

FREZZA, M. et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Curr. Pharm. Des.**, v. 16, p. 1813-1825, 2010.

FRICKER, S. P. et al. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, n. 10, p. 1839–1845, 2008.

GANNAVARAM S, DEBRABANT A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 10, n. 2, p.95, Jul. 2012.

GAO, E. J.; et al. Study on the interaction of a palladium complex with DNA. **J. Struct. Chem.**, v. 49, n. 6, p. 1048-1054, 2008.

GENOIS, M. M. et al. DNA repair pathways in trypanosomatids: from DNA repair to drug resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 78, n. 1, p. 40–73, 2014.

GLOVER, L. E. D. HORN. "Trypanosomal histone gammaH2A and the DNA damage response." **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.1, p. 78-83, 2012.

GONZALES, I.J. et al. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p.161–172, 2007.

GONZALEZ, I. J. Metacaspases and their role in the life cycle of human protozoan parasites. **Biomedica**, v. 29, n. 3, p. 485-493, 2009.

GORBACHEVA, P. B.; et al. Molecular-biological questions in the creation of therapeutic agents and studies of their mechanisms of action. **Pharm. Chem. J.**, v. 42, n. 2, p. 53-55, 2008.

GORG, A.; WEISS, W. GÜNTHER, S. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. **Proteomics**, v.4, p.3665–3685, 2004.

GRANDIN, N. E CHARBONNEAU, M. "RPA provides checkpoint-independent cell cycle arrest and prevents recombination at uncapped telomeres of *Saccharomyces cerevisiae*." **DNA Repair (Amst)**, Mar v. 12, n.3, p.212-26, 2013.

GROENENDYK, J.; LYNCH, J.; MICHALAK, M. Calreticulin, Ca^{2+} , and calcineurin - signaling from the endoplasmic reticulum. **Mol. Cell**, v. 17, n. 3, p. 383–389, 2004.

GUIMARAES-CORREA A. B. et al. C7a, a biphosphinic cyclopalladated compound, efficiently controls the development of a patient-derived xenograft model of adult T cell leukemia/lymphoma. **Viruses** v. 3, n. 7, p.1041–1058, 2011.

GYGI, S.P. et al. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. **Mol. Cell Biol.**, v.19, p.1720–30, 1999.

HARDER, S. et al. Expression of a Mitochondrial Peroxiredoxin Prevents Programmed Cell Death in *Leishmania donovani* Expression of a Mitochondrial Peroxiredoxin Prevents Programmed Cell Death in *Leishmania donovani* †. **Eukaryotic Cell**, v. 5, n. 5, p. 861–870, 2006.

HARPER, J. W. e ELLEDGE, S. J. "The DNA damage response: ten years after." **Mol. Cell** v.28(5), p.739-745, 2007.

HEISKANEN, K.M. et al. Mitochondrial depolarisation accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. **J. Biol. Chem.**, v.274, p.5654– 5658, 1999.

HESS, M. L.; MANSON, N. H. Molecular oxygen: Friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 16, n. 11, p. 969–985, 1984.

HOARE, C.A. Early discoveries regarding the parasite of oriental sore. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. v. 32. n.1. p. 67-86. 1938.

HONG, K.M. et al. 3,3-Diindolylmethane (DIM) induces a G (1) cell cycle arrest in human breast cancer cells that is accompanied by Sp1-mediated activation of p21 (WAF1/CIP1) expression. **Carcinogen.**, v.23, p. 1297–1305, 2002.

HOSSEINI, M. J. et al. New Mechanistic approach of inorganic Palladium toxicity: Impairment in mitochondrial electron transfer. **Metallomics**, v. 8 n. 2, p.252-9 Feb., 2016.

HUANG, J. ET AL. "CCDC134 interacts with hADA2a and functions as a regulator of hADA2a in acetyltransferase activity, DNA damage-induced apoptosis and cell cycle arrest." **Histochem. Cell Biol.** v.138, n.1, p.41-55, 2012.

INOKI, S.; NAKANISHI, K.; NAKABAYASHI, T. Study of *leishmania-donovani* with special reference to the kinetoplast, mitochondria, and golgi zone by electron microscope employing thin section technique. **Biken. J.**, v.1, n. 2, p.194, 1958.

JERONIMO, S.M. et al. An emerging peri-urban pattern of infection with *Leishmania chagasi*, the protozoan causing visceral leishmaniasis in northeast Brazil. **Scand. J. Infect. Dis.**, v.36. n.6-7. p.443-449. 2004.

JHA, T. K. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 389-398, 2006.

JHA, T. K. et al. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

JOHNSON, T.M.; YU, Z.X.; FERRANS, V.J.; LOWENSTEIN, R.A.; FINKEL, T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA v.93, p.11848–11852,1996.

KASHANIAN, S.; et al. DNA binding studies of PdCl₂(LL) (LL = chelating diamine ligand: N,N'- dimethyltrimethylenediamine) complex. **Biochem. (Moscow)**, v. 73, n. 8, p. 929-936, 2008.

KEENE, F. R.; SMITH, J. A.; COLLINS, J. G. Metal complexes as structure selective binding agents for nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 253, p. 2021-2035, 2009.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nat. Rev. Cancer** v. 7, p. 573-584, 2007.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. **Toxicology**, n. 182, p. 471-474, 2002.

KERR, J. F. R. Neglected opportunities in apoptosisresearch. **Trends Cell Biol.**, n. 5, p. 55-57, 1995.

KHANDELWAL, K. et al. A patient presenting with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) as a first indicator of HIV infection in India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.85, n.1, p.64-65, 2011.

KOSMIDER, B. et al. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt (II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. **Mutat. Res.**, v. 563, p. 61-70; 2004.

KOWALTOWSKI, A. J. Participação da Mitocôndria na Regulação da Viabilidade Celular. [s.l: s.n.]. Livre docência. Departamento de Bioquímica, 2004.

KOWALTOWSKI, A. J. VERCESI, A. E. Reactive oxygen Regeneration by mitochondria. In: LEMASTER, J. J.; NIEMINEN, A. L. (Eds.). **Mitochon. Pathogen.**. New York: Plenum Publishing Corporation, p. 281–300, 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 495, n. 1–2, p. 12–15, 2001.

KUMARI, S. et al. Reactive Oxygen Species: A Key Constituent in Cancer Survival. **Biomark Insights**. v.13, p.1–9, 2017.

LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.

LE PAGE, F.; et al. Transcription-coupled repair of 8 oxoguanine requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. **Cell**. v. 101, n. 2, p. 159-71, 2000

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEE, N., GANNAVARAM, S., SELVAPANDIYAN, A., e DEBRABANT, A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. **Eukaryot. Cell.**, v.6, p.1745–1757, 2007.

LEISHMAN, W. On the possibility of the occurrence of Trypanosomiasis in India. **Br. Medical. J.**, v.1, n.2213, p.1252. 1903.

LIM, S. et al. Enhanced calreticulin expression promotes calcium-dependent apoptosis in postnatal cardiomyocytes. **Mol. Cell.**, v. 25, n. 3, p. 390–396, 2008.

LINARES, I.A.P., OLIVEIRA, K. T. de; PERUSSI, J. R. Chlorin derivatives sterically-prevented from self-aggregation with high antitumor activity for photodynamic therapy **Dyes and Pigments** n. 145 p. 518-527, 2017.

MALUMBRES, M. E BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm **Nature Rev. Cancer**, v. 9, n.3, p.153-166, 2009.

MARIA, S. S. Estudo citoquímico, imunocitoquímico e de análise de imagem de células fibroblásticas em proliferação e apoptose na ausência e presença de colágeno tipo I hiperpolimerizado. 1998. Tese (Doutorado em Biologia Celular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

MANSOURI-TORSHIZI, H.; I. et al. 2,2'-Bipyridinebutyldithiocarbamatoplatinum(II) and palladium(II) complexes: synthesis, characterization, cytotoxicity, and rich DNA-binding studies. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, p. 9616-9625, 2008.

MANSY, S.; et al. Heavy metal nucleotide interactions. 12. competitive reactions in systems of four nucleotides with cis- or trans diammineplatinum(II). Raman difference spectrophotometric determination of the relative nucleophilicity of guanosine, cytidine, adenosine, and uridine monophosphates as well as the analogous bases in DNA. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 100, p. 607-616, 1987.

MATESANZ, A. I. et al. Synthesis and characterization of novel palladium(II) complexes of bis(thiosemicarbazone). Structure, cytotoxic activity and DNA binding of Pd(II)-benzyl bis(thiosemicarbazone). **J. Inorg. Biochem.**, v. 76, p. 29-37, 1999.

MATSUO, A. L. et al. In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' disease. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 8, p. 3318-3325, 2010.

MATTIAZZI, M. The mtDNA T8993G (NARP) mutation results in an impairment of oxidative phosphorylation that can be improved by antioxidants. **Hum. Mol. Genet.**, v.13, p.869-879, 2004.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, n. 99, p. 157-168, 1998.

MCCONVILLE, M. J. et al. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 1, p. 122-154, 2002.

McGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v. 46, p. 153-185. 1995.

MEHTA, A. e SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **J. Biol. Chem.** v. 279, p.11798-1813, 2004.

MELO, P. S. et al. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev. Biol.-Animal**, n. 36, p. 539-543, 2000.

MENNA-BARRETO, R.F. et al. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 47, p. 644-653, 2009.

MESQUITA, J. T. Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências. 2013.

MICHAËLSSON, J. et al. A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. **J. Exp. Med.**, v.196, p.1403-1414, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - Brasil. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial, 2006. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs>. Acesso em: 20 set.. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/casos_conf_lta.pdf>. Acesso em: 15 set. 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2007. Disponível em:<http://www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf. >Acesso em: 20 set. 2018.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Curr. Med. Chem.**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MOLYNEUX, D. H.; KILLICK-KENDRICK, R. Morphology, ultrastructure and life cycles. In: PETERS, W; KILLICK-KENDRICK, R. (Ed.). The Leishmaniasis in Biology and Medicine. London: **Academic Press**. p. 1-119., 1987.

MUKHERJEE, S.B.; et al.. Increase in cytosolic Ca^{2+} levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **J. Biol. Chem.** v.277, p.24717–24727, 2002.

MUNIARAJ, M. The lost hope of elimination of Kala-azar (visceral leishmaniasis) by 2010 and cyclic occurrence of its outbreak in India, blame falls on vector control practices or co-infection with human immunodeficiency virus or therapeutic modalities? **Trop. Parasitol.**, v. 4, n. 1, p. 10-19, 2014.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in Leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

MURRAY, H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **J. Exp. Med.**, v.15, p.53:1302, 1981.

NAVARRO, M. et al. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: Recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 23–24, p. 1070–1078, 2010.

NELSON, D. L., COX, M. M. Lehninger Princípios de Bioquímica. São Paulo: Editora Sarvier, p. 1304, 2005.

NEUMANN, A.; BAGINSKI, M.; CZUB, J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, n. 51, p. 18266-18272, 2010.

NEVES, A. P. et al. Exploring the DNA binding/cleavage, cellular accumulation and topoisomerase inhibition of 2-hydroxy-3-(aminomethyl)-1,4-naphthoquinone Mannich bases and their platinum(II) complexes. **J. Inorg. Biochem.**, v. 119, p. 54–64, 2013.

NEVES, A. P.; VARGAS, M. D. Platinum(II) Complexes in Cancer Therapy. **Ver. Virt. Quím.**, v. 3, n. 3, p. 196–209, 2011.

NICODEMO, E. L. et al. Visceral leishmaniasis in AIDS patient. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 32, n. 4, p. 310-311, 1990.

NYARKO, E. at al. Toxic effects of mercury(II), cadmium(II) and lead(II) porphyrins on *Trypanosoma brucei brucei* growth. **Chem. Biol. Interact.**, v.39, n.2, p.177-85, 2002.

OLIVEIRA, A.R. Estudo computacional da interação de compostos naftoquinônicos e a enzima. Rio de Janeiro, 163 f. Tese (Doutorado em Biologia Computacional e Sistemas) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ, 2012.

ORMEROD, M.G., *Investigating the relationship between the cell cycle and apoptosis using flow cytometry*. **J. Immunol. Methods**, v. 265, n.1-2, p. 73-80, 2002.

OTERO, L. et al. Novel antitrypanosomal agents based on palladium itrofurylthiosemicarbazone complexes: DNA and redox metabolism as potential therapeutic targets. **J. Med. Chem.**, v. 49, n. 11, p. 3322–3331, 1 jun. 2006.

PALADI, C. D. S. et al. In Vitro and In Vivo Activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 5, p. e1626, 2012.

PARIS, C. et al. Miltefosine induces apoptosis- like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 3, p. 852-859, 2004.

PASSALACQUA, T. G. Efeito de compostos ciclopaladados em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* [s.l.] Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Tese (doutorado) Araraquara, 2018.

PETER, W. The treatment of kala-azar: new approach to an old problem. **Ind. J. Med. Res.**, Suppl. v. 73, p. 1–18, 1981.

PINTADO, V.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. HIV-associated visceral leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 7, n. 6, p. 291-300, 2001.

PRADA, C. F. et al. Gimatecan and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, n. 10, p. 1433–1440, 2013.

RAHMAN, K.W.; SARKAR, F.H. Inhibition of nuclear translocation of nuclear factor- $\{\kappa\}$ B contributes to 3,3-diindolylmethane-induced apoptosis in breast cancer cells. **Cancer Res.**, v.65, p.364 –371, 2005.

RAINA P, KAUR S. Knockdown of LdMC1 and Hsp70 by antisense oligonucleotides causes cell-cycle defects and programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Mol. Cell Biochem.**, v. 359, p.135–149, 2012.

RAKOTOMANGA, M. et al. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 4, p. 1425-1430, 2007.

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

RAO, X. et al. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostat. Bioinform. Biomath**, v. 3, n. 3, p. 71-85, 2013.

RATH, S.T.L.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. nova.**, v.26, n.550, p.3, 2003.

REDON, C. E. et al. γ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.7, p. 743–756, 2012.

REY, L. Bases da Parasitologia Médica. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

REY, L. Bases de Parasitologia Médica. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 856 p. 2001.

RIOU, G. F. et al. A type I DNA topoisomerase from *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.**, v. 134, n. 3, p. 479–484, 1983.

RODRIGUES, J.C. et al. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. **Protist** v.158 p.447–456, 2007.

ROGERS, M.E. et al. Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of FPPG. **Nature.**, v.22, n. 430, p. 463-7, 2004.

RONCONI, L.; SADLER, P. J. Using coordination chemistry to design new medicines. **Coordin. Chem. Rev.** v. 251, p. 1633-1648, 2007.

ROSEMBERG, B. et al. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. **Nature**, v. 222, p. 385-386, 1969.

ROSS, R. Further Notes on *Leishmania's* bodies. **Br. Med. J.**, v.11, n.1401, 1903.

ROY, A. et al. Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species-Mediated Programmed Cell Death Induced by 3,3. Diindolylmethane through Inhibition of F0F1-ATP Synthase in Unicellular Protozoan Parasite *Leishmania donovani*. **Mol. Pharmacol.**, v.74, p.1292–1307, 2008.

RUIZ, J.; et al. New palladium(II) and platinum(II) complexes with 9-aminoacridine: structures, luminiscence, theoretical calculations, and antitumor activity. **Inorg. Chem.**, v. 47, p. 6990-7001, 2008.

SADOK MENNA-BARRETO, R.F.; DECASTRO, S.L . The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed. Res. Internat.**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

SÁNCHEZ-DELGADO, R. A.; ANZELLOTTI, A. Metal Complexes as Chemotherapeutic Agents Against Tropical Diseases: Trypanosomiasis, Malaria and Leishmaniasis. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 4, p. 23–30, 2004.

SANTA-RITA, R.M. et al. Antiproliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, p.780–784, 2005.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J. Infect. Dev. Ctries.** v. 9, n. 6, p. 588-596, 2015.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr. Biol.**, v. 24, p. 453-462, 2014.

SCHWARTZ E, HATZ C, BLUM J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers **Lancet Infect Dis.** v.6, n.6, p.342-349. 2006.

SCORRANO, L. et al. BAX and BAK Regulation of Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} : A Control Point for Apoptosis. **Sci. (New York, N.Y.)**, v. 300, n. 5616, p. 135–139, 2003.

SEN, N. et al. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. **Cell Death Differ.**, v. 11, n. 8, p. 924–936, ago. 2004a.

SEN, N. et al. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n. 50, p. 52366–52375, 10 dez. 2004b.

SERRANO, F. A. et al. A cyclopalladated complex interacts with mitochondrial membrane thiol-groups and induces the apoptotic intrinsic pathway in murine and cisplatin-resistant human tumor cells. **BMC cancer**, v. 11, n. 296, p. 1–16, 14 jul. 2011.

- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J. Medical. Res.**, v. 123, n. 3, p. 233–244, 2006.
- SHAW, J. New world leishmaniasis: the ecology of Leishmaniasis and the diversity of Leishmanial species in Central and South America. In: FARREL J.P, editor. *Leishmania*. Penssylvania: Kluwer Academic Publishers. p. 193., 2002.
- SIES, H. BERNDT, C., JONES, D.P. Oxidative Stress. **Annu Rev Biochem.** v.20, n.86, p.715-748, 2017.
- SILVEIRA, M. M. X. Estudo de um derivado de Aminoquinolina: Citotoxicidade em macrófagos, potencial efeito em *Leishmania Amazonensis* e Mitocôndria. Monografia apresentada ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito para conclusão do curso de Farmácia, 2016.
- SILVERMAN, J.M. et al. Proteomic analysis of the secretome of *Leishmania donovani*. **Genome Biol.**, v.9, n.2, 2008.
- SIMPSON, R. J. **Proteins and proteomics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, **Genetics Research**. v.81, n.3, p.243-244, 2002.
- SINGH, O. V.; NAGARAJ, N. S. Transcriptomics, proteomics and interactomics unique approaches to track the insights of bioremediation. **Brief. Func. Genomic Proteomic.**, v. 4, n. 4, p. 355-362, 2007.
- SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **J. Infect Chemother.**, v. 10, n. 6, p. 307-315, 2004.
- SOSA, N.; et al. Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, n. 3, p. 557-563, 2013.
- SOTO, J. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infect. Dis.**, v.1 n.33 p.57-61. 2001.
- STOPPANI, A.O.M. et al. Effect of inhibitors of electron-transport and oxidative-phosphorylation on *trypanosoma-cruzi* respiration and growth. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v.2, n.1, p. 3-21, 1980.
- SUNDAR, S. et al. Short- course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, n. 2, p. 200-204, 2000.
- SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis – current therapeutic modalities. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, n. 3, p. 345-352, 2006.
- SUNDAR, S.; et al. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 8, p. 1000-1006, 2008.

- SUNDAR, S.; SINGH, A.; SINGH, O. P. Strategies to overcome antileishmanial drugs unresponsiveness. **J. Trop. Med.**, v. 2014, p. 646932, 2014.
- TAGLIARINO, C. Calcium Is a Key Signaling Molecule in beta -Lapachone-mediated Cell Death. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 22, p. 19150–19159, 25 maio 2001.
- TETTAMANTI, G. et al. Oligomycin A and the IPLB-LdFB insect cell line: actin and mitochondrial responses. **Cell Biol. Int.**, v.32, p.287–292, 2008.
- TOVAR, J. et al. Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA locus. **Mol. Microbiol.**, v.29, p. 653-660, 1998.
- TU, B. P.; WEISSMAN, J. S. Oxidative protein folding in eukaryotes: Mechanisms and consequences. **J. Cell Biol.**, v. 164, n. 3, p. 341–346, 2004.
- VALENCIANO, A. L.; RAMSEY, A. C. E MACKEY, Z. B. Deviating the level of proliferating cell nuclear antigen in *Trypanosoma brucei* elicits distinct mechanisms for inhibiting proliferation and cell cycle progression. **Cell Cycle.**, v. 4, p. 674–688, 2015.
- VELÁSQUEZ, A.M. A. Do screening ao mecanismo de ação, uma contribuição para a descoberta de ciclopalladados bioativos: a atividade leishmanicida de **CP2** e seu efeito inibitório frente à DNA topoisomerase 1B de *Leishmania* [s.l.] Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Tese (doutorado) Araraquara, 2017.
- VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.
- VELÁSQUEZ, A. M. A. et al. Synthesis and tripanocidal activity of ferrocenyl and benzyl diamines against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Med. Chem. Lett.**, v. 24, n. 7, p. 1707–1710, 1 abr. 2014.
- VELÁSQUEZ, A.M.A. et al. Efficacy of a Binuclear Cyclopalladated Compound Therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis* and its inhibitory effect on Topoisomerase 1B. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, p. AAC.00688-17, 2017.
- VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010-3015, 2004.
- VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, n. 36, p. 165-175, 2003.
- VIANNA, O, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania* (Nota Preliminar). **Bras Med.**, v.25, p.411, 1912.

WANG, Q. E. et al. "p38 MAPK- and Akt-mediated p300 phosphorylation regulates its degradation to facilitate nucleotide excision repair." **Nucleic Acids Res.**, v. 2, p 80-90, 2012.

WELBURN, S.C., MAUDLIN, I., ELLIS, D.S. Rate of trypanosome killing by lectins in midguts of different species and strains of Glossina. **Med. Vet. Entomol.**, v.3, p.77-82, 1989.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. **Cancer Lett.**, v. 93, p. 113-120, 1995.

WORLD HEALTH ORGANISATION, WHO. Leishmaniasis: Fact sheet N°375. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 11 agosto de 2018.

WRIGHT, J.H. Protozoa in a case of tropical ulcer ("Delhi sore"). **J. Med. Res.** v.10, n.3, p.472-82, 1903.

WU, X.; YALOWICH, J. C.; HASINOFF, B. B. Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. **J. Inorg. Biochem.**, v. 105, n. 6, p. 833–838, 2011.

WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. K.; CURRIE, A. R. Cell Death: the significance of apoptosis. **Int. Rev. Cytol.**, n. 68, p. 251-305, 1980.

YOUSEFZADEH, M. J. e WOOD, R. D. "DNA polymerase POLQ and cellular defense against DNA damage." **DNA Repair (Amst)**., v.12, n.1, p.1-9, 2013.

ZINSSTAG, J. et al. In vitro activity of organometallic complexes of Ir, Pt and Rh on *Trypanosoma b. gambiense*, *T. b. rhodesiense* and *T. b. brucei*. **Trop. Med. Parasitol.** v. 42, n. 1, p. 41–44, mar. 1991.

ZUCCA, M. et al. New chemotherapeutic strategies against Malaria, Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 502-526, 2013.