

**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:

Carla Fontana

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

J. Aristeu da Rosa

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

Adelino Netto

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

Angela Maria Arenas Velasquez

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

Pio Colepicolo Neto

Prof. Dr. PIO COLEPICULO 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 ciclopaladados. 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 (hTopoI) 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
DNATopo1B	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
hTopo1	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).

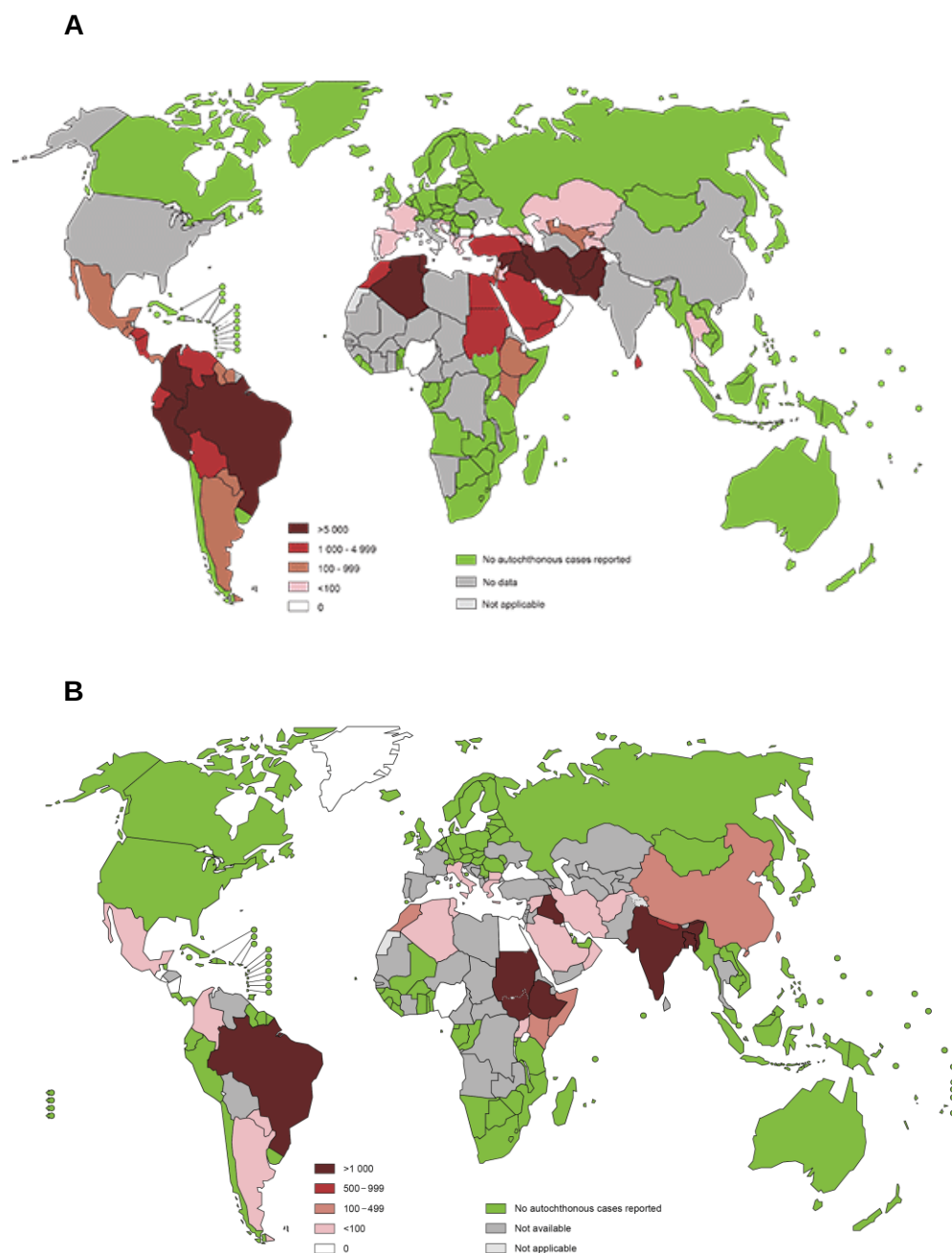
No Brasil, novos casos foram descritos não apenas em zonas rurais, mas também em regiões peri-urbanas e urbanas (CAMARGO-NEVES et al., 2002; JERONIMO et al., 2004; SAVOIA, 2015). Esses parasitos infectam uma grande variedade de hospedeiros mamíferos silvestres e domésticos, considerados como reservatórios 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.

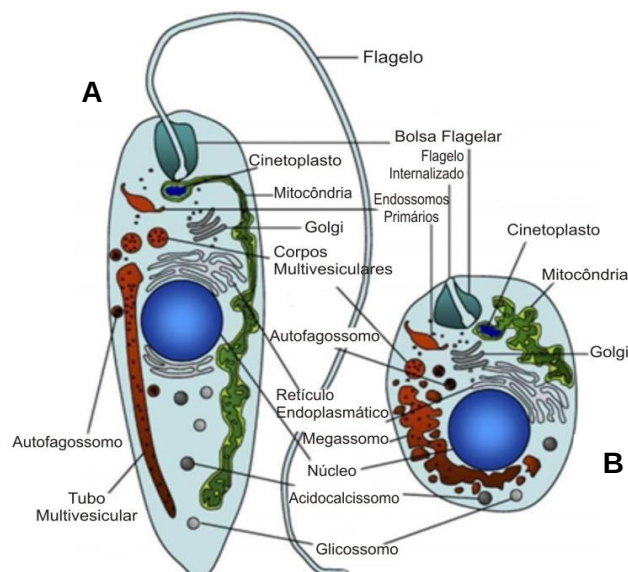


Fonte: Disponível em: <WHO (<http://www.who.int/en/>)>. Acesso em: 05-11-2018.

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).

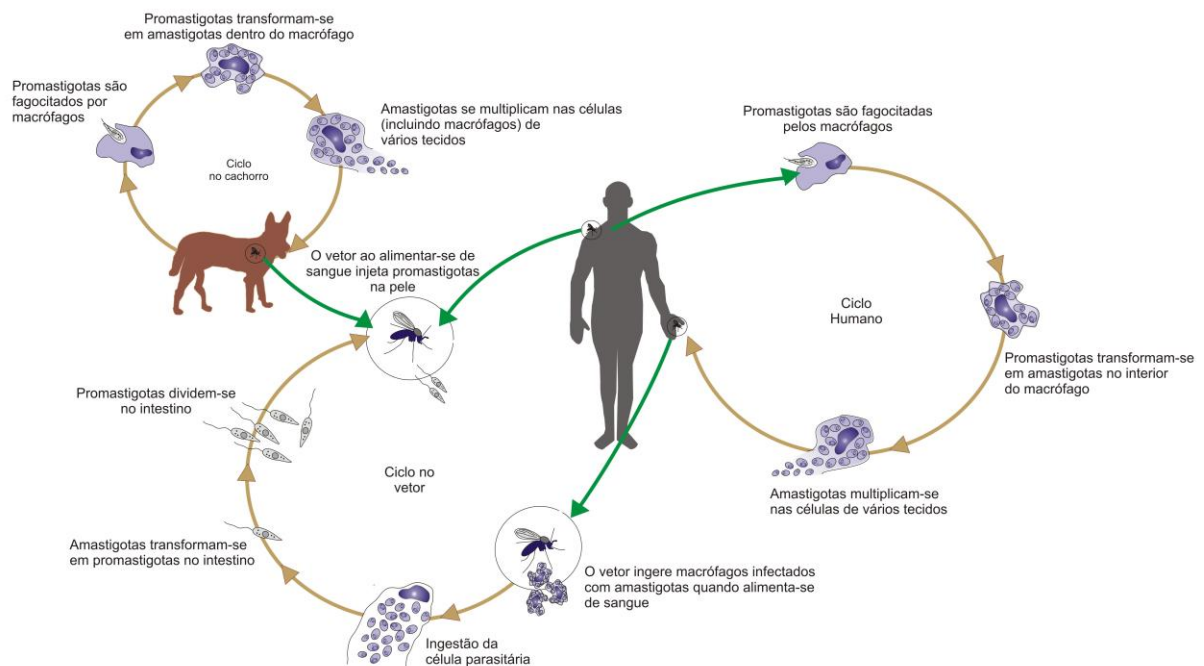
Figura 2. Formas evolutivas durante o ciclo de vida da *Leishmania* spp. Em (A) está representada a forma promastigota de *Leishmania* spp. Em (B) está representada a forma amastigota de *Leishmania* spp.



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).

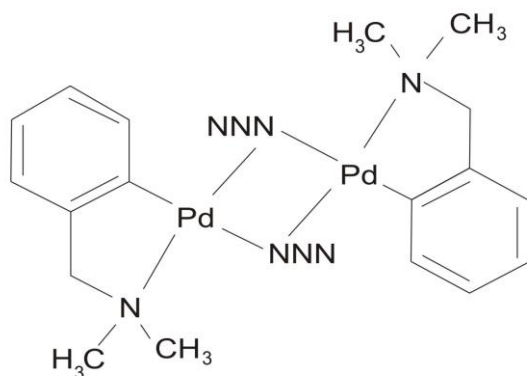
Estudos conduzidos por Gorbacheva, et al., (2008); Kashanian, et al. , (2008) e Matesanz, et al. (1999) indicaram que os complexos de paládio (II), assim como os de platina, interagem com o DNA. Ao estudarem a interação do complexo $[PdCl_2(bipy)+(bipy=2,2'bipiridina)]$ com o DNA, Gao et al., (2008) 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).

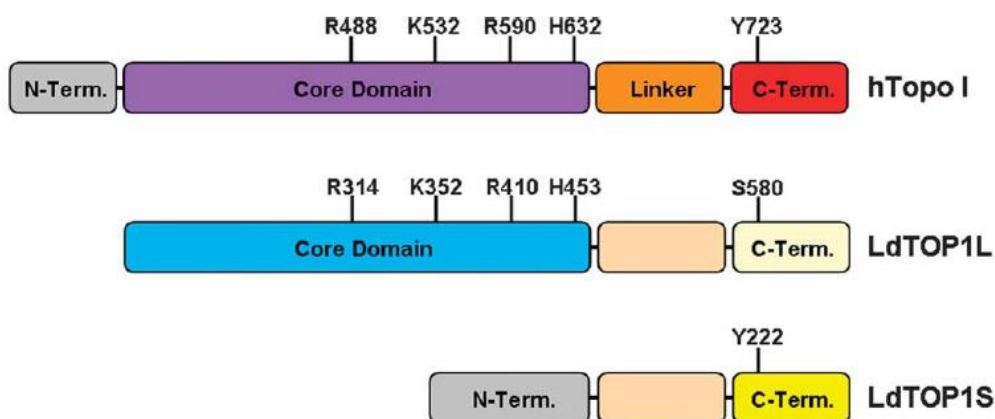
1.4 DNAs topoisomerases como alvos terapêuticos

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. Ensaio 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 (tripanotiona redutase e triparedoxina 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, tripanotiona 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, tripanotiona 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.

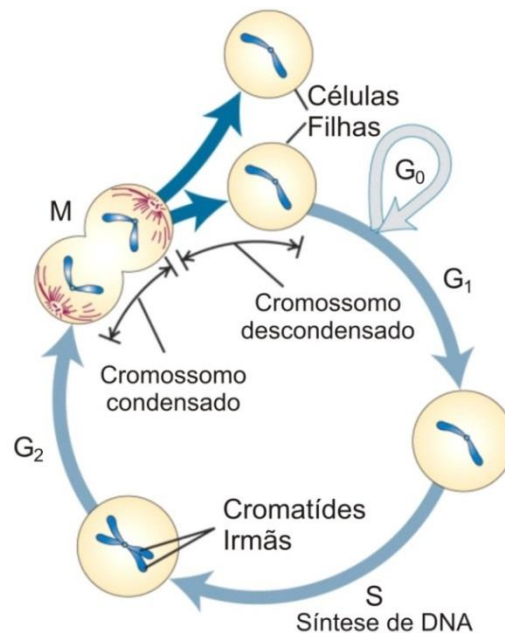
1.6 O ciclo celular como regulador da sobrevivência da *Leishmania* spp.

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.

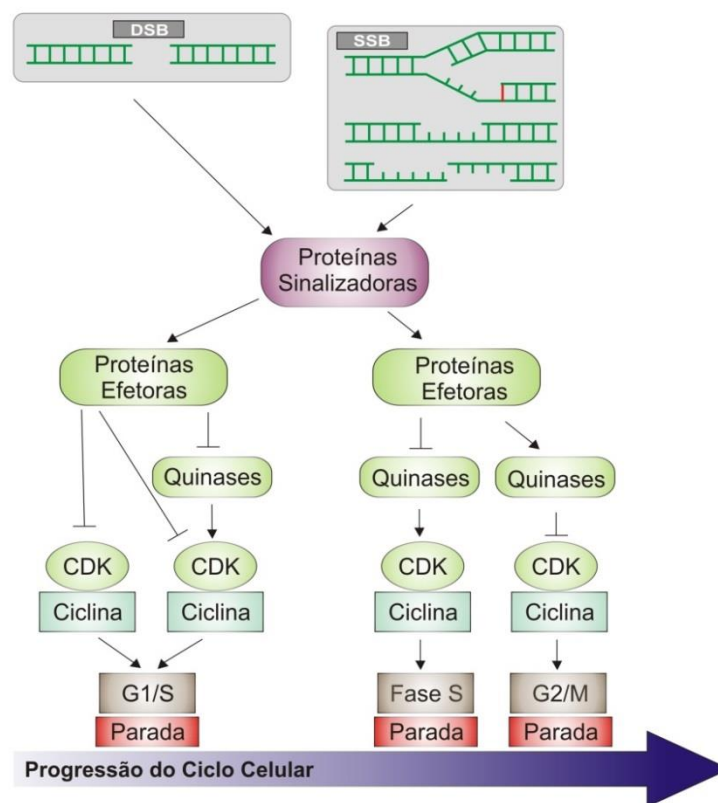


Fonte: Adaptado de: Apostila divisão celular – USP. Disponível em: <<https://www.slideshare.net/guellitymarcel/apostila-diviso-celular-usp>>. Acesso em 06-11-2018.

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.



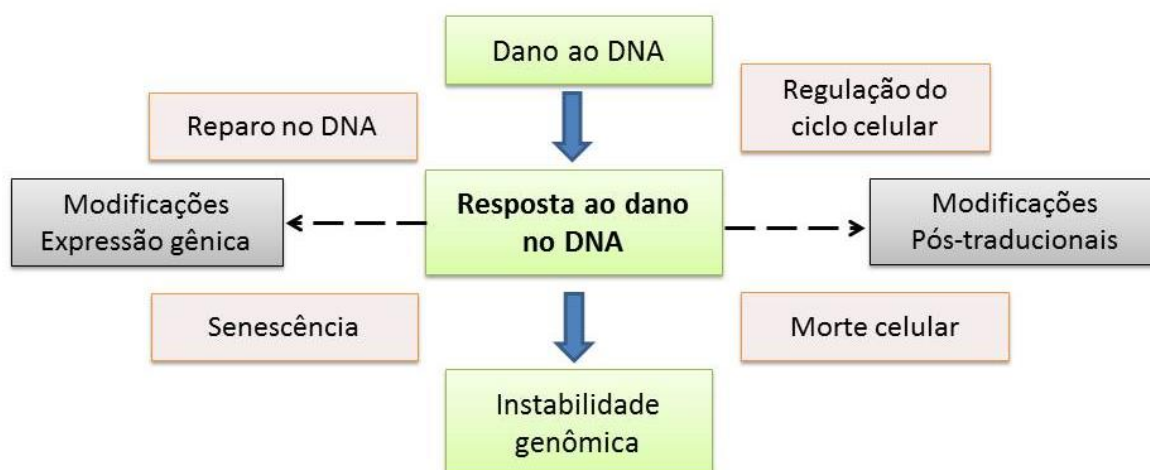
Fonte: Adaptada de Curtin, (2012) *apud* Damasceno, et al., 2016.

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).

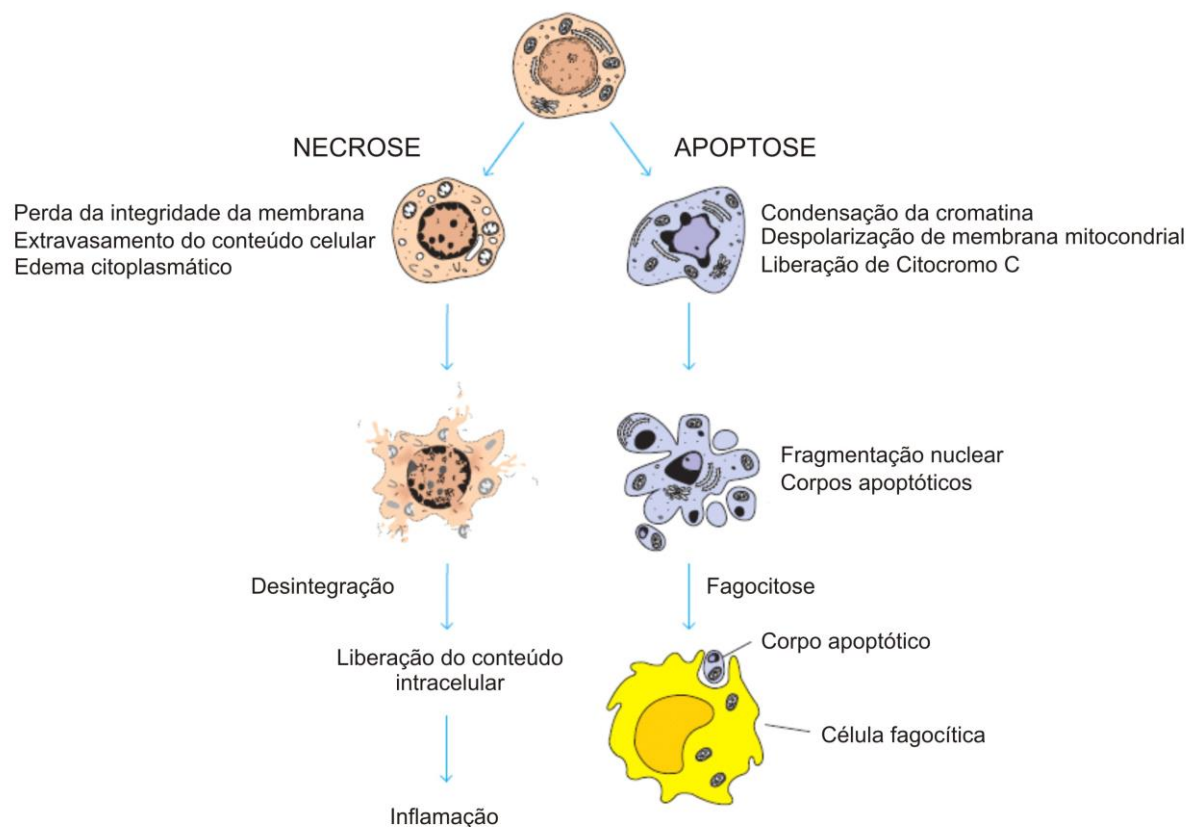
O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas com a programação normal de morte celular e certos processos patológicos *in vivo* inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação 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.

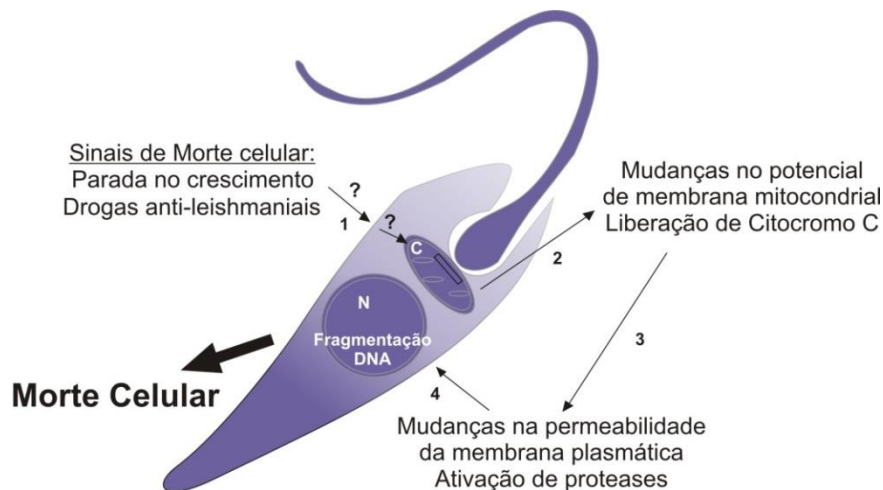


Fonte: Adaptado de Freeman, et al., (2007).

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)

Objetivos

Objetivos

Avaliação dos efeitos relacionados à inibição da DNA TopoIB de *Leishmania amazonensis* na presença de **CP2**.

Objetivos específicos

- A.** Analisar por qPCR os níveis de expressão dos mRNA dos genes que codificam para as proteínas que se apresentaram diferencialmente expressas após o tratamento com **CP2** em *L. (L.) amazonensis*.
- B.** Avaliar a progressão de *L. (L.) amazonensis* pelas fases do ciclo celular após exposição ao **CP2** através da análise do conteúdo de DNA em citometria de fluxo.
- C.** Analisar os níveis da histona γ H2A como marcador de quebras de duplas fitas de DNA (DSB, Double Strand Break) após tratamento com o ciclopaladado **CP2**.
- D.** Determinar se **CP2** interfere no potencial da membrana mitocondrial de *L. (L.) amazonensis*.
- E.** Avaliar se há liberação de ROS ou ativação de vias de morte celular como consequência dos eventos pós-inibição da DNA TopoIB nas células de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com **CP2**.

Material e Métodos

3. Avaliação dos efeitos relacionados à inibição da DNA Topo1B de *L. amazonensis* na presença de CP2

3.1 Linhagens de *Leishmania*

- Cepa MPRO/BR/1972/M1841-LV-79 de *L. (L.) amazonensis*
- Cepa MHOM/IR/84/LT252 de *L. (L.) major*

3.2 Meios de cultura

- **Meio LIT:** *Liver Infusion Tryptose* (FERNANDES; CASTELLANI, 1966) pH 7,2; 68,4 mM de NaCl (Merck); 5,4 mM de KCl (Merck); 56,3 mM de Na₂HPO₄ (Merck); 111 mM de Dextrose (Mallinckrodt); 0,3% de meio *Liver Infusion Broth* (Difco); 0,5% de Tryptose (Fluka); 25 mg/L de Haemin (ICN); 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab).
- **Meio 199:** 1x (Sigma-Aldrich), suplementado com HEPES 0,04 M; adenina 0,1 mM; biotina 50,0 µg/ml; hemina 250,0 µg/mL e soro fetal bovino 10,0%.

3.3 Análise da expressão gênica de *L. (L.) amazonensis* após exposição ao CP2.

Experimentos de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizados a fim de verificar a expressão em nível transcricional dos genes tripanotiona peroxidase, calreticulina, GRP78, citocromo C, citocromo C oxidase e HSP10K encontrados diferencialmente expressos nas análises proteômicas (VELÁSQUEZ, 2017). A expressão gênica foi analisada em triplicata biológica e quintuplicata técnica em células de *L. (L.) amazonensis* na presença de **CP2** por 72 horas, comparativamente às células-controle (não expostas ao **CP2**).

3.3.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

A extração de RNA total foi realizada utilizando o kit *Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research®), de acordo com as instruções do fabricante. Uma cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na foi crecida à 28°C até atingir uma concentração de $\sim 5 \times 10^6$ parasitos/mL, fase estacionária de crescimento, e então estas células foram tratadas com **CP2** a 13,2 µM (valor referente ao IC₅₀) por 72h de acordo com estudos prévios realizados por Velasquez, et al., (2017).

Após este período, as células foram centrifugadas a 10.000 x g, 5 min a 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo igual volume de etanol (100%), esta mistura foi agitada rapidamente para homogeneização e transferida para a coluna contida no kit. Em seguida a coluna acoplada ao tubo do kit foi novamente centrifugada

a 10.000 x g, 2 min a 4°C e o sobrenadante descartado. Em seguida, as amostras de RNA (10 µg) foram tratadas com DNase RQ1 RNase-Free (Promega®) por 15min. Posteriormente, a coluna foi lavada com o RNA PreWash, proveniente com o kit. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 x g, 10 min a 4°C e o RNA foi eluído com água DNase e RNase free em novo tubo. A quantificação do RNA foi realizada em *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e o RNA foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

Após a extração de RNA, foi realizada a síntese do cDNA utilizando o kit *3'Race System for rapid amplification of cDNA ends* (Invitrogen®) e oligo dT de acordo as recomendações do fabricante. Para a síntese do DNA complementar foram utilizados 5 µg do RNA total e a enzima *SuperScript II RT*. Em seguida, o cDNA das amostras foi tratado com *RNase H*, quantificado em nanodrop e armazenado a -20°C.

A quantificação do cDNA foi realizada em *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo Scientific) e armazenado a -80°C. Para a reação de PCR em Tempo Real, o cDNA das amostras de interesse foi diluído para uma concentração de 10 ng/µl, adicionando-se água livre de RNase (DPC).

3.3.2 PCR quantitativo (qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR em tempo real (qPCR) por meio do sistema *StepOnePlus Real-Time PCR* (Applied Biosystems®) utilizando como fluoróforo o SYBR® Green. Para a quantificação da expressão gênica dos genes-alvo (triptanotona peroxidase, calreticulina, GRP78, citocromo C, citocromo C oxidase e HSP10K) e do gene de referência selecionado (kDNA), utilizou-se o método de $\Delta\Delta Ct$. Este método baseia-se na reação exponencial da PCR, sendo assim, a expressão é dada por $QR=2^{\Delta\Delta Ct}$, onde QR representa o nível de expressão gênica; Ct representa o ciclo de amplificação em que cada amostra apresenta amplificação exponencial; ΔCt se refere à diferença entre o Ct da amostra amplificada para o gene alvo e o Ct da mesma amostra amplificada para o gene referência e $\Delta\Delta Ct$ representa a diferença entre o ΔCt da amostra de interesse e o ΔCt da amostra de referência utilizada (RAO, 2013).

Para a determinação do gene de referência mais adequado para as análises, realizou-se uma curva de eficiência utilizando os genes de referência 18S, kDNA, α -tubulina, actina e GAPDH. O gene selecionado para ser utilizado como gene de referência foi o gene que apresentou uma curva de *melting* de pico único, *slope* de -3,3,

eficiência entre 90 e 110%, R^2 de 0,99 e não apresentou amplificação inespecífica. Adotou-se um *Threshold* padrão para todos os genes analisados de 2,2.

Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo foram desenhados com auxílio do programa ApE®, e as sequências desenhadas foram analisadas quanto à formação de *hairpin*, *loops* e dímeros e avaliadas em relação à temperatura de *melting* (T_m) utilizando o site IDT (<https://www.idtdna.com/>) e o programa Gene Runner®. Para o desenho das sequências foram estabelecidos os seguintes parâmetros: tamanho do oligonucleotídeo entre 17 e 28 pb; T_m de 60°C; quantidade de GC: de 50% e tamanho médio dos *amplicons* 100 e 110 pb. Os oligonucleotídeos aprovados e enviados para síntese foram aqueles que não apresentaram formação de *hairpin*, *loops*, dímeros em uma T_m pré-estabelecida (entre 20-70°C). Os oligonucleotídeos específicos para os genes analisados estão apresentados na tabela 1.

Foram realizadas 3 réplicas biológicas para os experimentos e para cada experimento foram analisadas, no mínimo, 3 réplicas experimentais. Os dados foram analisados com o *software StepOne v3.2* (Applied Biosystems®). A reação foi realizada com 1µL de cDNA extraído de cada amostra (10ng), 5µL de SYBR Green, 2µL de primer *forward* e 2µL de primer *reverse* (1µM). Após o fim da reação, obteve-se a representação gráfica (*Amp Plot*) e numérica (C_t , *base line*) do aumento da fluorescência ocorrido durante os ciclos da reação.

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 *L. (L.) amazonensis* ao CP2.

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência
kDNA	F: CCTATTTTACACCAACCCCCAGT R: GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA	Velásquez, (2017).
Triparedoxina peroxidase (Tpri)	F: GAGATTGCTCGTGACTATGG R: AGGTCATTGATCGTTGCG	Autor, 2018.
Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78)	F: AGATCGAGGTTGCCTTTG R: GCCCTTGTCGTTAGTGAT	Autor, 2018.
Calreticulina	F: GCGCCAAACAATACGTACCA R: AACGACCCTTCCTGGATGTG	Velásquez, (2017).
10 kDa Heat-Shock Protein (HSP10)	F: AGCTACAGCCGCTGGG R: GCCCTCGTTGACCTTGGC	Autor, 2018.
Citocromo C oxidase subunidade IV	F: GACGCCGAGAAGGTTGAGAA CTGCACATGCTCCTCATCGA	Autor, 2018.
Citocromo C	F: GCTGGACGTGTACCTGGAGAA R: CGGCAAACGACATCTTCG	Autor, 2018.

3.4 Análises do Ciclo Celular

As células de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* foram cultivadas em meio LIT e

199 a 28°C, respectivamente. A linhagem selvagem de *L. (L.) major* foi utilizada como controle experimental, uma vez que as células de *L. (L.) major* progridem naturalmente pelas fases do ciclo celular (DAMASCENO, et al., 2016).

As células em crescimento exponencial (3×10^6 cel/mL) foram incubadas com 5 mM de hidroxiiureia (HU) durante 8 h e, em seguida, estas células foram transferidas para tubos de 50 mL e estes tubos foram centrifugados à 1.400 g por 5 min (para retirar a HU), então, adicionou-se, 20 mL de meio sem HU suplementado, com: 0,03% de DMSO (Dimetilsulfóxido); 20 µM de NAC (N-Acetil-L-cisteína, Sigma); 53,2 µM ($4 \times IC_{50}$) de **CP2** ou 133 µM ($10 \times IC_{50}$) de **CP2**; 20 µM de NAC+53,2/133µM ($4 \times IC_{50}/10 \times IC_{50}$) de **CP2** e 10 µM de CPT (Camptotecina, Sigma), os tubos foram homogeneizados e transferidos para garrafas de cultura. As garrafas voltaram para a BOD (28°C) e as células foram coletadas após 2, 4, 6 e 8 h de tratamentos, lavadas com PBS 1x, centrifugadas à 1.400 g por 5 min e fixadas em 30% PBS/ 70% metanol *overnight* a 4°C.

Após este período, as células fixadas foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas à 1.400 g por 5 min, o sobrenadante foi retirado com cuidado para não perder o *pellet* de células e ressuspensão em uma mistura de iodeto de propídio (10 µg/mL) em PBS 1x e RNase A (10 µg/mL). Os tubos permanecerem sob o abrigo da luz a 37°C durante 30 min. Posteriormente, as células contidas nos microtubos foram filtradas, com muito cuidado, em um filtro *Merk milipore LTDA*, para um novo microtubo e levadas, sob o abrigo da luz, para a análise em citômetro de fluxo.

Os dados de citometria de fluxo foram coletados usando o citômetro de fluxo BD FACSCanto1. Um total de 50.000 eventos foram analisados. Os dados foram analisados usando o software FlowJo. Essas análises foram realizadas no laboratório de Biologia molecular de *Leishmania* do Prof. Dr. Luiz Tosi, na USP de Ribeirão Preto.

3.5 Expressão da histona γ H2A

3.5.1 Separação das proteínas por SDS-PAGE e análise por Western blotting

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, foram cultivadas em meio LIT e M199 a 28°C, respectivamente. Após atingirem 3×10^6 cel/mL, as células foram lavadas com PBS 1x, centrifugadas à 1.400 g por 5 min. e incubadas por 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 10 h em meio suplementado com: HU (controle positivo) e **CP2** a 53,2µM ($4 \times IC_{50}$). Essas células foram coletadas por centrifugação à 1.400 g por 5 min., ressuspensas em PBS 1x, e centrifugadas novamente à 1.400 g por 5 min.

As proteínas foram resolvidas em SDS-PAGE, utilizando-se tampão de corrida Tris-glicina (Tris-base 25 mmol L⁻¹; glicina 192 mmol L⁻¹; SDS 0,1% (m/v)), transferidas para membrana de PVDF em tampão de transferência (Tris 24 mM; glicina 192 mM; Metanol 20% (v/v)) durante 2,5 h, com uma corrente elétrica de 50 mA.

A membrana foi, então, bloqueada com PBS 1x contendo Tween 20 0,1% (v/v) (PBS-T) e leite em pó desnatado 5% (m/v) durante 16 h a 4°C. Em seguida, a membrana foi brevemente lavada com PBS-T duas vezes, durante 5 min. à temperatura ambiente e incubada com o anticorpo primário, γ H2A de *T. brucei* produzido em coelho (DAMASCENO et al., 2016) e eif1 α (controle de carregamento) de camundongo (Roche). Essa incubação foi realizada por três horas, em temperatura ambiente, com agitação, em PBS-T contendo leite em pó desnatado 3% (m/v). Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi sequencialmente lavada durante 5, 10 e 15 min. em PBS-T. Em seguida, a membrana incubada durante 1h em temperatura ambiente com PBS-T contendo leite em pó desnatado 3% (m/v) e anticorpo secundário anti-Rabbit e anti-mouse conjugado com peroxidase. Após incubação com anticorpo secundário, a membrana foi lavada durante 5, 10 e 15 min, em PBS-T.

Bandas foram detectadas com *AmershamTM ECLTM Prime Western Blotting Detection Reagent* e visualizadas em *Amersham HyperfilmTM ECL (GE Life Sciences)*. A quantificação das bandas foi realizada usando o *software ImageJ*. Essas análises foram realizadas no laboratório de Biologia molecular de *Leishmania* do Prof. Dr. Luiz Tosi, na USP de Ribeirão Preto.

3.6 Determinação do potencial Transmembrânico da Mitocôndria ($\Delta\psi_m$)

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase mid log (1x10⁷ cél/mL) cultivadas em meio LIT foram incubadas durante 1, 4 e 24 h na presença ou ausência de **CP2** (13,3 μ M, 26,6 μ M ou 53,2 μ M, correspondente aos valores de IC₅₀, 2xIC₅₀ e 4xIC₅₀). O controle positivo foi obtido pela adição **FCCP** (20 μ M) (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazine) 10min antes da adição de rodamina 123 (Rho123, Sigma), as células foram incubadas com 10 μ g/mL de Rho123 por 20 min. As amostras foram mantidas em banho de gelo e ao abrigo da luz até o momento da análise. Os ensaios foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais, de acordo com a metodologia previamente descrita por (FONSECA-SILVA et al., 2011).

Os dados foram coletados e analisados em citômetro de fluxo *FACSCalibur flow cytometer* (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) com o *Cell Quest software* (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Um total de 10.000 eventos foram

analisados. As alterações na fluorescência para Rho123 foram quantificadas utilizando um índice de variação ($\Delta\Psi_m$) obtido pela seguinte equação: $\Delta\Psi_m = (MT - MC)/MC$, onde MT é a mediana de fluorescência dos parasitos tratados e MC é a mediana dos parasitos não tratados. Valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011).

3.7 Medida do acúmulo de ROS intracelular

Os níveis intracelulares de ROS foram medidos na *L. (L.) amazonensis* na presença ou ausência de **CP2**, baseados na metodologia de (FONSECA-SILVA et al., 2011). Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na fase *mid log* (1×10^7 cél/mL) cultivadas em meio LIT suplementado com 10% SFB foram tratadas durante três horas com **CP2** (13,3 μ M, correspondente ao valor de IC_{50}). Em seguida, as células foram centrifugadas, à 2.000 g por 5 min. 4°C, lavadas, centrifugadas novamente à 2.000 g por 5 min. 4°C e ressuspensas em meio HBSS 1x (*Hank's Balanced Salts*, Sigma).

Após, as células foram incubadas com 20 mM de H_2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Sigma) por 30 min. ao abrigo da luz. Então, 200 μ L de células foram adicionadas à placas escuras de 96 poços de fundo claro para a medida da fluorescência. A fluorescência foi mensurada espectrofluorimetricamente a 530 nm de emissão, com excitação a 480nm em leitor de placa *Infinite 200 pro* (TECAN) durante 90 min. Após a leitura, a fluorescência basal foi subtraída.

3.8 Detecção de morte celular por brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA) coloração.

As células de *L. (L.) amazonensis* na fase *mid log* (1×10^7 cél/mL) foram incubadas com diferentes agentes, 13,3 μ M (IC_{50}) de **CP2**; 20 μ M de NAC (N-Acetil-L-cisteína, Sigma); 10 μ M de CPT (Camptotecina, Sigma), e 0,03% de DMSO (Dimetilsulfóxido) por 2 h. Então, a suspensão de células foi transferida para um micro-tubo e centrifugada à 2000 g por 10min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 20 μ L de solução de PBS 1x, centrifugada à 2000 g por 10min e ajustadas para 1×10^7 cel/mL. Após 48 h, as células foram coradas com uma mistura de brometo de etídio (5 μ g/mL, Sigma) e laranja de acridina (5 μ g/mL, Sigma) (BE/LA). Os parasitos foram imobilizados sobre uma lamínula estéril previamente tratada com *Cell-Tak, Cell and Tissue Adhesive* (Fisher Scientific), as lâminas foram analisadas com o uso do Microscópio de Fluorescência (Axioplan-Zeiss) com aumento de 100x e filtro FITC (LINARES, et al., 2017).

Para a quantificação percentual de cada evento celular (viáveis, necróticas e apoptóticas-like), foram contadas 300 células de cada amostra. Essas análises foram realizadas no laboratório de terapia fotodinâmica da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi, na USP de São Carlos.

3.9 Análise estatística

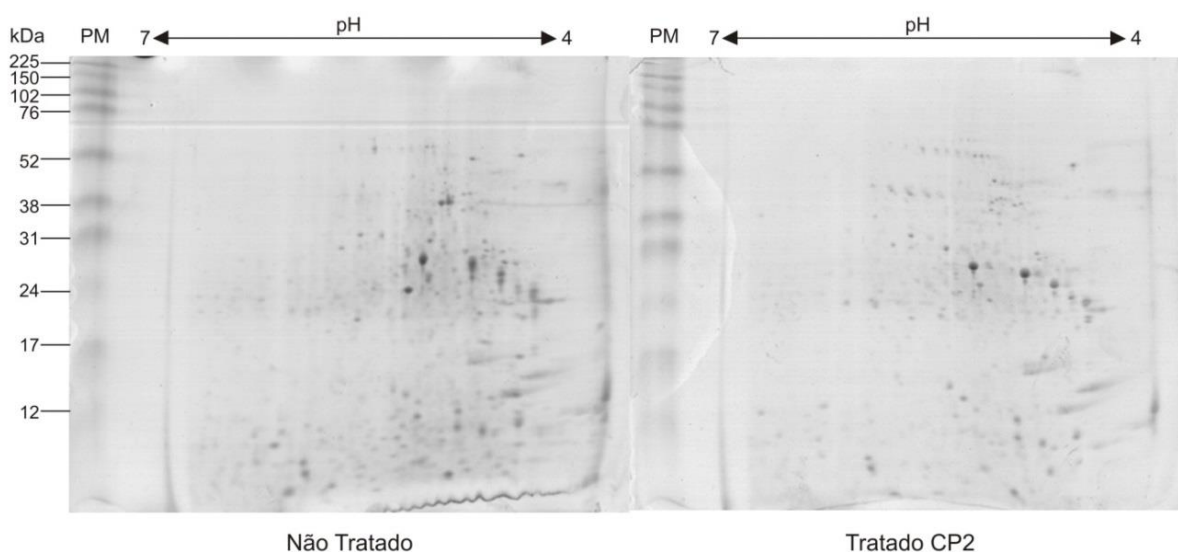
Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, para todas as amostras. Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey, 1995). Os tratamentos foram considerados significativos para $p < 0,01$.

Resultados e Discussão

4.1 CP2 induz o aumento na expressão de genes e proteínas em *L. (L.) amazonensis* relacionados com processos de detoxificação celular e disfunção mitocondrial

A análise proteômica de *L. (L.) amazonensis* foi realizada por Velásquez (2017), após o crescimento na presença ou ausência de **CP2**. A isoeletrofocalização foi realizada nas faixas de pH de 3-10 e de 4-7, sendo a última escolhida para os experimentos a serem realizados, pois possibilitou melhor resolução das proteínas. Nesta faixa de pH de 4-7 (figura 11), aproximadamente 80-100 proteínas foram detectadas por meio de coloração com *Coomassie Brilliant Blue R-250*. Durante a focalização isoéletrica as proteínas migram de acordo com os seus pontos isoeletricos (pI). A adição de fosfato à proteína resulta no aumento de duas cargas negativas, isto 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, tripanotona peroxidase e ATP sintase subunidade beta, já que os eventos de fosforilação são dinâmicos e variam de acordo com as condições ambientais em que a célula se encontra.

Figura 11. 2D-PAGE de proteínas totais (250 µg) de *L. (L.) amazonensis* após exposição ao CP2 por 72h. As proteínas foram extraídas de células não expostas ao **CP2** (A) e após exposição a 13,3 µM de **CP2** (B) por 72 horas. O padrão de massa molecular (kDa) está indicado no lado esquerdo dos géis. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue R-250*.



Fonte: Velásquez, (2017)

Essas análises comparativas revelaram que o proteoma foi significativamente influenciado pelo tratamento das amostras com o composto, o que permitiu a detecção de proteínas de importância fisiológica, como por exemplo, proteínas transportadoras de elétrons na cadeia respiratória, proteínas relacionadas ao estresse e chaperonas, proteínas envolvidas no processamento do RNA e na síntese de proteínas, além de proteínas envolvidas no metabolismo de outras proteínas. Quando possível, as proteínas foram divididas em categorias funcionais, sendo elas: síntese de proteínas, processamento de RNA, metabolismo de proteínas, estrutural, resposta ao estresse, detoxificação e proteínas de cadeia respiratória. A identificação dessas proteínas envolvidas em sistemas correlacionados foi importante para o entendimento da fisiologia do parasito, bem como para a eficiência de **CP2**. A partir desses dados, experimentos de expressão gênica por qPCR foram conduzidos com alguns genes que codificam para algumas proteínas encontradas diferencialmente expressas na análise do proteoma de *L. (L.) amazonensis* após exposição ao **CP2**. Os genes selecionados para análise de PCR em tempo real foram os genes que codificam para as proteínas: tripanotiona peroxidase; calreticulina; citocromo C; GRP78; HSP10k e citocromo C oxidase pois, estes genes estão envolvidos em processos celulares de detoxificação, estresse celular, oxidativo e mitocôndria.

De acordo com os dados obtidos por Velásquez (2017), das dezenove proteínas diferencialmente expressas, quatorze tiveram a sua síntese induzida após exposição ao **CP2**, sendo essas: ribonucleoproteína P18 mitocondrial, GRP78, calreticulina, HSP70, dissulfureto isomerase (PDI), HSP83-1, tripanotiona redutase, triparedoxina peroxidase, citocromo c oxidase subunidade IV e ATP sintase subunidade β , fator translacional de alongação 1 β , carboxipeptidase, β tubulina e α tubulina. As demais proteínas tiveram a síntese reprimida após exposição em comparação ao controle, como indica a tabela 2.

Algumas proteínas apresentaram um *fold* muito maior relação ao controle (ausência de **CP2**). A proteína HSP70 teve sua expressão aumentada em nove vezes comparada ao controle, a proteína calreticulina apresentou um aumento de sete vezes após o tratamento, o fator de alongação 1 β aumentou em onze vezes a sua expressão na presença de **CP2**, como indica a figura 12.

Tabela 2. Categorização biológica das proteínas encontradas em *L. (L.) amazonensis* após o tratamento com **CP2** de acordo com *UNIPROT*

Nº Proteína ^{*1}	Nº Acesso ^{*2}	Proteína sintetizada ^{*3}	Função celular ^{*4}	Expressão relativa CP2 72h ^{*5}	Descrição proteica ^{*6}	MM (KDa)/ pl teórico ^{*7}	% de cobertura ^{*8}
217	LMXM_28_1200	Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78)	Interage de forma seletiva e não covalente com ATP e auxilia na montagem de polipeptídios no RE	+	Resposta ao estresse-Chaperona	55 / 5,2	48,18
44	LMXM_30_2600	Calreticulina	Interação seletiva e não covalente com íons de cálcio (Ca ²⁺) e auxílio na conformação da estrutura terciária de polipeptídios	+	Resposta ao estresse-Chaperona	52 / 4,14	31,06
9	LMXM_23_0040	Triparedoxina peroxidase_Peroxidoxin	Atividade de peroxidase: catalisa a reação: 2 R'-SH + ROOH = R'-S-S-R' + H ₂ O + ROH	+	Detoxificação-Oxidoredutase	19 / 5,4	69,47
52	LMXM_05_0350	Tripanotiona redutase	Atividade de oxidoredutase de dissulfeto e Interação seletiva não covalentemente com FAD	+	Detoxificação-Oxidoredutase	40 / 5,64	49,49
15	LMXM_28_2770	Heat-Shock Protein hsp70	Interage de forma seletiva e não covalente com ATP e auxilia a formação da estrutura terciária de cadeias polipeptídicas	+	Resposta ao estresse-Chaperona	23 / 5,2	27,62
41	LMXM_28_1200	Dissulfeto Isomerase (PDI)	Catalisa o rearranjo da ligação dissulfeto nas proteínas e está envolvida na homeostase redox celular	+	Resposta ao estresse-Chaperona	40 / 4,8	66,1
33	LMXM_28_1200	Citocromo C oxidase subunidade IV	Complexo transmembrana que catalisa a reação: 4 ferrocitocromo c + O ₂ + 4 H ⁺ -> 4 ferricitocromo c + 2 H ₂ O	+	Cadeia respiratória	32 / 5,6	74,63
40	LMXM_25_1170	ATP sintase subunidade Beta	Produz ATP a partir de ADP e participa da hidrólise de ATP acoplado a transporte de prótons	+	Cadeia respiratória	46 / 4,8	66,1
39	LMXM_33_0840	Translation elongation fator 1-beta	Alongamento da cadeia de peptídeos durante a síntese polipeptídica no ribossomo	+	Síntese de proteínas-Tradição	29 / 5,34	39,66

Nº Proteína *1	Nº Acesso *2	Proteína sintetizada *3	Função celular *4	Expressão relativa CP2 72h *5	Descrição proteica *6	MM (KDa)/ pI teórico *7	% de cobertura *8
63	LMXM_26_0620	10 kDa Heat-Shock Protein	Envolvida no dobramento de polipeptídios ou RNA que sofreram desnaturação por estresse celular	-	Resposta ao estresse-Chaperona	7 / 5,56	49
43	LMXM_32_2540	Carboxypeptidase	Hidrolisa a ligação peptídica C-terminal na cadeia polipeptídica	+	Metabolismo de proteínas- Proteólise	36 / 5,31	57,72
3	LMXM_15_0275	Ribonucleoprotein p18_ mitocondrial	Envolvida com o processamento de proteínas e terminação da transcrição	+	Tradução	12 / 4,9	81,28
123	LMXM_27_1380	60S acidic ribosomal protein P0	Biogênese do Ribossomo e processo da biossíntese de macromoléculas	-	Tradução	28 / 4,74	21,12
131	LMXM_36_0180	Elongation factor 2	Possui atividade de GTPase, catalisando a reação $GTP + H_2O \rightarrow GDP + \text{fosfato}$. Interação seletiva e não covalente com a guanosina trifosfato	-	Síntese de proteínas- Tradução	31 / 5,7	23,43
124	LMXM_32_0312	Heat shock protein 83-1	Auxilia processos de tradução, reparo do DNA e na montagem de polipeptídios para a formação da estrutura terciária	+	Resposta ao estresse-Chaperona	29 / 5,03	17,12
21	LMXM_08_1171	Beta Tubulina	Um dos principais constituintes dos microtúbulos. Contribui à integridade da estrutura do citoesqueleto	+	Estrutural-Citoesqueleto	24 / 4,28	55,3
18	LMXM_13_0280	Alfa tubulina	Um dos principais constituintes dos microtúbulos. Compõe o citoesqueleto	+	Estrutural-Citoesqueleto	23 / 4,12	34,85

*1 Definido de acordo com a posição das proteínas no gel de 2D (nº correspondente ao da Figura 11);

*2 Número de acesso no banco de dados de *L. mexicana* (complexo *L. amazonensis*);

*3 Proteína diferencialmente expressa

*4 Função predita pelo UNIPROT;

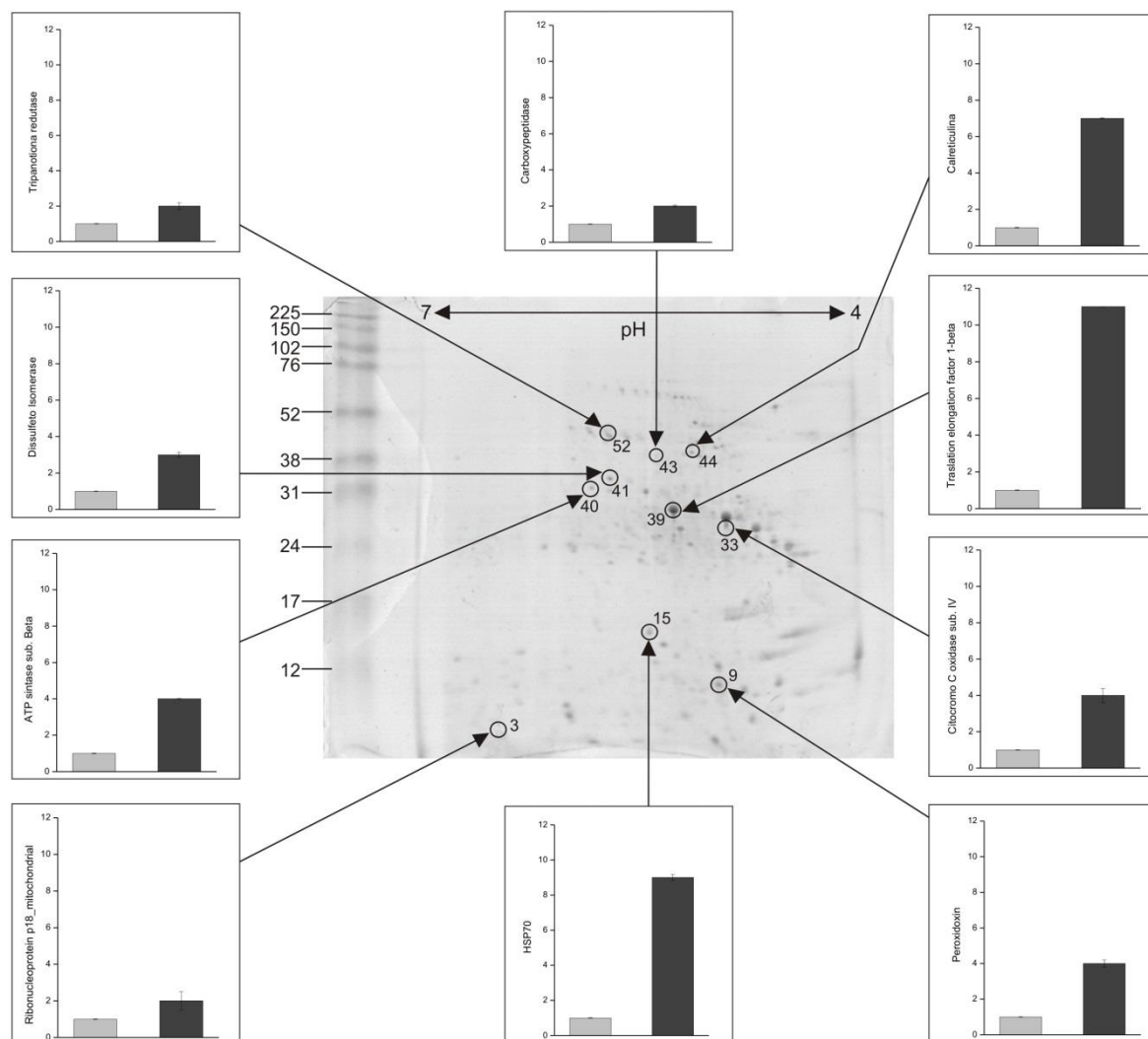
*5 Expressão de proteínas após a exposição ao CP2 por 72 horas relativamente ao controle (ausência de CP2). +: síntese induzida, -: síntese reprimida, ($p < 0,05$);

*6 MM: massa molecular teórica em KDa. pI: ponto isoelétrico teórico;

*7 Porcentagem de aminoácidos encontrados experimentalmente em relação ao total de aminoácidos da proteína anotada

*8 UNIPROT (Universal Protein Resource)

Figura 12. Fold das proteínas diferencialmente expressas por *L. (L.) amazonensis* em resposta ao CP2 após separação do extrato protéico total por 2D-SDS-PAGE. Círculos representam proteínas que foram significativamente diferentes ($p < 0,01$) entre células controle e células após exposição ao **CP2**. Histogramas representam a média do volume e os respectivos desvios-padrão entre as triplicatas para cada proteína antes e após o tratamento com **CP2** por 72 h. Os números associados com as proteínas também denotam a sua identidade na Tabela 2. $p > 0,01$.



Fonte: Adaptado de Velasques, (2017)

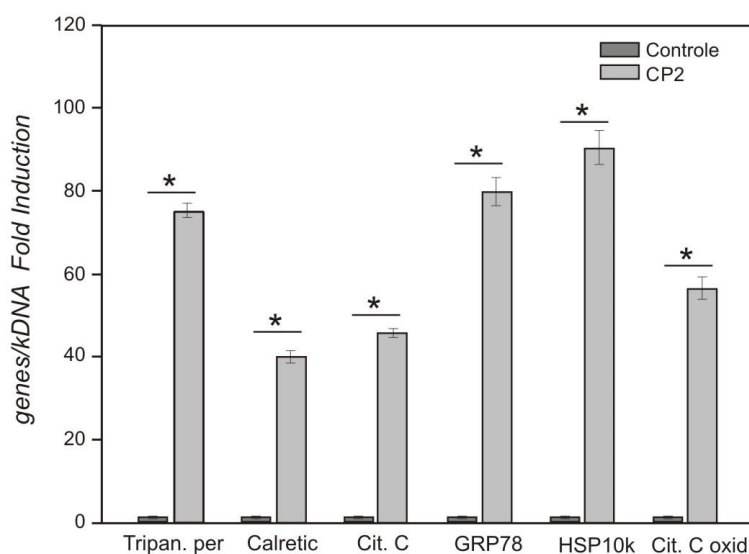
De fato, a diferença de expressão dessas proteínas após o tratamento com **CP2** indica que elas podem desempenhar um papel importante na tentativa de manter o parasito vivo após a exposição ao ciclopaldado. Interessantemente, ao analisar a transcrição dos genes que codificam para essas proteínas, encontradas

diferencialmente expressas em *L. (L.) amazonensis*, também encontra-se um aumento da expressão dos genes.

Os níveis de expressão para cada gene em relação ao controle (definido como nível de expressão igual a 1) foram obtidos para células expostas ao **CP2** por 72h (figura 13). Os resultados indicaram que após a exposição das células ao composto todos os genes analisados tiveram a sua expressão induzida (nível de expressão maior que 1). Os oligonucleotídeos desenhados não apresentaram formação de dímeros, nem amplificações inespecíficas, e apresentaram curva de melting com pico único, eficiência entre 95-110% e slope entre -3,3 e -3,6 e R^2 entre 0,999 e 0,988 como pode ser observado na figura do anexo 1.

Esses resultados foram estatisticamente confirmados pelo Teste *t* de Student, com nível de confiança de 0,01.

Figura 13. Quantificação da expressão de genes por RTq-PCR de células de *L. (L.) amazonensis* após exposição ao CP2 por 72h, em comparação ao controle (ausência de CP2). Os genes estão indicados na abscissa, sendo eles: tripanotona peroxidase, calreticulina, citocromo C, GRP78, HSP10k e citocromo C oxidase. Utilizou-se o kDNA como gene de referência.



Fonte: Autor, 2018

Ao agrupar esses genes diferencialmente expressos na presença de **CP2**, encontra-se duas grandes organelas importantes para a sobrevivência do parasito: a mitocôndria e o retículo endoplasmático. As mitocôndrias são o principal local para a geração de ATP celular pela fosforilação oxidativa. Agentes genotóxicos para DNATopol

são capazes de inibir a síntese de algumas proteínas mitocondriais, como a F0F1-ATP, importantes em *L. (L.) donovani* e induzir morte celular em parasitos (ROY, et al., 2008). O aumento da expressão de algumas proteínas e seus genes codificadores podem estimular a tentativa do parasito em suprir dificuldades encontradas em eventos relacionados à diminuição dos níveis de ATP, e produção de ROS, seguida de despolarização do potencial de membrana mitocondrial. A geração excessiva de ROS promove danos à mitocôndria, uma vez que em condições de estresse oxidativo estes ROS se acumulam promovendo danos aos componentes mitocondriais (lipídeos de membrana e proteínas) (KOWALTOWSKI; VERCESI, 2001). Esses eventos estão relacionados e acontecem em cascata. A despolarização da membrana mitocondrial também leva à liberação do citocromo C no citosol, (SEN et al., 2004a) ativando subsequentemente proteases do tipo “caspases”. O gene que codifica para a proteína citocromo C β oxidase, assim como a própria proteína foram encontrados super-expressos na presença de **CP2**.

A Calreticulina é a principal proteína ligadora de Ca^{2+} no RE, um dos compartimentos armazenadores desse cátion dentro da célula em adição à mitocôndria e ao acidocalissomo em tripanossomatídeos (BAKSH et al., 1995; DOCAMPO; HUANG, 2015; GROENENDYK; LYNCH; MICHALAK, 2004). A *Leishmania*, assim como demais membros da família Trypanosomatidae, apresenta peculiaridades bioquímicas que a distingue das células dos vertebrados e dentre as características mais relevantes está a sinalização do Ca^{2+} . O parasito apresenta canais de Ca^{2+} na membrana plasmática e um canal voltagem dependente localizado no flagelo, local esse, onde muitas proteínas de ligação ao Ca^{2+} e enzimas envolvidas na sinalização estão presentes. Diversos mecanismos estão envolvidos na manutenção do controle intracelular da concentração de Ca^{2+} em resposta a estímulos fisiológicos; a dinâmica de interação entre os processos é essencial para a funcionalidade do parasito, a invasão da célula hospedeira e a saída da mesma, a virulência e a sua sobrevivência (DOCAMPO; HUANG, 2015). O gene que codifica para a proteína calreticulina e a própria proteína foram encontrados super-expressos nos ensaios de qPCR e proteômica, respectivamente, indicando que esses eventos podem estar correlacionados.

A triparedoxina peroxidase (peroxiredoxina), é considerada um fator de virulência em *Leishmania* (TOVAR et al, 1998). A superexpressão de peroxirredoxinas encontradas nas análises do proteoma de *L. (L.) amazonensis* na presença de **CP2** pode estar relacionada a uma tentativa de estabilização do $\Delta\Psi_m$ (HARDER et al., 2006)

e da homeostase oxidativa, uma vez que essas enzimas também estão envolvidas no processo de detoxificação celular. Outros fatores relacionados à virulência do parasito, já descritos, incluem as proteínas de estresse térmico, ou “*Heat Shock Proteins*” (HSP), a HSP70, HSP100, HSP60, HSP83 e outras proteínas correlatas como a EF-1 β , e KMP11 (MICHAËLSSON, et al., 2002). Foi observado que as células quando submetidas a choques térmicos produzem proteínas que protegem outras proteínas de alterações devido aos estímulos injuriosos. Após o estresse térmico, essas proteínas foram sintetizadas em grandes quantidades pelo organismo que sofreu estresse (CUERVO; DOMONT; De JESUS et al; 2010; CUERVO, et al., 2009).

A inibição da topoisomerase IB de *Leishmania* (VELÁSQUEZ, et al., 2017) pode desencadear processos celulares que induzam à célula à morte celular. O gene e a proteína ATP síntase subunidade β tiveram a sua expressão aumentada após o tratamento com **CP2**, indicando que o aumento da proteína ocorre para regular o transporte de ADP e ATP para o interior da mitocôndria (KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001). A diminuição de níveis iônicos e de pH intracelular pode ativar processos de morte celular em tripanossomatídeos (SHAHA, 2006). O aumento da expressão de proteínas relacionadas ao estresse, ao metabolismo de proteínas e de ribonucleoproteínas, demonstram a tentativa do parasito em sintetizar proteínas que auxiliem nos processos de modificações pós-transcricionais, como mecanismo de reparo de proteínas ou de sinalização para a degradação enzimática (BALAÑA-FOUCE et al., 2008).

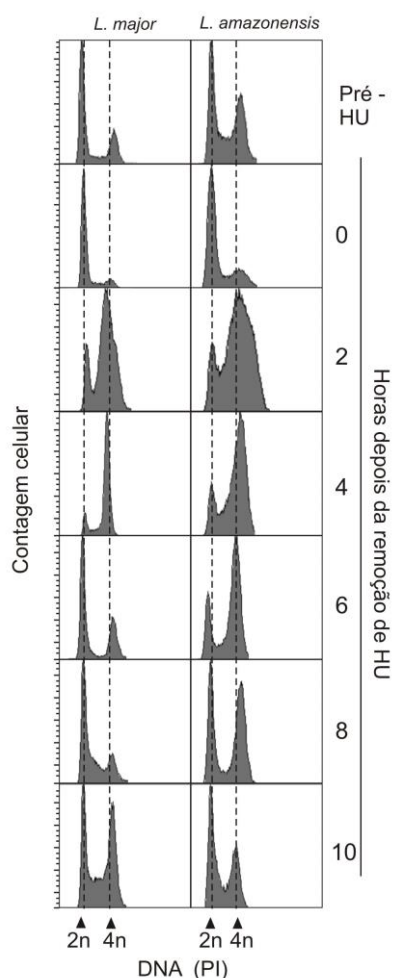
4.2 CP2 induz parada na progressão do ciclo celular em *L. (L.) amazonensis*

O antileishmanial **CP2**, alvo deste estudo, é capaz de inibir a etapa de clivagem da DNATopoIB do parasito (VELÁSQUEZ et al., 2017), e com isso acumula danos ao DNA, gerando uma cascata de eventos que podem resultar na inviabilidade celular ou danos secundários que ativam outros mecanismos de parada do ciclo celular. A correlação entre topoisomerase, ciclo celular, despolarização mitocondrial e acúmulo de ROS poderá fornecer dados interessantes sobre o mecanismo de ação de **CP2** em *L. (L.) amazonensis*, levando-as ao controle de sua proliferação e/ou morte celular. Sendo assim, é interessante analisar a resposta celular de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ao tratamento com drogas genotóxicas (HU e CPT) e com **CP2**, para tanto, inicialmente estudou-se a progressão do ciclo celular em *L. (L.) amazonensis*. A

avaliação do ciclo celular foi realizada através da técnica de citometria de fluxo. Essa técnica permite analisar e identificar a distribuição dos promastigotas nas diversas fases do ciclo celular: G0/G1 (fluorescência menor), S (fluorescência intermédia) e G2/M (dobro da fluorescência da fase G0/G1). As células são marcadas com iodeto de propídio (PI), um corante que se liga ao DNA, e emite fluorescência vermelha em 488nm. Os resultados são representados sob a forma de histograma de DNA, em que é dado o número relativo de células em cada fase do ciclo celular (ORMEROD, 2002).

Nessa análise, as células controle, tanto de *L. (L.) amazonensis* quanto de *L. (L.) major*, foram sincronizadas com HU, e liberadas para progredirem ao longo das fases G1, S e G2/M, como indica a figura 14.

Figura 14. Sincronização das células de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* durante a progressão do ciclo celular. As células foram coletadas em 0, 2, 4, 6, 8 e 10 h. O conteúdo de DNA foi medido por citometria de fluxo; Cada histograma representa dados de 50.000 eventos. Indicando que ambas as linhagens utilizadas são capazes de progredir pelas fases do ciclo celular G1, S e G2/M durante 10h de progressão.



Fonte: Autor, 2018

Na primeira coluna são referidos os resultados relativos às células de *L. (L.) major* e na segunda coluna, os resultados relativos às células de *L. (L.) amazonensis*, ambas linhagens saem de G1 (após a sincronização), passando por S, G2/M, retornando para G1 após 8-10h, sincronizando perfeitamente ao longo do ciclo celular. A linhagem selvagem de *L. (L.) major* foi utilizada como controle experimental, uma vez que as células de *L. (L.) major* progridem naturalmente pelas fases do ciclo celular (DAMASCENO, et al., 2016).

Em seguida, as células de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas com CPT (utilizada como controle positivo, por inibir a DNATopo) (SEN, et al., 2014) NAC (molécula capaz de inibir a geração de ROS, como H_2O_2 , $OH^\bullet$, e O_2^-), DMSO (veículo de **CP2**) e **CP2** ($4 \times IC_{50}$ e $10 \times IC_{50}$). Conforme resultado apresentado na figura 15, a primeira, segunda e terceira coluna referem-se aos resultados das células de *L. (L.) amazonensis* sem tratamento, e após tratamento com os controles DMSO e NAC, respectivamente. Em ambas colunas, percebe-se que as células de *L. (L.) amazonensis* conseguiram progredir naturalmente ao longo das fases do ciclo celular. Já nos tratamentos com **CP2** ($4 \times IC_{50}$), Nac + **CP2** ($4 \times IC_{50}$), e Nac + **CP2** ($10 \times IC_{50}$), as células não conseguiram progredir para a fase M do ciclo celular, ficando paradas na fase S ao longo de todo o tempo analisado.

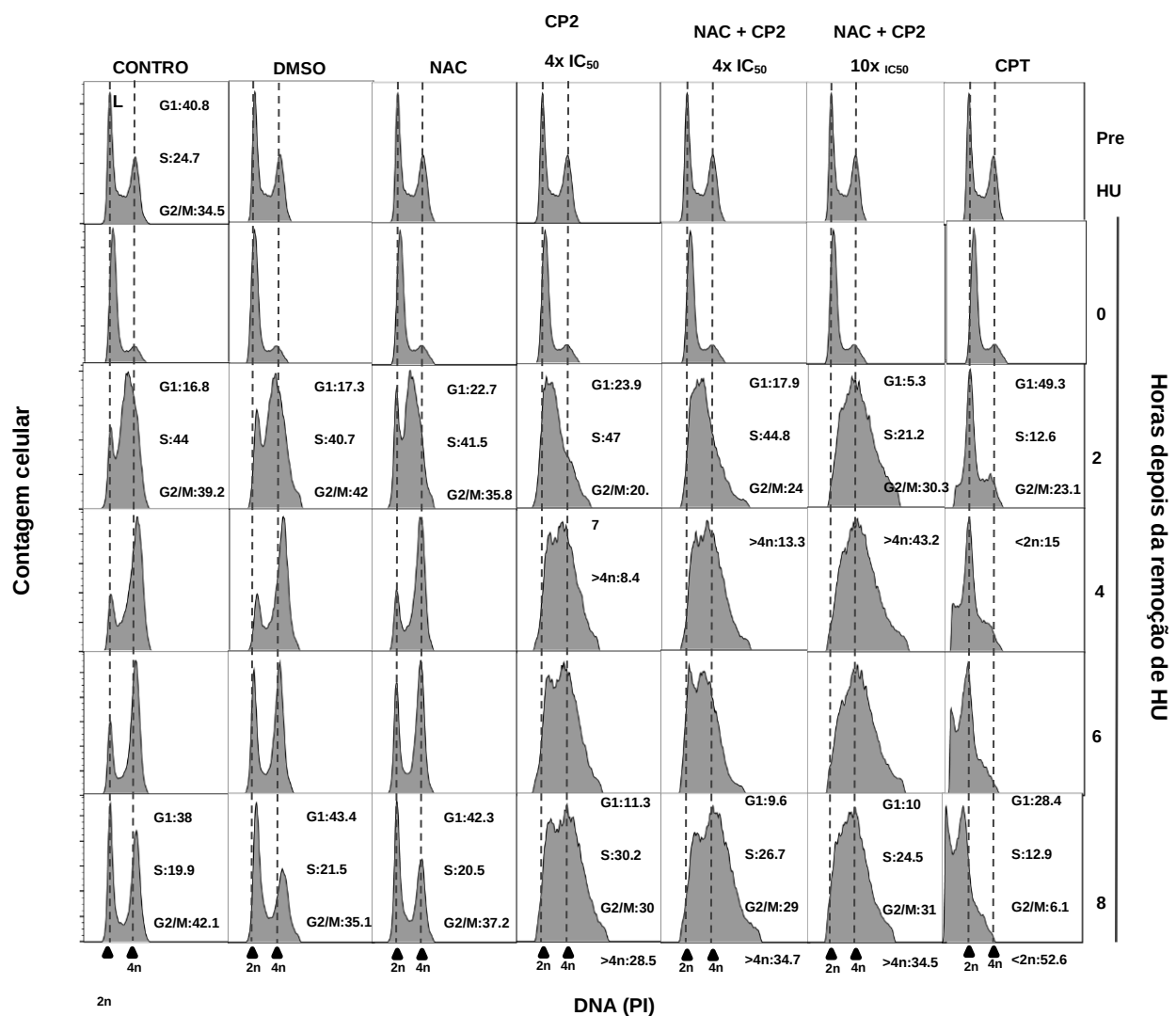
Interessantemente, as células tratadas com NAC progrediram naturalmente ao longo do ciclo, indicando que o efeito de parada no ciclo celular não é causado por ROS e sim, possivelmente, como consequência da inibição da DNATopoIB. Já as células que sofreram um pré-tratamento com NAC, seguida de tratamento com **CP2**, permaneceram paradas na fase S, mostrando que realmente **CP2** faz com que as células não consigam passar da fase de replicação celular (Figura 15).

No tratamento com CPT, observou-se que as células de *L. (L.) amazonensis* apresentaram um acúmulo significativo nas fases G1 e sub G1, inibindo a entrada das células na fase S.

A CPT e o **CP2** são capazes de inibir a DNATopoI, entretanto isso acontece de forma diferente, enquanto **CP2**, por meio de uma inibição catalítica, se liga à DNATopoIB impedindo que a enzima se ligue ao DNA, a CPT se liga à enzima e ao DNA ao mesmo tempo, promovendo a formação de um complexo DNA-CPT-TopoI que não se desliga (SEN, et al., 2004a; BODLEY; SHAPIRO, 1995) impedindo a etapa de religação das cadeias. Estes dados indicam que o estresse replicativo é capaz de desencadear a inibição da progressão celular e sugere a existência de coordenação

entre mecanismos de inibição da DNAtopoIB, detecção de dano no DNA e controle da morte celular.

Figura 15: Efeito de CP2 no ciclo celular de *L. (L.) amazonensis*. A progressão do ciclo celular foi bloqueada com 5mM de HU por 8 h, transferido para meio livre de HU (controle), e meio sem HU, e contendo DMSO, NAC, **CP2**, **CP2**+NAC e CPT. As células foram coletadas em 0, 2, 4, 6 e 8 h. O conteúdo de DNA foi medido por citometria de fluxo; Cada histograma representa dados de 50.000 eventos; 2n e 4n indicam DNA não replicado e replicado, respectivamente. A porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M é indicada para células antes do tratamento com HU (Pré HU) e após a remoção de HU 2 e 8 h. HU-hidroxiureia; NAC, N-acetil-L-cisteína; CPT, Camptotecina. (p <0,01). DMSO, Dimetilsulfóxido **CP2**, μ -diazidobis(N,N-dimetilbenzilamina)dipaládio(II).



Fonte: Autor, 2018

A parada do ciclo celular em G1 induzida por alguns agentes genotóxicos, como a CPT e o DIM (3,3-diindolylmethane) (ROY, et al., 2008) ocorre pela supra-regulação de p21 em células de câncer de mama (HONG et al., 2002), pela ativação de proteínas efectoras e pelo aumento de ROS celular em *Leishmania* (SEN et al., 2004b). O DIM inibe significativamente o fator de necrose tumoral B regulando negativamente a sua função, o que promove uma sinalização apoptótica nessas células (RAHMAN; SARKAR, 2005). Os danos acumulados por esse descontrole podem resultar na inviabilidade celular ou danos secundários que ativam outros mecanismos de parada do ciclo celular.

A superexpressão de TbPCNA (antígeno nuclear de proliferação celular) na proliferação de *T. brucei* impediu a replicação do DNA e impediu que o parasito saísse de G2/M (VALENCIANO, RAMSEY, MACKEY, 2015). De acordo com os pesquisadores, esses resultados indicam que mecanismos distintos de parada do ciclo celular estão associados à regulação positiva ou negativa do PCNA em *T. brucei*.

Ferreira, (2009), ao analisar o alcalóide guanidínico PT percebeu que esse composto foi capaz de alterar as fases do ciclo celular na linhagem HL-60. O composto nas concentrações 15 e 20 μ M gerou um significativo aumento do número de células na fase G0/G1 e nas mesmas concentrações causaram diminuição da fase S.

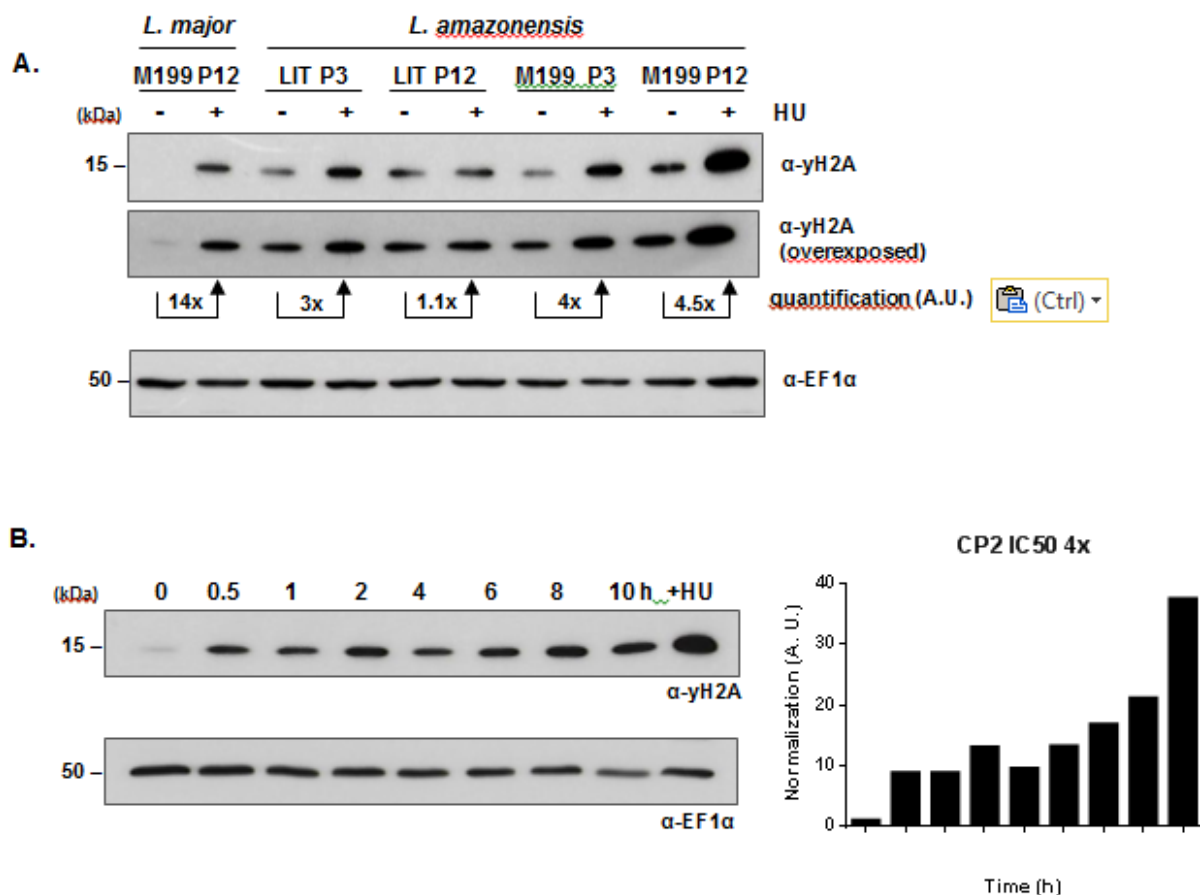
4.3 *L. (L.) amazonensis* apresenta níveis de histona γ H2A aumentados após tratamento com CP2

A cromatina é um complexo dinâmico de DNA e proteínas que regulam o fluxo de informações do genoma à proteína. O reconhecimento eficiente e a reparação correta de danos ao DNA, principalmente de danos em cadeias duplas, são essenciais para a estabilidade genômica e a homeostase celular. O reparo imperfeito de quebras de fita dupla do DNA (DSBs) pode levar à oncogênese em mamíferos (REDON, et al., 2012) e a morte celular em tripanossomatídeos (GENOIS et al., 2014). O reparo eficiente de DSBs depende, da rápida formação da histona H2A fosforilada (γ -H2A) nos locais de quebra, e do recrutamento de proteínas de reparo, sendo assim, quando há danos no DNA, a γ H2A é rapidamente recrutada para os locais de quebra, e por isso, a γ H2A é um dos principais marcadores do início do dano ao DNA nas células eucariotas (FOSTER; DOWNS, 2005). A indução da quebra de dupla fita no DNA permite a fosforilação dessa histona na treonina 130 na porção C-terminal, em tripanossomatídeos (GENOIS et al., 2014), promovendo uma cascata de sinalização de danos ao DNA que

culminam na parada do ciclo celular (GLOVER; HORN, 2012). Dessa forma, avaliou-se os níveis de γ H2A nas células de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com **CP2**.

Na primeira e segunda coluna da figura 16A, encontram-se os resultados de γ H2A referentes às células de *L. (L.) major*, utilizando o meio de cultura padrão para o seu crescimento, M199 e a passagem padrão para este tipo de análise, P12. Nas colunas seguintes estão os resultados referentes às células de *L. (L.) amazonensis*. Para essas células utilizou-se dois meios de cultura diferentes (M199 e LIT) e duas passagens diferentes (P3 e P12). Na linha seguinte, o sinal de (-) indica ausência de HU e o sinal (+), presença de HU. A *L. (L.) amazonensis* responde a presença de HU, aumentando a fosforilação de H2A, em até 4,5 vezes.

Figura 16: Efeito de CP2 na expressão γ H2A. (A) Expressão de γ H2A na presença de células com 10 mM de HU, 3 e 12 gerações (P3 e P12, respectivamente). EF1 α foi usado como um *loading* (controle). A quantificação do sinal γ H2A foi normalizado com o sinal EF1 α . (B) *Time course* da expressão de γ H2A na presença de **CP2** 4xIC₅₀. O gráfico à direita mostra a quantificação do sinal γ H2A normalizado com o sinal EF1 α .



Fonte: Autor, 2018.

Entretanto, quando comparada à *L. (L.) major* percebe-se que a *L. (L.) amazonensis* apresenta níveis de fosforilação mesmo na ausência de estresse (-HU), indicando que naturalmente as células de *L. (L.) amazonensis* apresentam níveis basais de estresse celular (figura 16A). Os anticorpos primários não produziram reação cruzada, garantindo a fidelidade das bandas.

Em um segundo experimento (figura 16B) utilizando **CP2** ($4 \times IC_{50}$) e células de *L. (L.) amazonensis* na P12, foi possível verificar um aumento progressivo em relação à γ H2A na presença de **CP2**, principalmente em 8 e 10h. Uma vez que um dos eventos característicos em resposta à quebra da fita dupla de DNA é a fosforilação da histona H2A (GENOIS et al., 2014), o dano ao DNA desencadeia um acúmulo ou geração local de γ H2A, podendo refletir em um processo de estresse replicativo nas células. Estes resultados indicam que **CP2** pode ter um papel fundamental no dano ao DNA da *L. (L.) amazonensis*.

A integridade do DNA é essencial para a sobrevivência celular, desse modo a replicação precisa ocorrer com grande fidelidade, quando isso não ocorre o sistema de reparo precisa entrar em ação o mais rápido possível para que este dano não se torne uma mutação permanente. Existem muitos agentes físicos e químicos que podem causar danos no DNA e, para que esses danos não sejam permeados para as células-filhas durante a fase S do ciclo celular, existem mecanismos de reparo do dano. Mas, o reparo do dano ao DNA nem sempre ocorre de forma adequada e, por isso surgem mutações que podem levar à tumorigênese em mamíferos e à morte celular em tripanossomatídeos (REDON, et al., 2012; GENOIS et al., 2014).

Ensaio realizados por Passalacqua, (2018) indicam que **CP2** atua fortemente no controle ao dano causado ao DNA estimulando o aumento da expressão gênica de genes relacionados com reparo ao dano no DNA, como os genes TOR1, TOR2 e TOR3, ATM, ATR e HSP90.

Evolutivamente, os seres foram selecionando vários mecanismos de reparo aos danos causados no material genético (DE LAAT, JASPERS, HOEIJMAKERS, 1999). Entre as principais vias de reparo de DNA pode-se citar o reparo direto ao dano. Nessa via, o DNA é corrigido sem a necessidade de um DNA molde e sem que ocorra a quebra ou a síntese na molécula de DNA; essa via corrige principalmente as alterações químicas de bases (alquilação). Um outro tipo de via de reparo é a via de reparo por excisão de bases. Essa via atua principalmente em modificações causadas por agentes endógenos, sendo a principal via de reparo de bases modificadas, ou seja, quando ocorre

uma troca de bases. Mas, essa via também pode atuar em danos por alquilações, perda de base (geralmente purinas), estresse oxidativo ou radiação ionizante (COSTA, et al., 2001).

A via de reparo por excisão de nucleotídeos detecta distorções na dupla fita do DNA, causada principalmente por dímeros de pirimidina, estresse oxidativo ou adutos de guaninas. Essa via é uma das mais importantes dentre os processos de reparo, por ser capaz de reconhecer lesões nos genes que estão sendo transcritos, ou seja, é um reparo que está intimamente acoplado aos processos de transcrição, para tanto a principal sinalização para ativar esta via é a parada da RNA polimerase II. Em eucariontes o processo de reparo por excisão de nucleotídeos envolve a ação de mais de 30 proteínas que atuam em 5 passos consecutivos: (i) reconhecimento da lesão; (ii) abertura da dupla hélice de DNA onde está localizada a lesão; (iii) dupla incisão; (iv) síntese do novo DNA utilizando como molde a fita não danificada e (v) ligação da porção 5' da nova fita sintetizada à cadeia já existente (COSTA, et al., 2003).

O reparo de bases mal emparelhadas atua principalmente com o intuito de corrigir os erros de replicação, atuando primordialmente na cadeia de DNA recém sintetizada corrigindo os erros que a DNA polimerase deixou passar e corrigindo os danos que possam interferir com a atividade replicativa das DNA polimerases (BUERMEYER, et al., 1999).

A via de reparo de quebra na dupla fita atua em danos causados por ROS, agentes químicos e ações ionizantes. Essa via pode ser dividida em (i) reparo de ligação das extremidades não-homólogas (NHEJ) e (ii) reparo por recombinação homóloga (RH). A via NHEJ não precisa de um DNA molde e ocorre principalmente em reparos nas fases G1 e G2 do ciclo celular e a RH ocorre quando danos ao DNA pedem reparo na fase S (ALBERTS, et al., 2015). Muitos pesquisadores sempre propuseram a existência de interação entre os diferentes mecanismos de reparo de DNA. Dessa forma, o que se sugere é que os mecanismos de reparo de DNA, apesar das suas preferências por determinadas lesões, trabalham de uma forma bastante integrada para que erros na dupla fita não sejam perpetuados (BERTRAND et al., 1998; LE PAGE, et al., 2000).

Estudos conduzidos por Da Silveira, et al., (2011), mostraram que mesmo em elevadas doses do agente causador de dano ao DNA, a fleomicina, que sabidamente induz quebra no DNA na forma de dupla-fita, não foi capaz de matar formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em contraste, em doses abaixo do IC₅₀, a droga

induziu parada no ciclo celular na fase G1/S e levou as células a um rápido processo de recrutamento do sensor universal de quebra de DNA em dupla fita, a γ H2A, seguido do acúmulo de RAD51 no núcleo desses parasitos.

Damasceno, et al. (2016), observaram que níveis diminuídos das proteínas Rad9 ou Hus1 não só afetam a proliferação da *L. (L.) major*, como também interferem na progressão do ciclo celular, e aumentam os níveis de dano no DNA detectados pelo aumento da γ H2A. Ao pesquisar a ativação da ATM (proteína mutada na doença de Ataxia-Telangiectasia), Fernandez-Capetillo, et al., (2012), observaram que esta proteína desencadeia diversas respostas celulares à radiação ionizante, incluindo o início de *checkpoints* do ciclo celular. A histona H2A, a proteína 1 de ligação à p53 (53BP1) e a Chk2 são alvos da fosforilação mediada por ATM, mas pouco se sabe sobre seu papel na sinalização da presença de danos no DNA. Neste estudo, os pesquisadores demonstraram que camundongos sem H2A ou 53BP1, mas com Chk2, manifestam um defeito no ponto de checagem G2/M próximo ao observado em células ATM após a exposição a doses baixas de radiação ionizante. Além disso, em baixos níveis de dano ao DNA, a concentração de 53BP1 mediada por H2A em quebras de duplas fitas do DNA é essencial para amplificar os sinais de detecção de dano, impedindo a entrada de células danificadas na mitose.

4.4 CP2 induz a despolarização do potencial de membrana mitocondrial em *L. (L.) amazonensis*

Os tripanossomatídeos apresentam uma organização celular básica comum aos eucariotos, apresentando membrana plasmática, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (SADOK, MENNA-BARRETO, De CASTRO, 2014), porém, apresentam organelas especializadas e peculiares a esses organismos como os glicossomos (BARROS-ALVAREZ et al., 2014), o acidocalcisomo (DOCAMPO, HUANG, 2015) e o cinetoplasto (INOKI et al., 1958; STOPPANI et al., 1980). A mitocôndria está presente nas formas promastigotas e amastigotas, possui uma membrana externa, que constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol e assim como nos demais eucariotos, é geradora de ATP para a célula (MESQUITA, 2013).

A mitocôndria é responsável por produzir, aproximadamente, 90% da energia celular, na forma de ATP, gerar ROS em quantidades ideais, promovendo homeostase celular e bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembranas.

Quando há despolarização da membrana mitocondrial, o parasito pode sofrer consequências como: inibição da respiração celular e perda da capacidade de bombear prótons da matriz mitocondrial. Essa capacidade em bombear prótons para o espaço intermembranas pode ser avaliada utilizando alguns marcadores fluorescentes. O mecanismo de incorporação das sondas fluorescentes ocorre quando esta se difunde livremente pela membrana plasmática até o citoplasma da célula e se acumula na matriz mitocondrial, se a membrana mitocondrial estiver polarizada, o fluoróforo permanece na mitocôndria, mas se a membrana mitocondrial estiver despolarizada, há efluxo deste fluoróforo (CHEN, 1988).

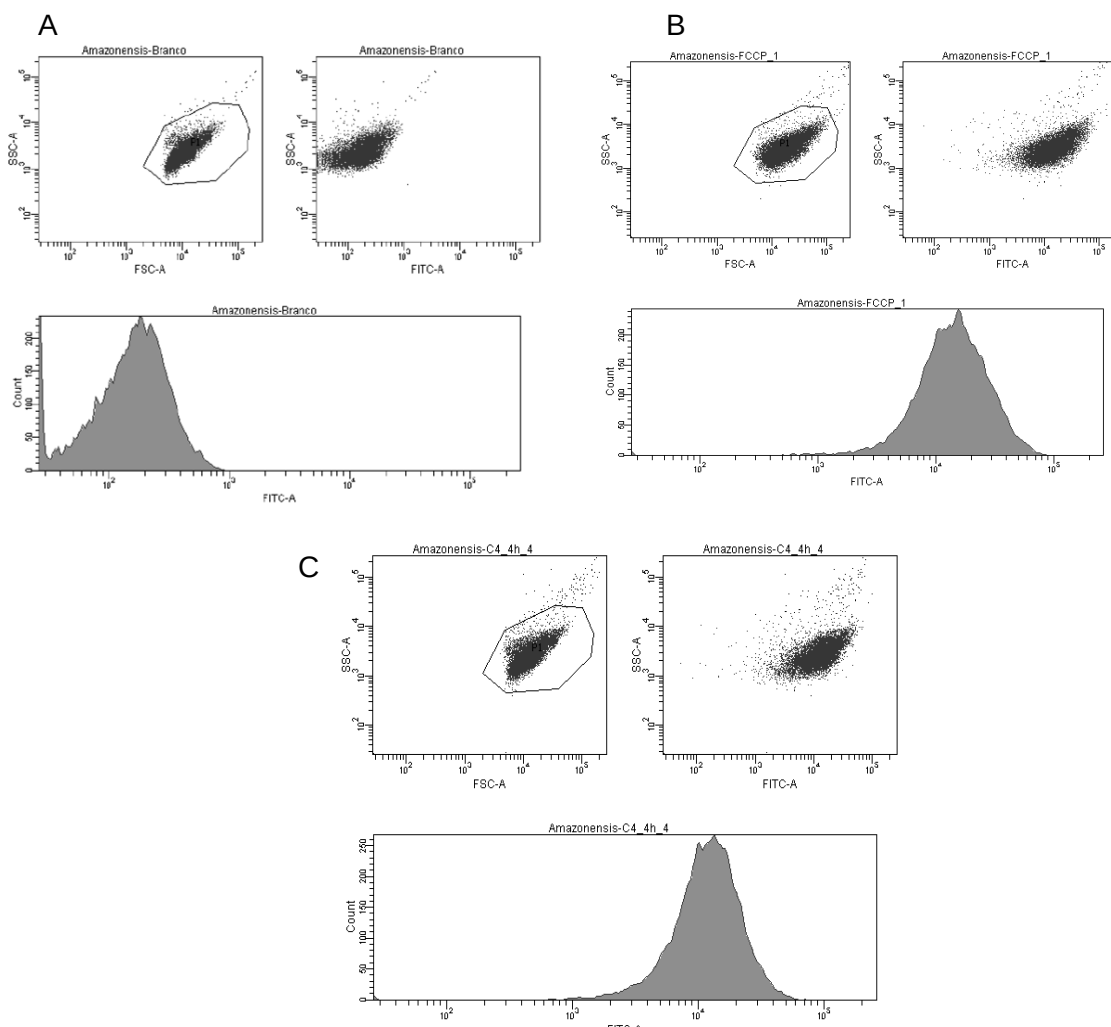
A alteração no $\Delta\Psi_m$ constitui, ainda, uma das características de morte celular por apoptose em eucariotos. Se a inibição da topolB de *Leishmania* está desencadeando esta série de eventos relacionados a regulação do ciclo celular e aumento da fosforilação da H2A, pode estar desencadeando também a despolarização do $\Delta\Psi_m$. Para investigar se há diminuição do $\Delta\Psi_m$ nas células de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com **CP2**, realizou-se análises de despolarização do $\Delta\Psi_m$.

Neste estudo, o $\Delta\Psi_m$ foi medido em citômetro de fluxo, e utilizou-se a Rho123, como corante catiônico fluorescente, pois este fluoróforo é permeável à membrana celular, e rapidamente sequestrado pela mitocôndria. Células com $\Delta\Psi_m$ inalterado captam a Rho123 e emitem fluorescência (excitação a 480 nm e fluorescência na faixa de 515-530 nm). Alterações no $\Delta\Psi_m$ levam ao efluxo da Rho123 de dentro da mitocôndria, gerando eventos que emitirão menor fluorescência (resultados com índices negativos).

Promastigotas tratadas com **CP2** em diferentes concentrações apresentaram a intensidade de marcação de Rho123 reduzida, 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 (figura 17 e 18). Na figura 17, é possível observar o deslocamento do histograma em (A) quando as células não são tratadas com **CP2** nem com FCCP em (B), quando as células são tratadas com FCCP e em (C) quando as células são tratadas com **CP2**.

As alterações no $\Delta\Psi_m$ podem levar a decréscimo nos níveis de ATP, resultando na morte do parasito. Utilizou-se o FCCP como controle positivo de $\Delta\Psi_m$, uma vez que este reagente funciona como um desacoplador do potencial de membrana mitocondrial, que apresentou índices negativos (figura 18), demonstrando que houve $\Delta\Psi_m$. Não houve $\Delta\Psi_m$ ao tratar as células com **CP2** apenas por 1 hora.

Figura 17. Histograma das análises de citometria de fluxo de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Indicam a intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 530/30nm (FITC-A) por células de duas amostras diferentes. A) Células de *L. (L.) amazonensis* com potencial mitocondrial transmembrânico inalterado; B) Células de *L. (L.) amazonensis* tratadas com FCCP mostram mudanças no padrão de emissão da fluorescência; C) Células de *L. (L.) amazonensis* tratadas com **CP2**.



Fonte: Autor, 2018

Silveira, (2016), observou que o tratamento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* com o composto AMQ 010 (derivado de aminoquinolina) na concentração de 86,0 μ M culminou em um aumento na produção de ROS citosólico (61,67%) e redução no $\Delta\Psi_m$ (34,5%), quando comparados com o controle negativo.

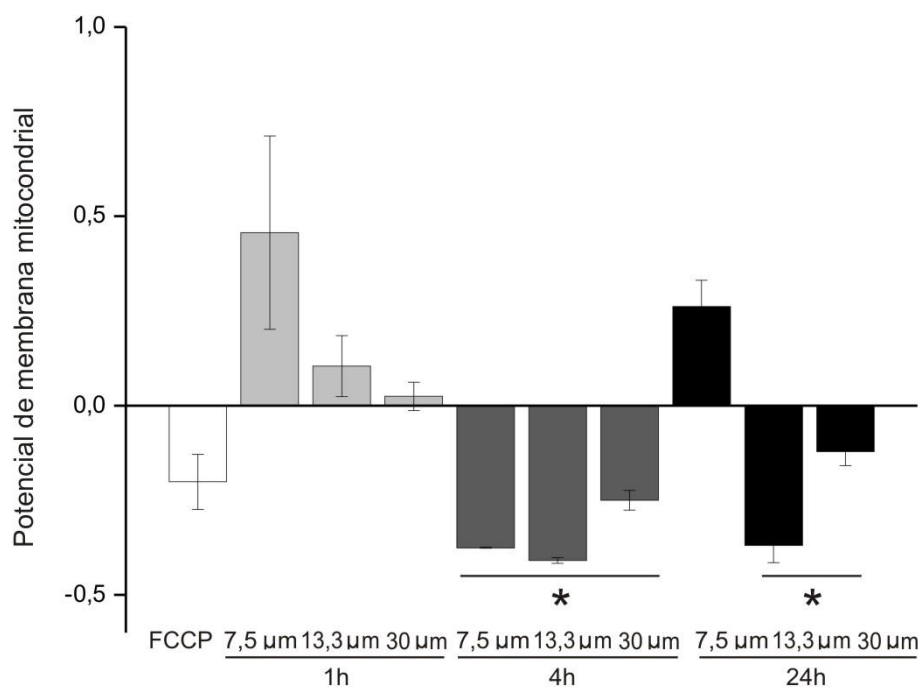
Alguns fármacos conhecidos têm como alvo a mitocôndria do parasito. Mesquita, (2013), estudando o mecanismo e ação dos fármacos loratadina e nitazoxanida em *L. (L.) infantum* notou que o fármaco loratadina alterou a permeabilidade da membrana plasmática do parasito, causando poros e levando a *Leishmania* à morte. O estudo da

ação letal da nitazoxanida em *L. (L.) infantum* sugeriu que o fármaco tem como alvo a mitocôndria, considerando a despolarização do $\Delta\Psi_m$ e o aumento da produção de ROS, resultando em estresse oxidativo e morte celular do parasito.

Navarro et al., (2010) e Serrano et al., (2011), ao estudarem células tumorais, relataram a capacidade dos compostos de paládio para inibirem enzimas e vias enzimáticas, intercalarem na dupla fita do DNA, e interagirem com grupos tióis de proteínas da membrana mitocondrial, causando dissipação do potencial da membrana.

Serrano, et al., (2011), perceberam ainda que o ciclopaladado testado é capaz de ativar de alguma forma enzimas pré e pró-apoptóticas e a inserção de Bax na membrana mitocondrial provoca a liberação de citocromo C estão acoplados ao evento de dissipação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Fontana, et al., (2015) demonstraram que as nanopartículas de Pd (II) podem exercer efeitos como estresse oxidativo, sinalização de morte celular, liberação e expressão de numerosas citocinas em testes com camundongos.

Figura 18. Efeito de CP2 no potencial de membrana mitocondrial de *L. (L.) amazonensis*. As células de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com CP2 e FCCP (controle positivo) por 1, 4 e 24 h. A despolarização mitocondrial foi medida por citometria de fluxo; Cada barra do gráfico representa dados de $\sim 5.10^6$ cels/mL de *L. (L.) amazonensis*. FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone)] ($p < 0,01$).



Fonte: Autor, 2018

O ciclopalladado ($[\text{Pd}_2(\text{S}(\text{C}_2\text{N-DMPA})_2(m\text{-DPPE})]\text{Cl}_2$) provocou dissipação do potencial de membrana mitocondrial, ativando caspases efetoras, causando condensação da cromatina e degradação do DNA em células tumorais (GUIMARAES-CORREA, et al., 2011).

Fonseca-Silva, et al., (2011), demonstram que a quercetina (flavonóide) exerce efeito antileishmanial sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* devido à geração de ROS e à despolarização mitocondrial do parasito. Em células de mamíferos, o aumento da produção de ROS celular tem sido sugerido como responsável pela despolarização do $\Delta\Psi_m$ e subsequente morte celular por Johnson, et al., (1996) e Banki, et al., (1999). Um colapso no $\Delta\Psi_m$ foi observado em *Leishmania* spp. por Rodrigues, et al., (2007), Roy, et al., (2008) e Sen, et al., (2004) e em *T. cruzi* por Santa-Rita, et al., (2005) e Menna-Barreto, et al., (2009), após tratamento com diferentes drogas. Os resultados obtidos por esses autores são consistentes com os achados em *L. (L.) donovani*, por Mukherjee, et al., (2002), onde a presença de ROS causou despolarização mitocondrial.

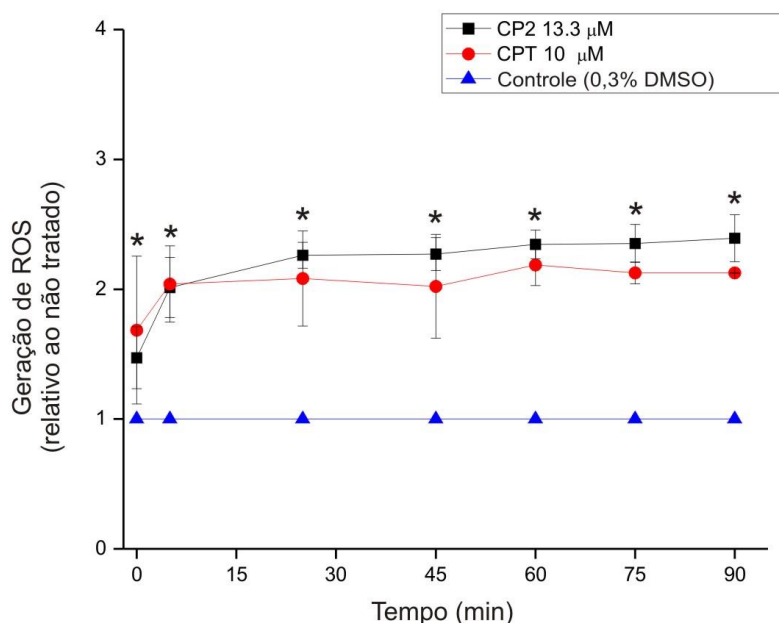
4.5 CP2 induz a formação de ROS intracelular, provocando estresse oxidativo em *L. (L.) amazonensis*

O fato de **CP2** inibir a DNATopolB de *L. (L.) amazonensis*, aumentar a expressão de genes relacionados com detoxificação celular, interferir no andamento do ciclo celular e influenciar na despolarização mitocondrial, pode consequentemente aumentar a geração de ROS dentro das células. Portanto, analisou-se a quantidade de ROS gerada em células de *L. (L.) amazonensis* após tratamento com **CP2**.

O acúmulo de ROS foi verificado utilizando o reagente H_2DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato), um indicador de radicais livres. Esse reagente é permeável e não é fluorescente até que grupos acetatos sejam removidos da molécula H_2DCFDA ; nesta condição, a molécula DCF torna-se verde fluorescente (LeBEL et al., 1992). Embora H_2DCFDA seja oxidado por diferentes ROS, esse detecta principalmente ânion superóxido. Quanto maior for a quantidade de ROS intracelular, maior será a intensidade da fluorescência emitida. Ao avaliar a produção de ROS citosólico ao longo do tempo, verificou-se que a geração de ROS foi medida após 3 horas de incubação com o reagente. O nível de ROS aumentou nos parasitos dentro de 1h de tratamento (figura 19). Estes resultados sugerem que há geração de ROS induzida por **CP2**. Os níveis de ROS detectados após tratamento com CPT foram similares aos obtidos para

CP2. Normalmente, durante a fosforilação oxidativa, a liberação de ROS na forma de ânion superóxido ocorre na extensão de 3 a 5% do total de O₂ consumido (BOONSTRA; POST, 2004). No entanto, sob certas condições, quando as drogas são capazes de inibir a fosforilação oxidativa, essa taxa de produção de ROS pode aumentar significativamente (MATTIAZZI et al., 2004).

Figura 19. Efeito de CP2 na geração de ROS de *L. (L.) amazonensis*. As células de *L. (L.) amazonensis* tratadas com CP2 (13,3 µM) e CPT (10 µM _controle positivo) por 5, 25, 45, 60, 75 e 90 min. A geração de ROS foi medida utilizando H₂DFCDA em citômetro de fluxo (p <0,01).



Fonte: Autor, 2018

Alguns autores estão postulando o envolvimento do Ca²⁺ em importantes processos celulares (SEN et al., 2004a, 2004b). de acordo com Sen et al., (2004a), a geração de ROS, quando induzida por CPT em *Leishmania* spp. é capaz de elevar os níveis de Ca²⁺ do citosol, pois há influxo de Ca²⁺ extracelular. Quando existe um aumento de Ca²⁺ citosólico, consequentemente, há desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial direcionando as células à morte celular (BERRIDGE, 2002; BRECKENRIDGE et al., 2003; DEMAUREX; DISTELHORST, 2003; SCORRANO et al., 2003). Uma das causas de geração de ROS é a disfunção da cadeia respiratória mitocondrial (MEHTA; SHAHA, 2004). O tratamento de promastigotas de *Leishmania* com oligomicina A provoca perda do $\Delta\Psi_m$ e aumento na produção de ROS (TETTAMANTI et al., 2008). Roy, et al., (2008), encontraram que o DIM possui efeitos

similares aos da oligomicina em relação à geração de ROS nas células de *Leishmania*. Considerando os mecanismos utilizados pelos parasitos para escapar dos danos gerados pelas ROS e a variedade de mecanismos pelos quais o hospedeiro atinge a produção de ROS, aliada à susceptibilidade de algumas espécies de *L. (L.) amazonensis* às ROS (MURRAY, 1981).

Nyarko et al. (2002) estudaram *in vitro* a toxicidade das porfirinas de paládio (II) e ouro (III) e suas contrapartes de íons metálicos no crescimento de *Trypanosoma brucei* obtendo promissores valores de IC₅₀. Entre os mecanismos de ação dos ciclopaladados encontram-se, a produção de estresse oxidativo como resultado de sua bioedução e extensivo ciclo redox, sinalização da via das caspases e ativação das vias apoptóticas (OTERO et al., 2006, SÁNCHEZ-DELGADO; ANZELLOTTI, 2004; FRICKER et al., 2008; NAVARRO et al., 2010). No entanto, seus alvos moleculares ainda não são definidos. Hosseini et al., (2016) demonstraram que o Pd (II) induziu disfunção mitocondrial por ser capaz de aumentar os níveis de ROS mitocondrial, causando um potencial colapso na membrana. Este efeito ainda foi correlacionado com a libertação do citocromo C. Otero et al., (2006) discutem em seus estudos a possibilidade do mecanismo de ação dos ciclopaladados estarem envolvidos também com a produção de estresse oxidativo como resultado de sua bioedução e extensivo ciclo redox.

4.6 CP2 induz a morte celular em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Quando o dano às membranas é severo, as enzimas lisossômicas entram no citoplasma e digerem a célula e os componentes celulares vazam, resultando em necrose. Alguns estímulos nocivos, especialmente aqueles que danificam o DNA, induzem outro tipo de morte celular, a apoptose, que se caracteriza pela dissolução celular sem perda total da integridade das membranas. Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose ocorre em várias funções normais e não está necessariamente associada à lesão celular (ALBERTS, et al., 2015). Além disso, pelo menos alguns tipos de estímulos podem induzir tanto a apoptose quanto necrose, dependendo da intensidade e duração do estímulo, da rapidez do processo de morte celular e das alterações bioquímicas induzidas na célula danificada.

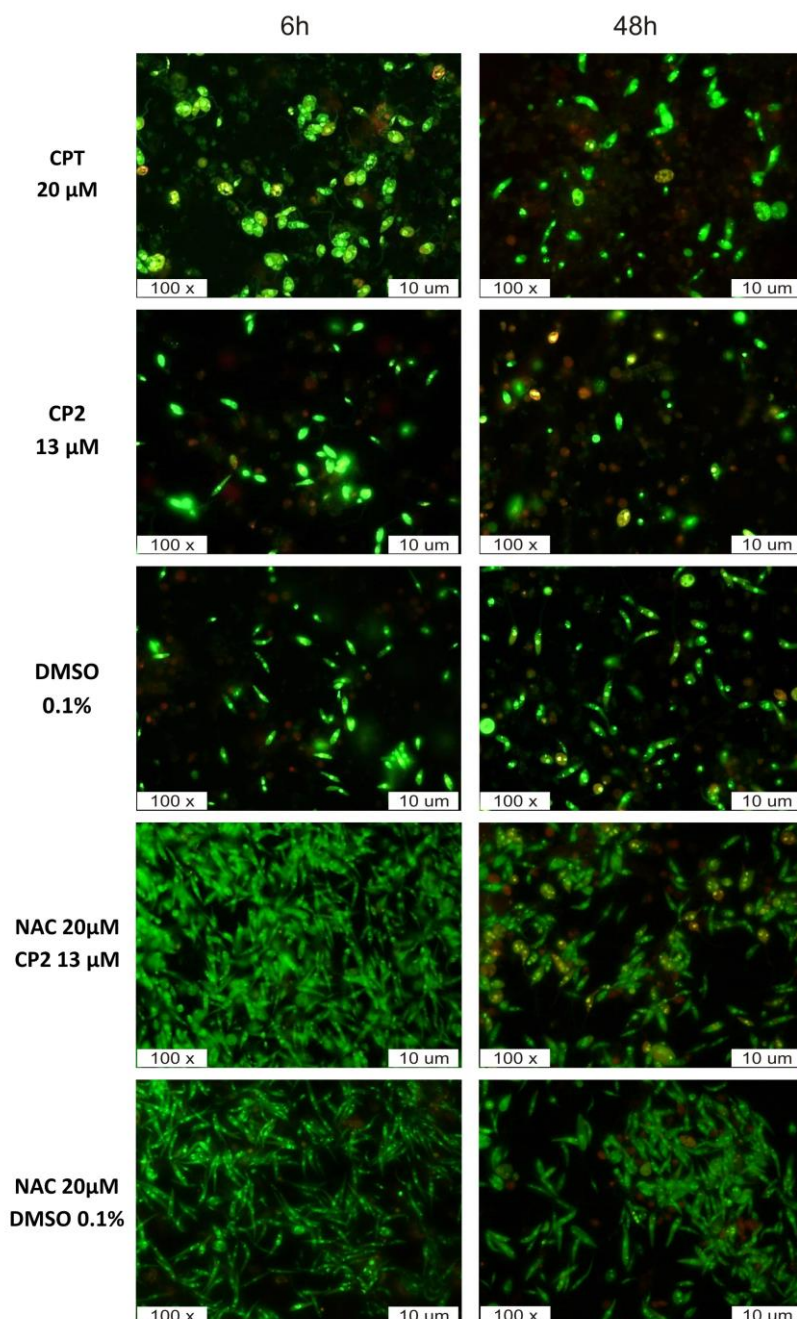
Para determinar a porcentagem de células apoptóticas-like e necróticas em *Leishmania* após o tratamento com **CP2**, (Velásquez, et al., manuscrito em preparação, (2018) e comunicação pessoal de Angela Maria Arenas Velásquez, em 13 de Agosto de

2018, recebida por correio eletrônico e arquivo PowerPoint), utilizaram o método de coloração por Brometo de Etídio/Laranja de Acridina (BE/LA). Esse método permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte por apoptose-like ou necrose cuja revelação por fluorescência se baseia em alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas (McGAHON et al., 1995). As células viáveis com membrana intacta apresentam núcleo uniformemente corado de verde pela laranja de acridina. Já, as células que se encontram em apoptose-like (membrana não intacta) apresentam aparência alaranjada, pois permitem a entrada de pequena quantidade de BE e a entrada de laranja de acridina. As células necróticas, por apresentarem intenso dano à membrana plasmática, coram-se de vermelho intenso pelo BE (KOSMIDER et al., 2004).

As células de *L. (L.) amazonensis* foram incubadas com CPT, NAC, DMSO e **CP2** (IC₅₀) por 6 e 48h, e então as porcentagens de células viáveis, apoptóticas-like e necróticas foram determinadas por análise de microscopia de fluorescência após coloração com BE/LA (figura 20). Os resultados observados na figura 21 a/b indicam que 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. Interessantemente, ao realizar um pré-tratamento das células com NAC, observou-se que o número de células mortas por necrose ou apoptose diminuiu consideravelmente em 6 e 48h, indicando que possivelmente a liberação de ROS esteja ajudando **CP2** a conduzir o parasito à morte celular. As porcentagens obtidas para CPT foram similares ao **CP2**.

Roy, et al., (2008), demonstraram que as células de *L. (L.) donovani* com depleção de DNA mitocondrial não foram direcionadas para MCP após o tratamento com DIM. A ocorrência destes eventos moleculares fornecem evidências substanciais de apoio à via de MCP em organismos unicelulares. A apoptose-like foi induzida por CPT (SEN et al., 2004a), por aferina A (SEN et al., 2004c) e por H₂O₂ (DAS et al., 2006) em *L. (L.) donovani*. A MCP demonstrou estar envolvida no controle de proliferação celular em *T. cruzi* (AMEISEN et al., 1995) e no intestino médio do inseto vetor (WELBURN et al., 1989). Quando mitocôndrias purificadas de *L. (L.) major* foram incubadas com a proteína recombinante Bax humana, houve liberação de citocromo C, sugerindo uma possível implicação de proteínas pró-apoptóticas na via de MCP em *Leishmania* (ARNOULT et al., 2002).

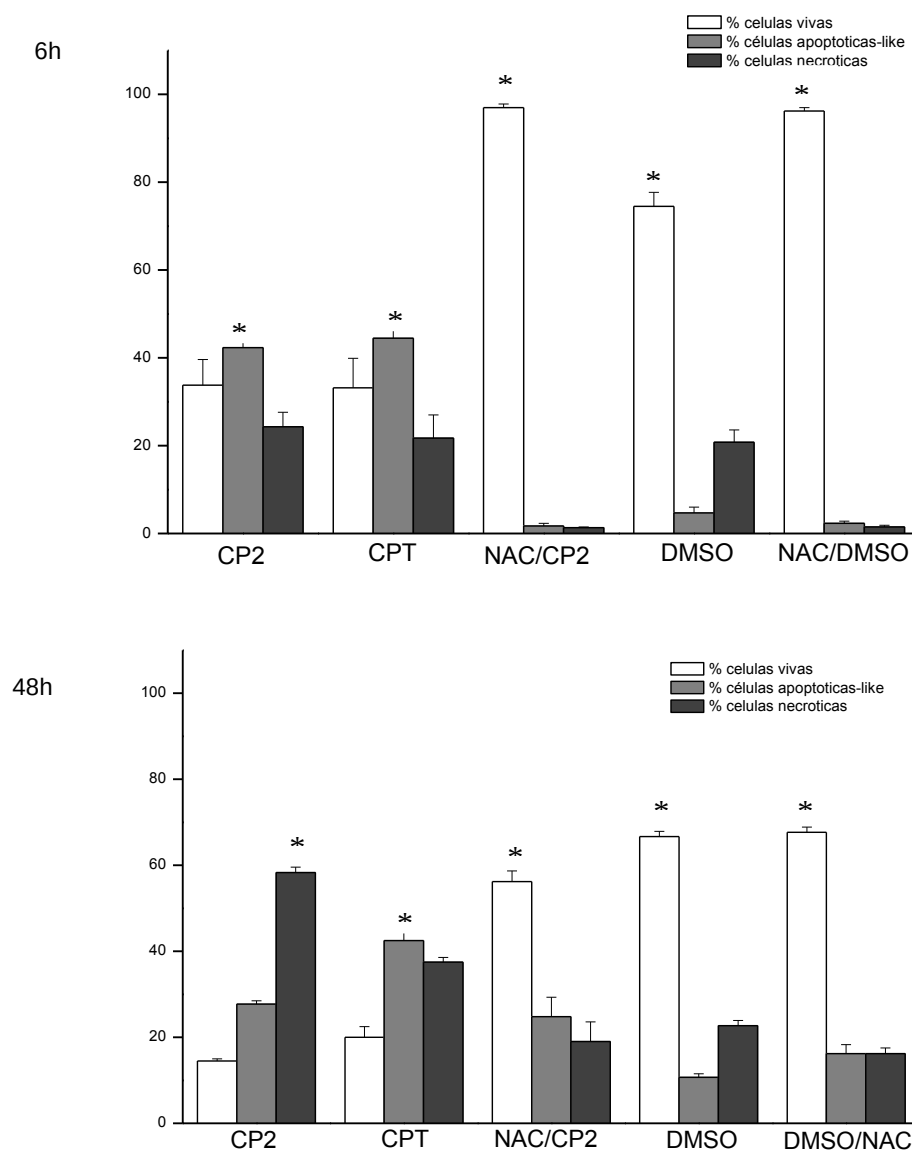
Figura 20. Marcação de células necróticas/apoptóticas-like com brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA). Os marcadores nucleares fluorescentes BE e LA são utilizados para distinguir células viáveis de células apoptóticas-like e células necróticas. Os experimentos foram conduzidos em 6 e 48 h, após tratamento das células de *L. (L.) amazonensis* com **CP2**, CPT, NAC e DMSO. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com aumento de 100x. As imagens foram capturadas com Axio Cam MRm câmera e processada usando o software AxioVision. Processamentos adicionais nas imagens foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Escala, 10 μ M.



Fonte: Velásquez, A.M.A, comunicação pessoal.

Serrano et al., (2011), ao estudarem complexos ciclopáddados perceberam que esta molécula interagiu com grupos tiol da membrana mitocondrial e induziu a via intrínseca de apoptose-like em murinos e células tumorais humanas resistentes à cisplatina. Os autores observaram a ativação de caspases efetoras, condensação da cromatina e degradação do DNA, sugerindo que o ciclopáddado C7a ativa a apoptose-like células de melanoma murino.

Figura 21 a/b. Porcentagem de células de *L. (L.) amazonensis* vivas, necróticas e apoptóticas-like após incorporação de brometo de etídeo e laranja de acridina (BE/LA). O marcadores nucleares fluorescentes BE/LA são utilizado para distinguir células apoptóticas-like de células necróticas, após 6 e 48 h de tratamento com **CP2**, CPT, NAC e DMSO ($p < 0,01$).



Fonte: Velásquez, A.M.A, comunicação pessoal.

Arruda, et al., (2015), demonstraram que o ciclopáddado 7a ($[\text{Pd}_2(\text{S}(\text{C}_2\text{N-DMPA})_2(m\text{-DPPE})]\text{Cl}_2$) inibiu o crescimento *in vitro* de *Paracoccidioides lutzii* e *Paracoccidioides brasiliensis*. O composto 7a foi capaz de induzir apoptose e autofagia em *P. brasiliensis*. As células incubadas com o composto 7a mostraram condensação de cromatina, degradação de DNA, produção de ânion superóxido e aumento da atividade de metacaspase sugestiva de apoptose-like. Os mecanismos de morte relacionados à autofagia foram sugeridos pelo aumento do número de vacúolos autofágicos e acidificação.

Ruiz, et al., (2008) demonstraram que os ciclopáddados são capazes de induzir apoptose em células tumorais HL-60. Matsuo et al., (2010) estudando ciclopáddados verificaram que o ciclopáddado $[\text{Pd}_2(\text{S}(\text{C}_2\text{N-DMPA})_2(m\text{-DPPE})]\text{Cl}_2$ foi 340 vezes mais citotóxico para as células de *T. cruzi* quando comparada com células de mamíferos, sendo mais eficaz do que o benznidazol em todos os experimentos *in vitro* e *in vivo* conduzidos pelos autores. O complexo ciclopáddato exerceu uma morte semelhante à apoptose-like em formas tripomastigotas de *T. cruzi* e causou ruptura na membrana mitocôndrial visualizada pela microscopia eletrônica.

No estudo avaliando a eficácia do tratamento *in vivo* de **CP2** frente à camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, conduzido por Velásquez, et al., (2017), os autores verificaram que ao longo do desenvolvimento da lesão (na pata direita traseira dos camundongos) era possível identificar características de processos inflamatórios no local. O processo de morte celular por necrose é caracterizado por geração de processos inflamatórios, dessa forma pode-se sugerir que o aumento do número de células necróticas após 48 h de tratamento com **CP2** observado por Velásquez et al., (2018), manuscrito em preparação, pode ter relação com este efeito observado pelos autores em 2017.

Para a total caracterização de eventos celulares associados à MCP é necessário descobrir os alvos celulares, que possam ser explorados nestes parasitos. Dessa forma, se o mecanismo molecular da cascata de MCP em *Leishmania* for elucidado, este mecanismo pode fornecer oportunidades para a descoberta e avaliação de novos alvos moleculares para o desenho de drogas que possam ser exploradas para o desenvolvimento terapêutico contra leishmaniose.

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-divisao-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 ciclopaladados 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.

ANEXO I

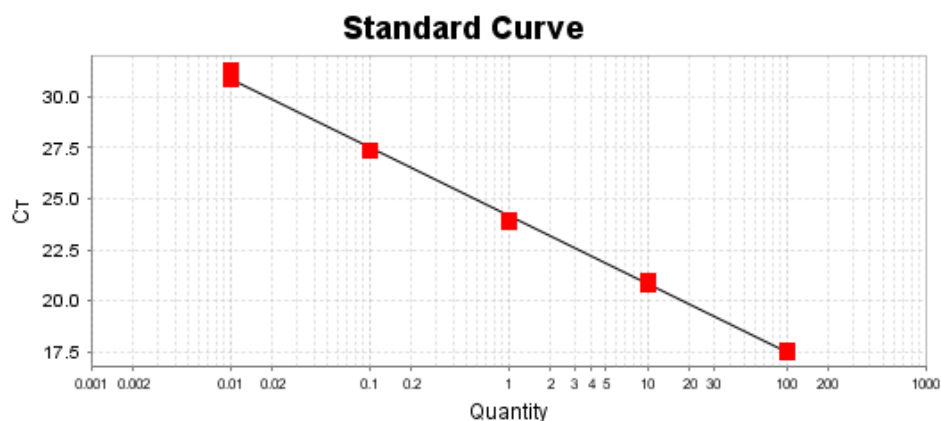
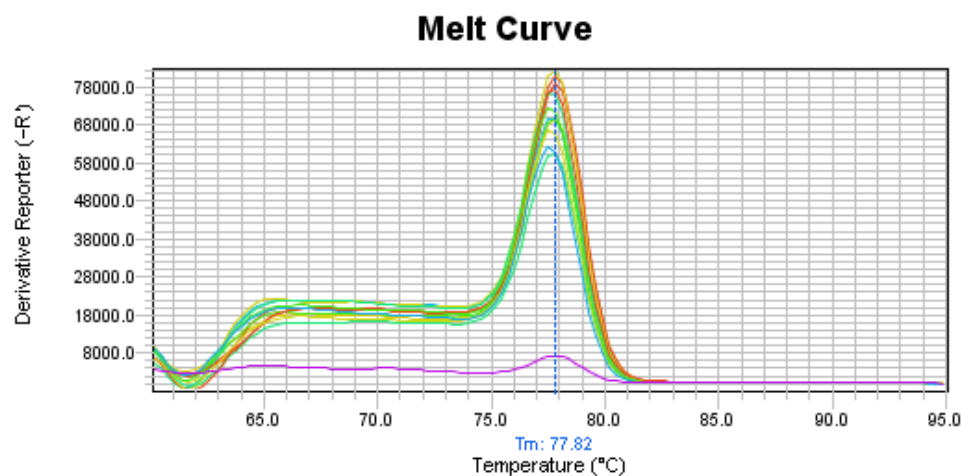
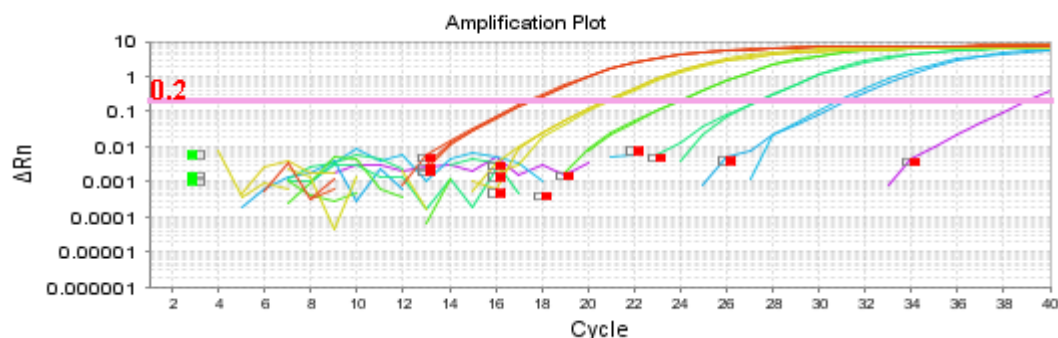
Tabela A1. Valores de eficiência dos oligonucleotídeos utilizados para a quantificação por PCR em tempo real dos genes selecionados após a exposição de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* ao composto ciclopaladado **CP2**.

Gene	Sequência 5' - 3'	Referência	Eficiência
kDNA	F: CCTATTTTACACCAACCCCCAGT R: GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA	Velásquez, (2017)	98,052%
Triparedoxina peroxidase (Tpri)	F: GAGATTGCTCGTGACTATGG R: AGGTCATTGATCGTTGCG	Autor, (2018)	98,801%
Glucose-Regulated Protein 78 (GRP78)	F: AGATCGAGGTTGCCTTTG R: GCCCTTGTCGTTAGTGAT	Autor, (2018)	100.026%
Calreticulina	F: GCGCCAAACAATACGTACCA R: AACGACCCTTCCTGGATGTG	Velásquez , (2017)	105,016%
10 kDa Heat-Shock Protein (HSP10)	F: AGCTACAGCCGCTGGG R: GCCCTCGTTGACCTTGGC	Autor, (2018)	96,611%
Citocromo C oxidase subunidade IV	F: GACGCCGAGAAGGTTGAGAA R: CTGCACATGCTCCTCATCGA	Autor, (2018)	99,091%
Citocromo C	F: GCTGGACGTGTACCTGGAGAA R: CGGCAAACGACATCTTCG	Autor, (2018)	103,061%

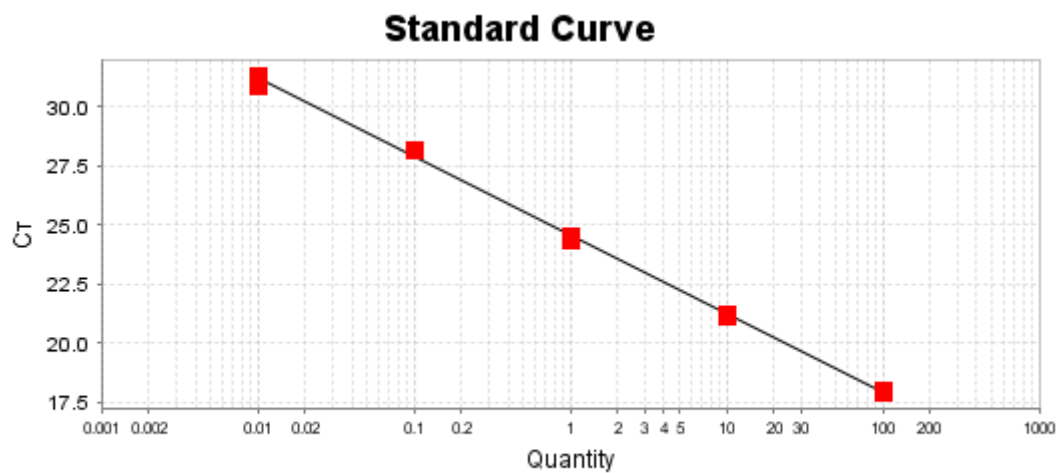
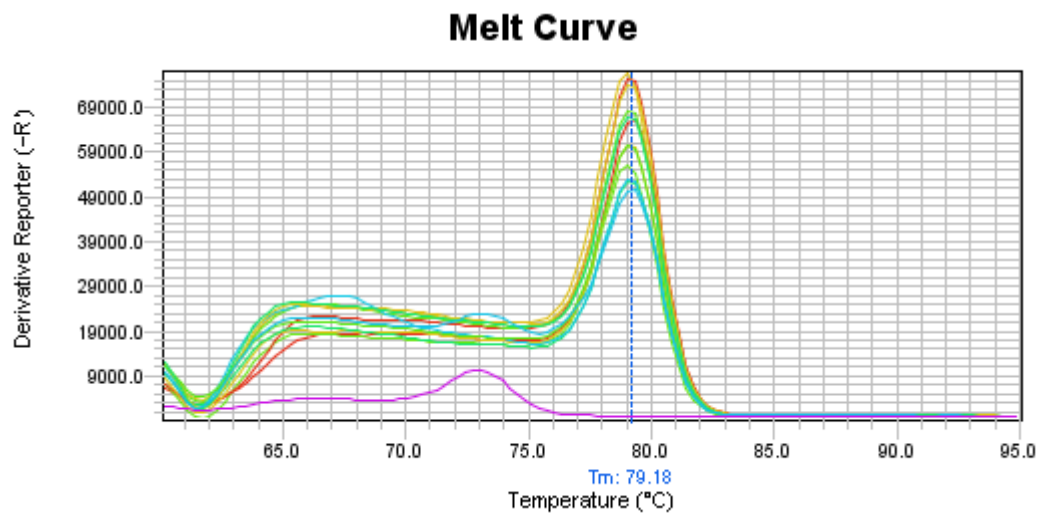
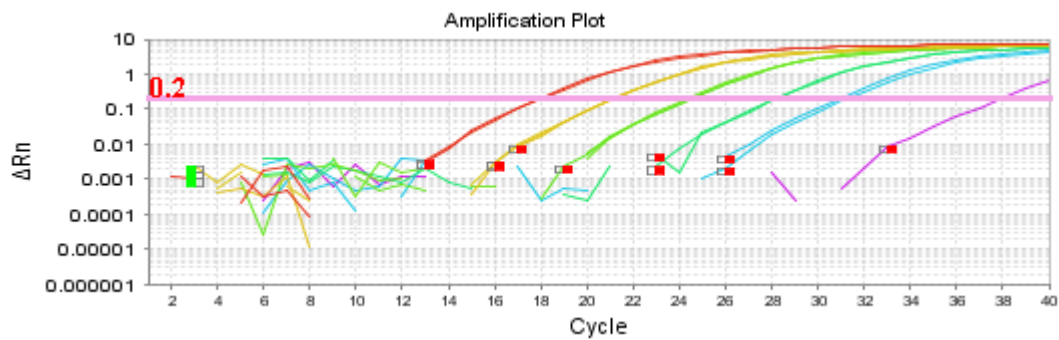
ANEXO II

Figura A1. Plotação gráfica da curva de eficiência e curva de *melting* obtidas por meio da técnica de PCR em tempo real, método $\Delta\Delta C_t$, para todos os pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes: A) Tripanotiona peroxidase (Tpri), B) GRP78, C) Calreticulina, D) HSP10, E) Citocromo C oxidase subunidade IV, e F) Citocromo C de *L. (L.) amazonensis* após exposição ao composto ciclopaladado **CP2**. NTC: mix de reação sem amostra (not treated control).

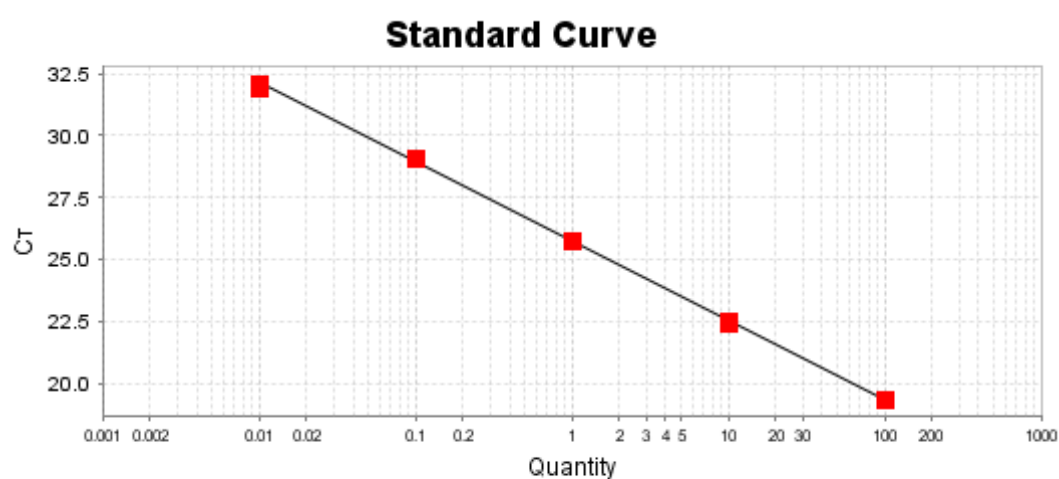
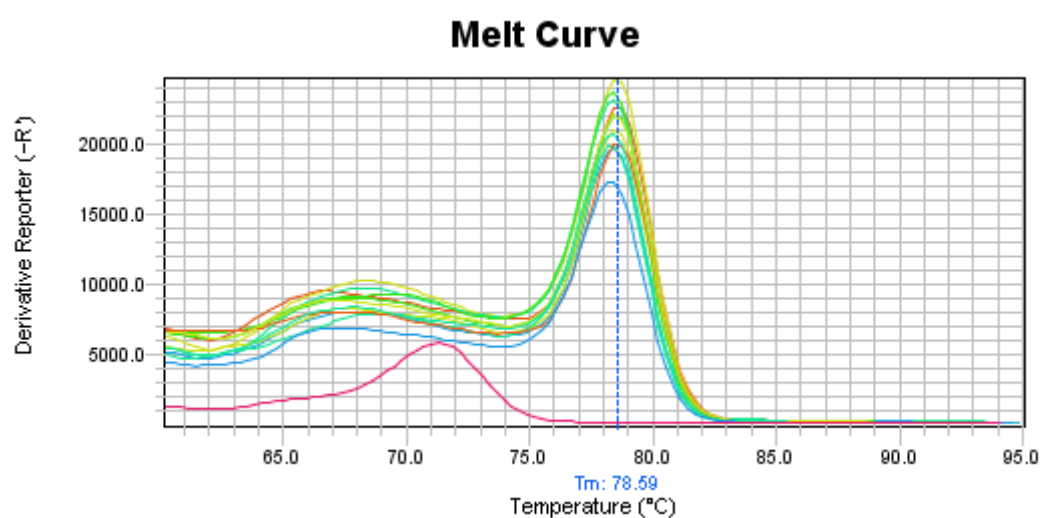
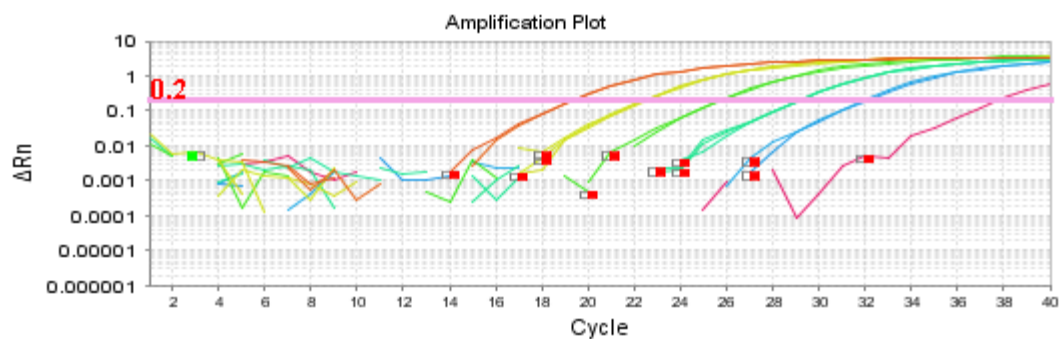
A) Tripanotiona peroxidase



Target: TRY_PEROX Slope: -3.351 Y-Inter: 24.151 R^2 : 0.999 Eff%: 98.801

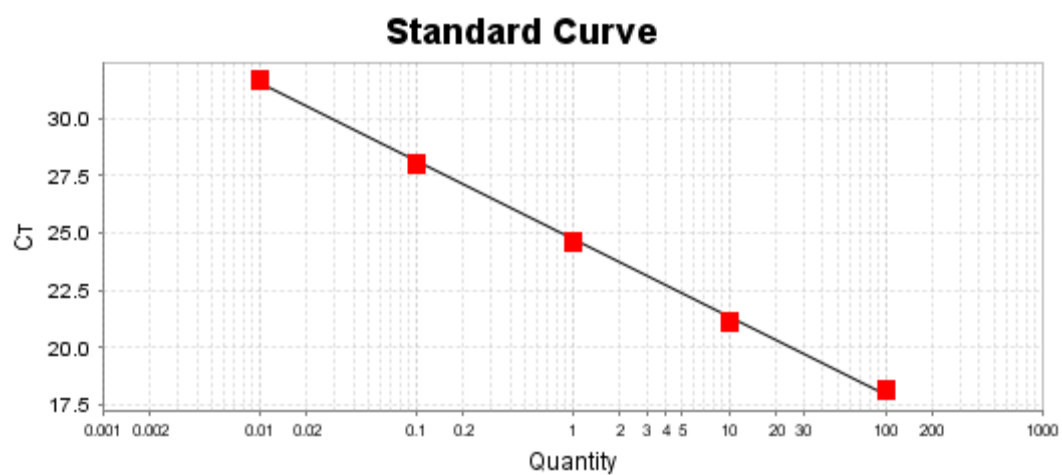
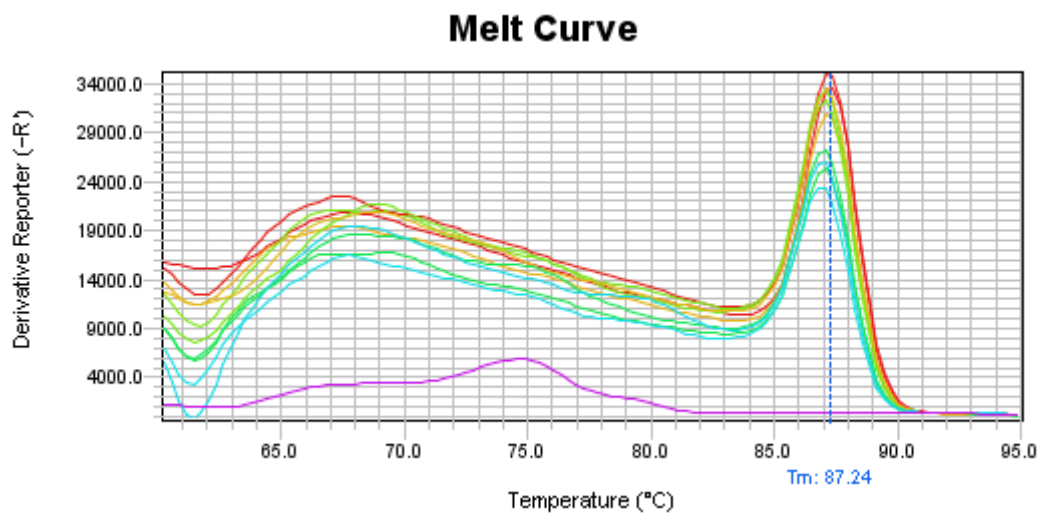
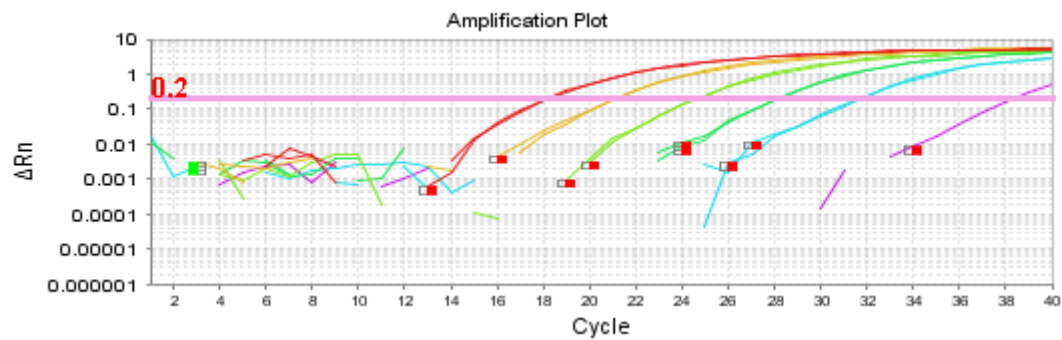
B) GRP78

Target: GRP78 Slope: -3.321 Y-Inter: 24.544 R^2 : 0.998 Eff%: 100.026

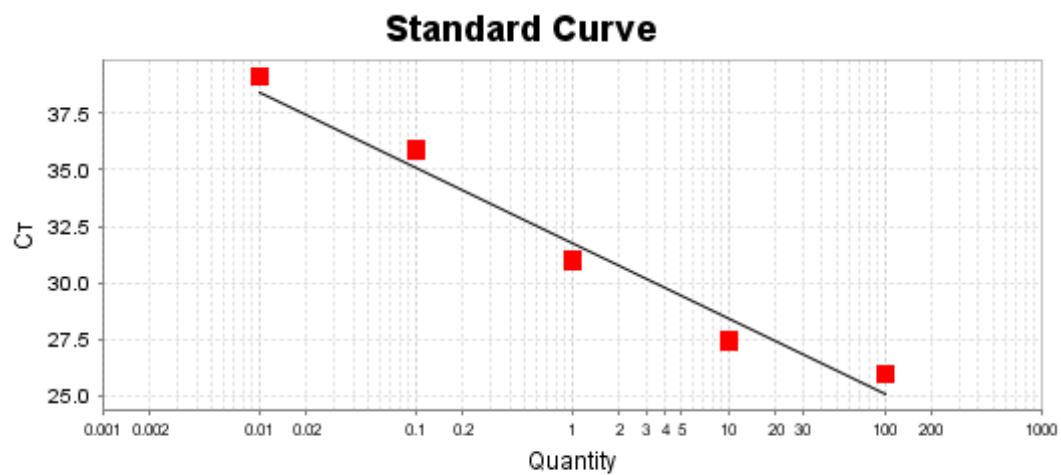
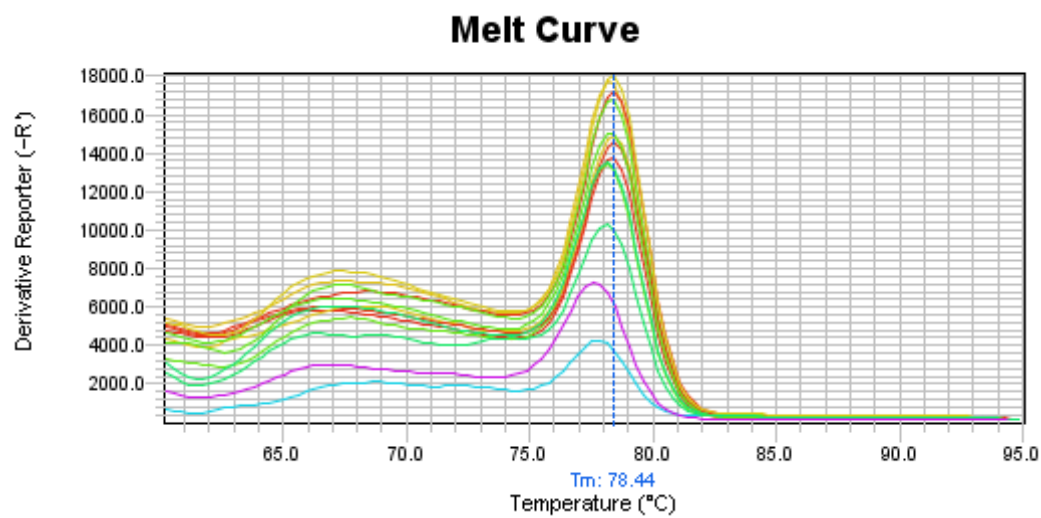
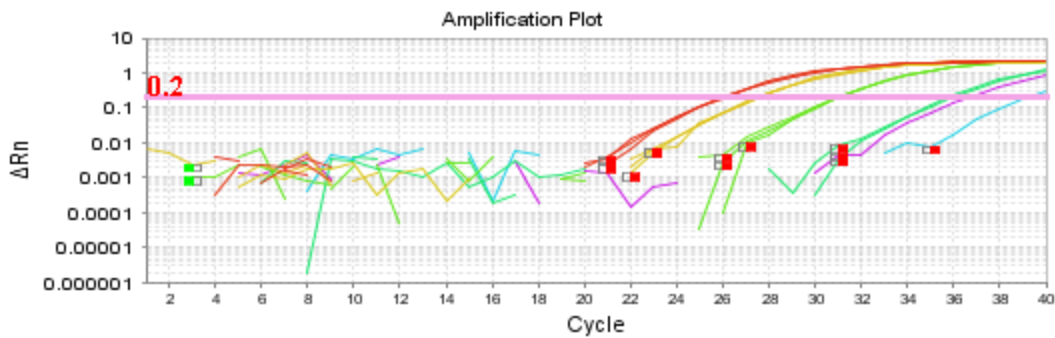
C) Calreticulina

Target: calreticulina Slope: -3.207 Y-Inter: 25.717 R^2 : 0.999 Eff%: 105.016

D) HSP10k

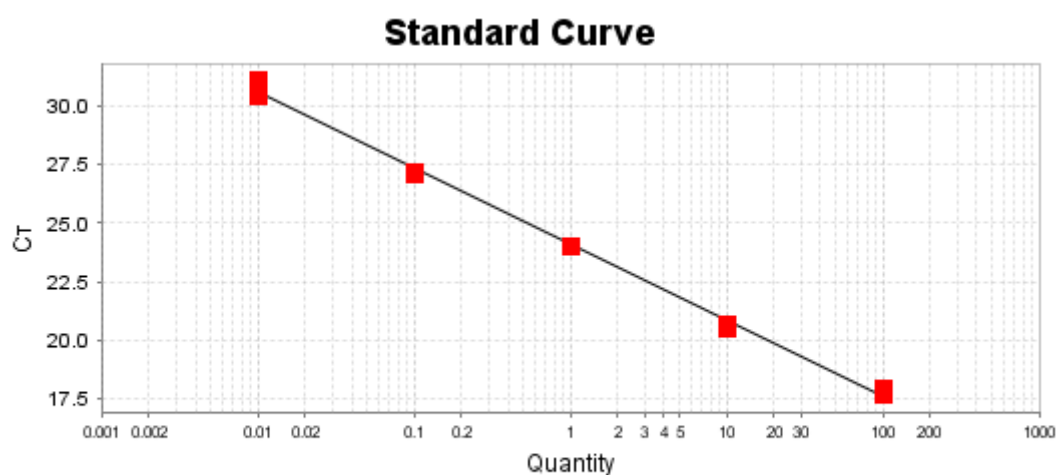
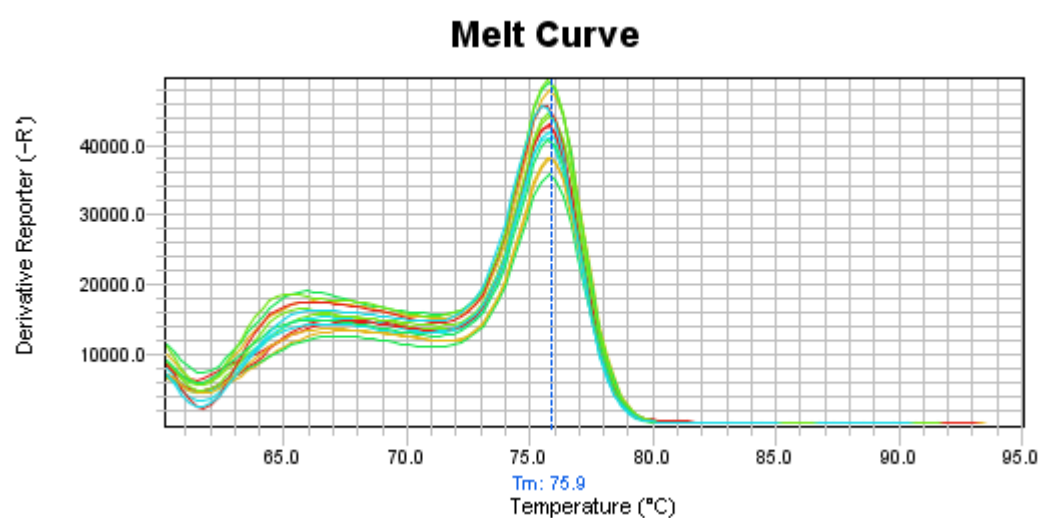
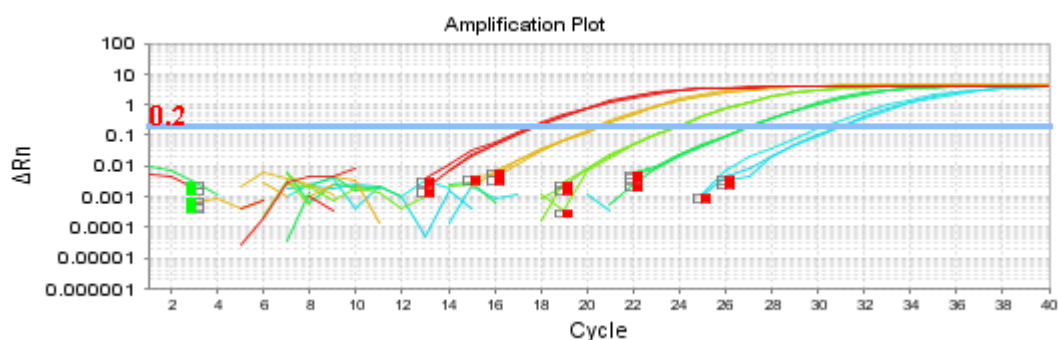


Target: HSP10Kda Slope: -3.406 Y-Inter: 24.713 R^2 : 0.999 Eff%: 96.611

E) Citocromo C oxidase subunidade IV

Target: cit_c_oxi Slope: -3.344 Y-Inter: 31.759 R^2 : 0.962 Eff%: 99.095

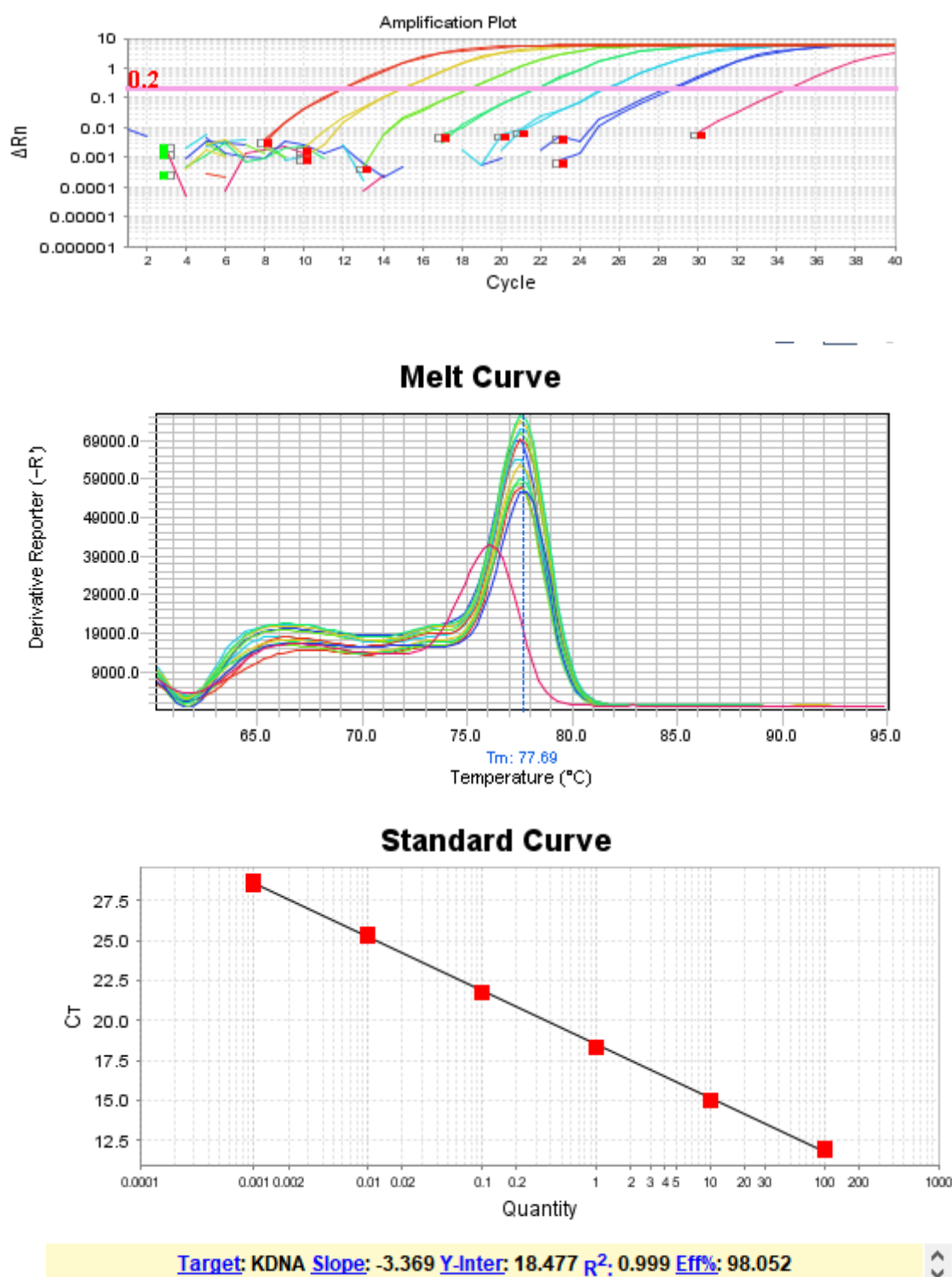
F) Citocromo C

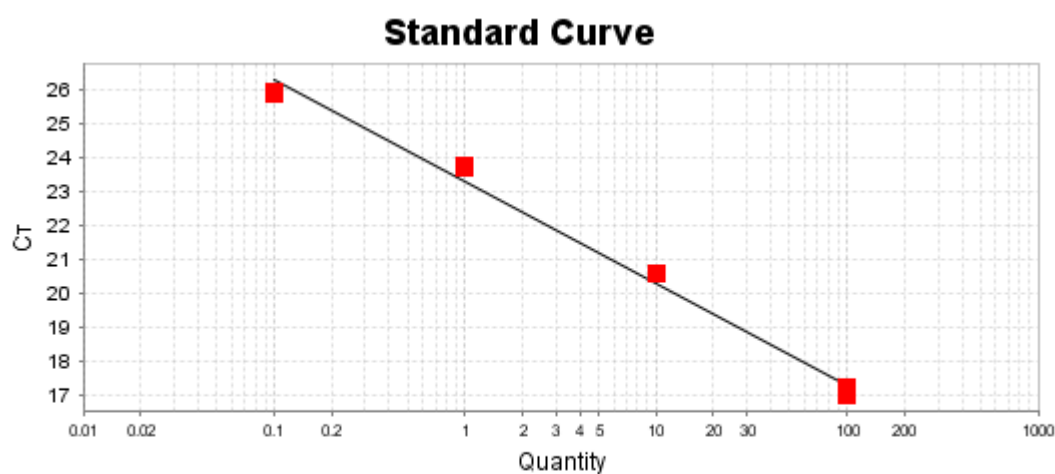
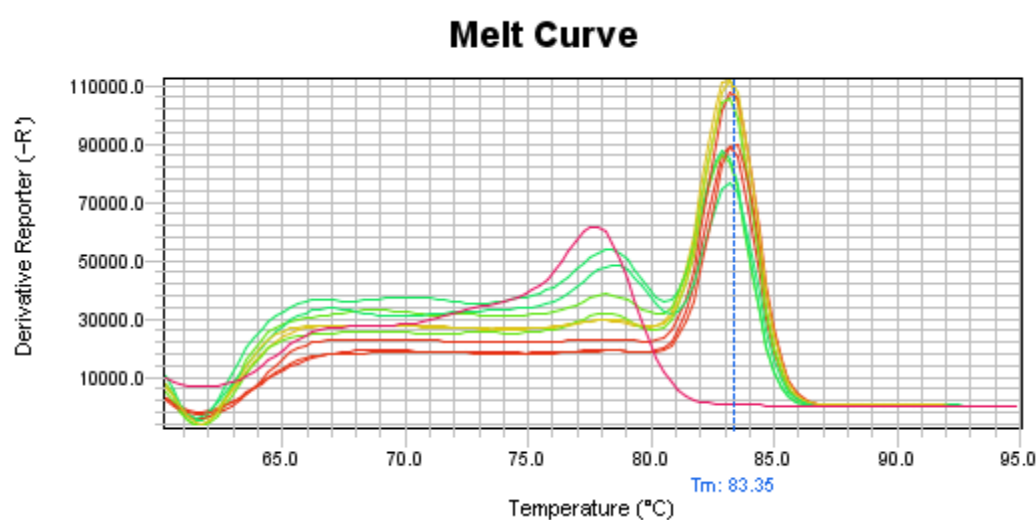
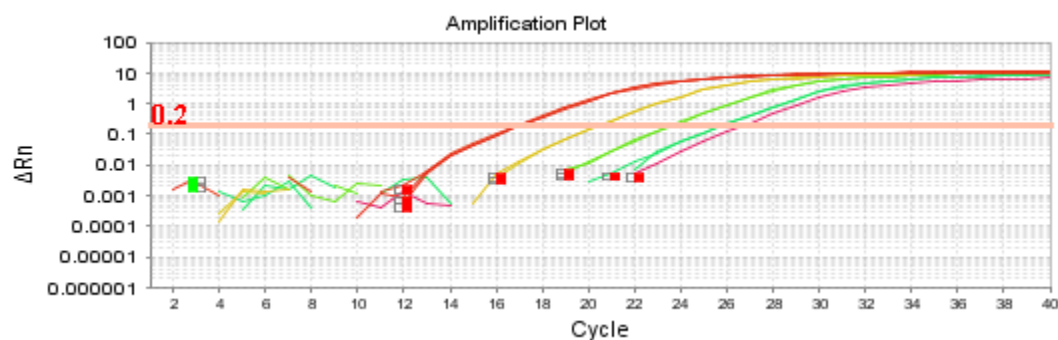


Target: cit_C Slope: -3.251 Y-Inter: 24.063 R^2 : 0.997 Eff%: 103.061

Figura A2. Plotação gráfica da curva de eficiência e curva de *melting* obtidas por meio da técnica de PCR em tempo real, método $\Delta\Delta Ct$, para todos os pares de oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos genes de referência: A) kDNA; B) GAPDH, C) 18S, D) actina, E) tubulina. O gene selecionado foi o gene kDNA, por apresentar as características ideais de curva de *melting*, eficiência, slope, e R^2 .

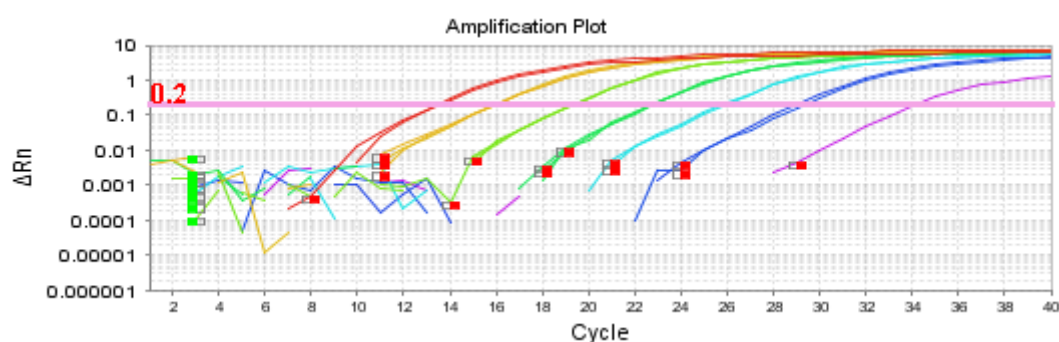
A) kDNA



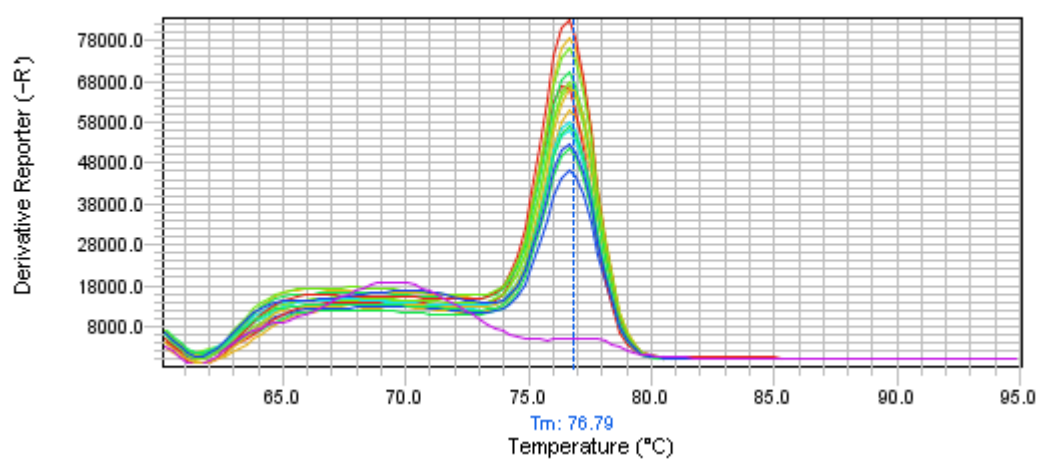
B) GAPDH

Target: GAPDH Slope: -2.992 Y-Inter: 23.3 R²: 0.991 Eff%: 115.869

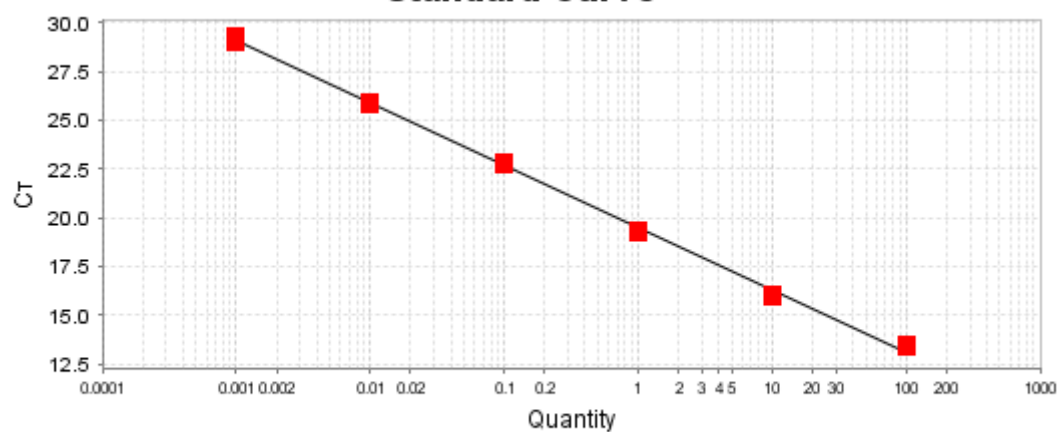
C) 18S



Melt Curve

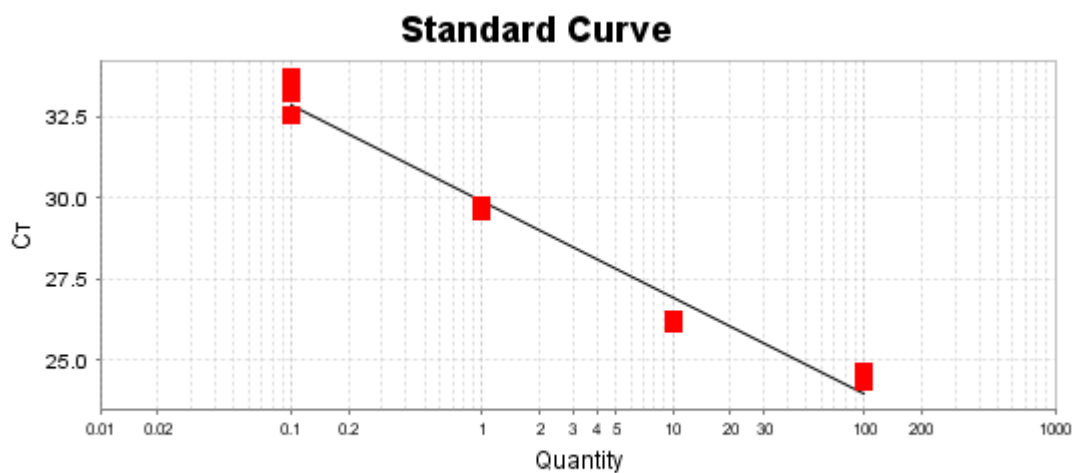
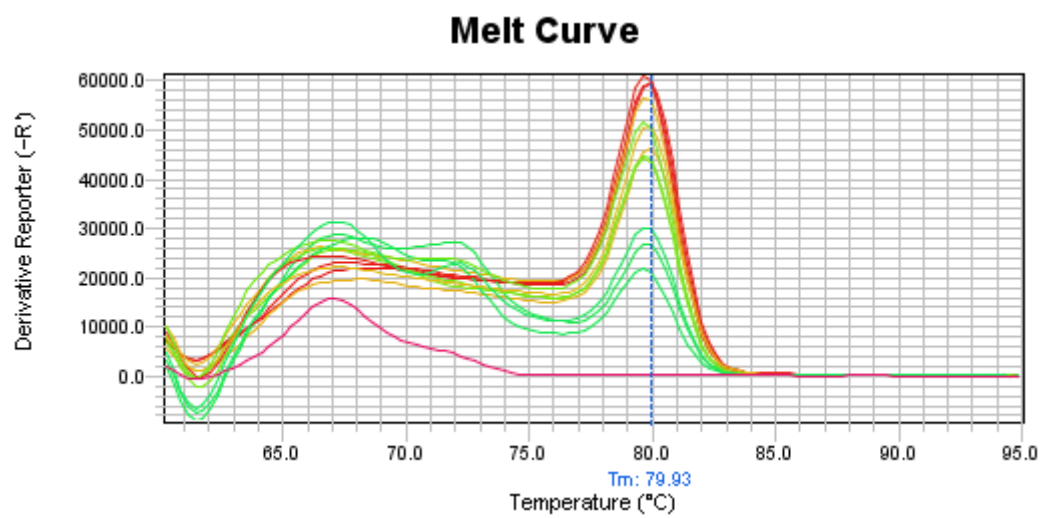
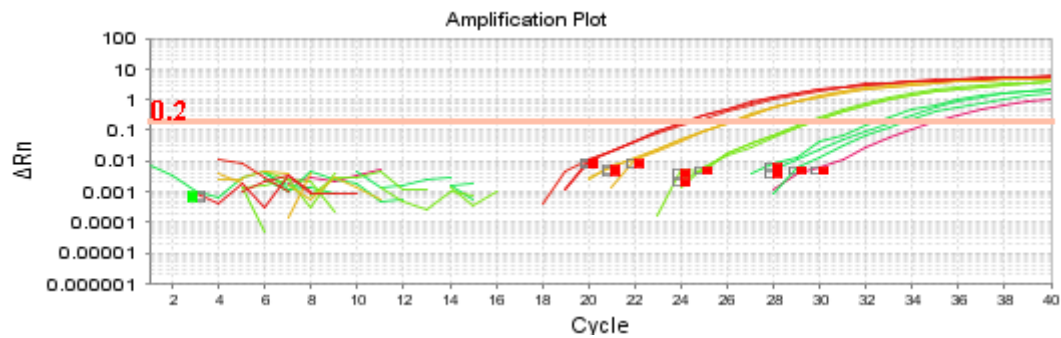


Standard Curve

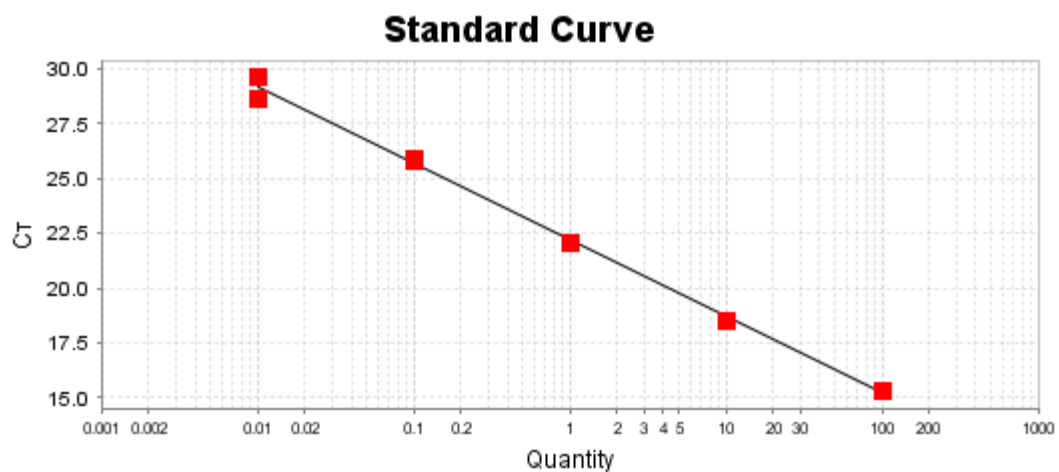
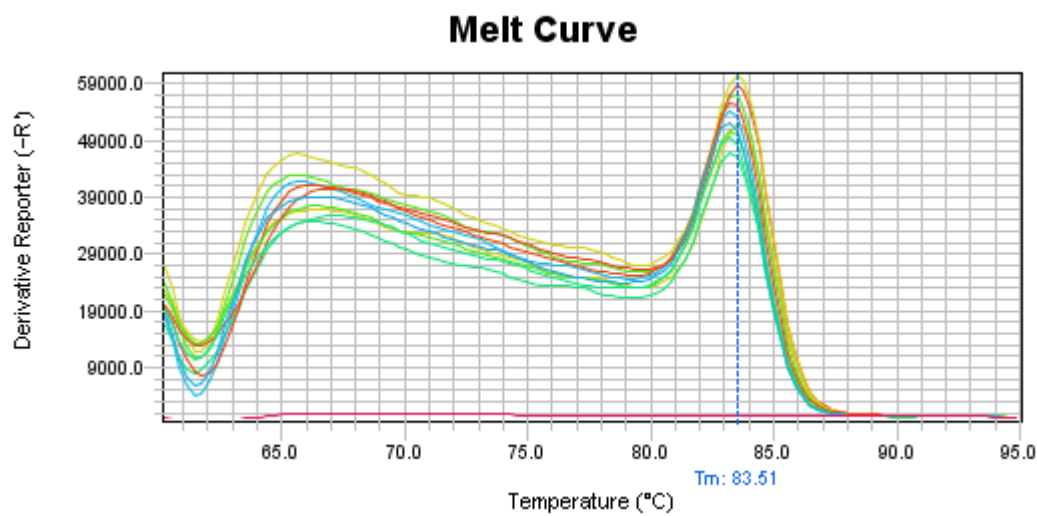
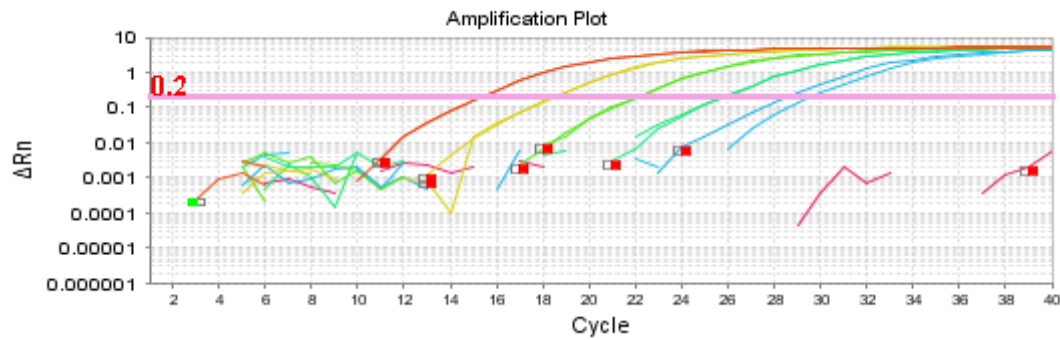


Target: 18S Slope: -3.207 Y-Inter: 19.46 R^2 : 0.998 Eff%: 105.012

D) Actina



Target: Actin Slope: -2.962 Y-Inter: 29.873 R²: 0.975 Eff%: 117.553

E) Alfa- tubulina

Target: alpha_tub Slope: -3.498 Y-Inter: 22.17 R^2 : 0.997 Eff%: 93.135