

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



Efeito de compostos ciclopaladados em formas
promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*

THAIS GABAN PASSALACQUA

Araraquara

2018

THAIS GABAN PASSALACQUA

Efeito de compostos ciclopaladados em formas
promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*

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

Orientadora: Prof. Dra. Márcia A. S. Graminha

Araraquara

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

P285e Passalacqua, Thais Gaban
Efeito de compostos ciclopalladados em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* / Thais Gaban Passalacqua. – Araraquara : [s.n.], 2018
100 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Márcia Aparecida Silva Graminha

1. Leishmaniose. 2. Paládio. 3. Enzimas. 4. Mecanismo de ação (Bioquímica). 5. Dano ao DNA. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Efeito de compostos ciclopilados em formas promastigotas e amastigotas de Leishmania infantum"

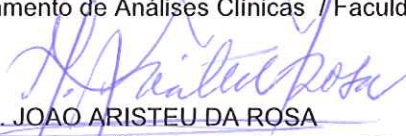
AUTORA: THAÍS GABAN PASSALACQUA

ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

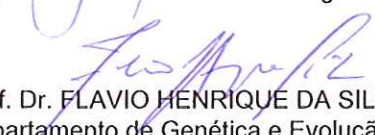
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em BIOTECNOLOGIA, pela Comissão Examinadora:



Profª. Drª. MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



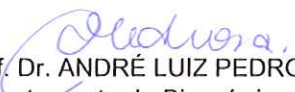
Prof. Dr. JOAO ARISTEU DA ROSA
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. FLAVIO HENRIQUE DA SILVA
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR - São Carlos



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



Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ PEDROSA
Departamento de Bioquímica, Farmacologia e Fisiologia / Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM - Uberaba

Araraquara, 06 de julho de 2018

“A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutro lugar o que ela não nos pode dar.”

Sigmund Freud

Agradecimentos

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Márcia Graminha, por todo o apoio, paciência, dedicação, por acreditar em mim incentivando-me e exigindo, mas também mostrando seu lado amigo.

Ao Prof. Dr. Cleverton , pela grande ajuda nos ensaios histopatológicos, dedicando dias inteiros à análise das lâminas dos órgãos coletados.

Ao Prof. Dr. Alessandro Desideri por me receber no laboratório da Università Tor Vergata e à técnica deste laboratório, Silvia, pela ajuda prestada durante a minha estada em Roma.

À Isabel Martinez, pela grande ajuda e os ensinamentos prestados no laboratório.

A todos os meus colegas de laboratório, os que ainda estão presentes e os que já fizeram parte da nossa equipe, pelo incentivo e ajuda em todos os momentos.

À agência financiadora CAPES, por financiar minha pesquisa, tanto no Brasil quanto em Roma, à FAPESP, CNPq e MCT-ProAntar, pelos equipamentos e consumíveis adquiridos.

À seção de pós-graduação por toda atenção e gentileza que sempre demonstraram.

A Deus, por tudo que representa em nossas vidas, pela força e pelas pessoas que colocou no meu caminho para concretizar esse trabalho.

Aos meus pais, Armando e Elisabete, por terem me ajudado a ser quem eu sou hoje, por estarem sempre ao meu lado, por toda compreensão, orientação, amizade e amor. Sinto-me orgulhosa e privilegiada por ter pais tão especiais.

Às minhas irmãs, Carol e Mariana, meu cunhado Osvaldo, juntamente com a minha prima-irmã, Maria Lívia, que sempre me deram apoio e carinho em todos os momentos compartilhados, por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus sobrinhos, Arthur, Heitor, Ângelo e Álvaro por trazerem imensa felicidade ao meu mundo.

Aos meus avós, Antonio e Maria, pelo amor, apoio e confiança que sempre depositaram em mim. À minha querida “vozinha”, Maria Lídia (*in memoriam*), porque existem pessoas que não esquecemos nunca.

Aos amigos Maicon e Ana e o grupo Jack Tequila por todos os anos de convivência dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos amigos Mayara, Fábio, Letícia, Leandro, Aline, Amanda, Rhayanne, Camila, Luís, Daphne, por estarem sempre ao meu lado nos bons e maus momentos, dando-me força e apoio, principalmente durante os experimentos *in vivo*. E a amiga Kely por toda a ajuda prestada durante a finalização do projeto me auxiliando nos experimentos de qPCR.

Aos amigos que fiz durante meus estudos em Roma, especialmente Maira e sua família que tão gentilmente me receberam em sua casa; Gislei e Larissa, pelo companheirismo durante o tempo que moramos juntas; Ronaldo pelo apoio e parceria durante minha estada em Roma; Jaqueline e sua família, pelas conversas e os cafezinhos da tarde, momentos únicos e especiais.

Resumo

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas pela picada da fêmea infectada do inseto flebotomíneo. Segundo a Organização Mundial da Saúde, as leishmanioses estão distribuídas em áreas tropicais e subtropicais e são encontradas em 98 países da Europa, África, Ásia e América. São estimados 700 a um milhão de novos casos com 20 a 30 mil mortes anuais. A quimioterapia das leishmanioses é deficiente, tóxica e se baseia no uso de compostos antimoniais pentavalentes desenvolvidos na década de 40, os quais são tóxicos e apresentam ineficácia devido ao desenvolvimento de cepas resistentes. Desta forma, a busca por novos compostos antileishmaniais é importante. Pensando nisso, uma série de compostos ciclopaladados foram avaliados quanto ao seu potencial leishmanicida. Em ensaios *in vitro*, o composto **CP2**, cuja eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea foi demonstrada pelo nosso grupo de pesquisa, apresentou atividade antipromastigota e amastigota de *L. (L.) infantum*, espécie causadora da leishmaniose visceral. O tratamento *in vivo* demonstrou a eficácia na diminuição da carga parasitária no fígado e baço (50%), sendo superior à anfotericina B. Adicionalmente, **CP2** não apresentou efeitos tóxicos como revelado pelos marcadores bioquímicos ALP, AST, ALT e creatinina. Para tentar entender os possíveis mecanismos de ação de outro composto ciclopaladado, **CP4**, foram realizados ensaios de relaxamento utilizando a enzima topoisomerase IB de *L. (L.) donovani*, verificando-se que esse composto, também é capaz de inibir a enzima do parasito em concentrações submicromolares.

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* and are transmitted by the bite of the infected female of the insect phlebotomine. According to the World Health Organization, leishmaniasis is distributed in tropical and subtropical areas and are found in 98 countries in Europe, Africa, Asia and America. Seven hundred to one million of new cases are estimated with 20 to 30 thousand annual deaths. The chemotherapy for leishmaniasis is deficient, toxic and is based on the use of pentavalent antimony compounds developed in the 40's, which are toxic and present ineffectiveness due to the development of resistant strains. In this way, the search for new anti *Leishmania* compounds is very important. Thinking about it, a series of cyclopalladated compounds were evaluated regarding to their leishmanicidal potential. *In vitro* assays with the **CP2** compound, which efficacy in the treatment of cutaneous leishmaniasis was previously demonstrated by our research group, presented promastigote and amastigote activity against *L. (L.) infantum*, a species that causes visceral leishmaniasis. *In vivo* treatment demonstrated the efficacy in the reduction of the parasitic load in the liver and spleen (50%), being higher than amphotericin B. Additionally, **CP2** did not exhibit toxic effects as revealed by the evaluation of the biochemical markers ALP, AST, ALT and creatinine. To try to understand the possible mechanisms of action of another compound ciclopaladado, the **CP4**, relaxation tests were carried out using the enzyme topoisomerase IB of *L. (L.) donovani*. It was verified that this compound is also able to inhibit the parasite enzyme in submicromolar concentrations.

Lista de abreviaturas e siglas

a_tub	alfa tubulina
ACN	Acetonitrila
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
AnfB	Anfotericina B
AST	Aspartato aminotransferase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50% da população
CGM	Célula Gigante Multinucleada
CP1	[Pd(dmba)(μ-Cl)] ₂
CP2	[Pd(dmba)(μ-N3)] ₂
CP3	[Pd(dmba)(μ-NCO)] ₂
CP4	[Pd(dmba)Cl(isn)]
CP5	[Pd(dmba)(N3)(isn)]
CP6	[Pd(dmba)(NCO)(isn)]
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EC _{50(ama)}	Concentração Efetiva para 50% de formas amastigotas
EC _{50(pro)}	Concentração Efetiva para 50% de formas promastigotas
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Administração de Fármacos e Alimentos
GP63	Metaloprotease de Superfície
HCl	Ácido clorídrico
HSP83	Heat Shock Protein 83
IS	Índice de seletividade
LC	Leishmaniose Cutânea
LC-MS/MS	Cromatógrafo Líquido acoplado a Espectrômetro de Massas
LdTOPIB	DNA topoisomerase IB de <i>L. (L.) donovani</i>
LMC	Leishmaniose Mucocutânea

LV	Leishmaniose Visceral
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PIKK	Quinases relacionadas à fosfatidilinositol-3-quinase
PMS	Metossulfato de fenazina
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil
qPCR	PCR em tempo real ou PCR quantitativo
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
RT	Resistente
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
TOP	DNA Topoisomerase
TOPIB	DNA Topoisomerase IB

Listas de figuras

Figura 1: Distribuição mundial de leishmaniose visceral em 2015.....	20
Figura 2: Distribuição mundial de leishmaniose cutânea em 2015.....	20
Figura 3: Ocorrência das subespécies de <i>Leishmania</i>	23
Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar e visceral. A) leishmaniose cutânea, B) leishmaniose mucocutânea, C) leishmaniose cutânea difusa e D) leishmaniose visceral.....	24
Figura 5: Fêmea do inseto flebotomíneo.....	25
Figura 6: Ciclo de vida do flebotomíneo.....	26
Figura 7: As duas principais formas da <i>Leishmania</i> durante o ciclo de vida. A) forma promastigota e B) forma amastigota internalizada.....	28
Figura 8: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	29
Figura 9: microfotografia de amostra de aspirado de baço contendo formas amastigotas de <i>L. (L.) donovani</i>	31
Figura 10: Fármacos disponíveis para o tratamento das diversas formas da doença.....	32
Figura 11: Representação dos passos necessários para aprovação final de um medicamento.....	33
Figura 12: Esquema dos diferentes estágios dos processos enzimáticos de TopI e os inibidores envolvidos em cada estágio.....	39
Figura 13: estrutura química dos compostos ciclopaladados avaliados nos ensaios biológicos.....	44

Figura 14: Carga parasitária do fígado de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	58
Figura 15: Carga parasitária do baço de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	59
Figura 16: Análise toxicológica de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com o composto CP2 ou anfB.....	61
Figura 17: Análise toxicológica de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com o composto CP2 ou anfB.....	62
Figura 18: Análise toxicológica de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum</i> após tratamento com o composto CP2 ou anfB.....	63
Figura 19: infiltrados inflamatórios em corte histológico de fígado de hamsters.....	66
Figura 20: espaço urinário em corte histológico do rim de hamsters.....	68
Figura 21: curva de crescimento das formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> resistente (RT) e selvagem (WT) na presença (CP2+) ou ausência (CP2-) do composto CP2	72
Figura 22: Géis obtidos após separação de 240 µg de proteínas de <i>L. (L.) infantum</i> em <i>strips</i> de 17 cm pH 4-7 sendo: A) formas promastigotas tratadas com CP2 e B) controle.....	75
Figura 23: Quantificação dos níveis relativos de expressão do cDNA dos genes RuvB, ATR, ATM e HSP83 por PCR em tempo real de formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	79
Figura 24: Quantificação dos níveis relativos de expressão do cDNA do gene <i>TGMACK</i> por PCR em tempo real de formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	81
Figura 25: CP4 e ensaio de inibição da <i>LdTopIB</i>	83

Figura 26: Ensaio de relaxamento de DNA em função do tempo foi realizado na presença de DMSO (poços 2-5), 0,75 μ M de **CP4** (poços 6-9), 0,75 μ M de **CP4** pré-incubado por 5 min com a enzima antes da adição do DNA (poços 10-13) e **CP4** a 0,75 μ M pré-incubado por 5 min com DNA antes da adição da enzima (poços 14-17).....84

Lista de tabelas

Tabela 1: Fármacos atuais utilizados no tratamento das leishmanioses e suas características.....	35
Tabela 2: Oligonucleotídeos testados na quantificação por PCR em tempo real.....	52
Tabela 3: atividade citotóxica e leishmanicida dos compostos ciclopaladados a partir do ensaio colorimétrico do MTT e contagem em câmara de Neubauer.....	56
Tabela 4: atividade leishmanicida do composto CP2 nas formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> (L.i) selvagem (CP2-) e resistente (CP2+) a 4,0 µM do composto.....	70
Tabela 5: Spots protéicos obtidos através da separação por ensaio de eletroforese bidimensional e analisados por LC-MS/MS.....	76

Sumário

1 Introdução.....	16
2 Revisão bibliográfica.....	16
2.1 Histórico.....	16
2.2 Epidemiologia.....	18
2.3 Agente Etiológico e Classificação.....	21
2.4 Vetor.....	24
2.5 Ciclo de vida do parasito.....	26
2.6 Reservatório.....	28
2.7 Diagnóstico.....	29
2.8 Tratamento.....	30
2.9 Compostos ciclopaladados.....	35
2.10 Topoisomerases.....	36
2.11 Estresse replicativo e reparo do DNA.....	38
3 Objetivos.....	40
3.1 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	40
3.2 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i>	40
3.3 Mecanismos de ação.....	40
4 Material e métodos.....	42
4.1 Parasitos e Células de Mamíferos.....	42
4.2 Compostos de paládio.....	42
4.3 Animais para experimentação.....	43
4.4 Cepa resistente.....	43
4.5 Ensaio <i>in vitro</i>	44
4.5.1 Avaliação frente às formas promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i>	44
4.5.2 Determinação da citotoxicidade <i>in vitro</i> frente a macrófagos peritoneais murinos.....	44
4.5.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida dos compostos ciclopaladados contra formas amastigotas intracelulares de <i>L. (L.) infantum</i>	45

4.6 Ensaios <i>in vivo</i>	46
4.6.1 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> do composto CP2	46
4.6.2 Avaliação da carga parasitária por diluição limitante	47
4.6.3 Avaliação toxicológica	47
4.6.4 Análise histopatológica	47
4.7 Mecanismo de ação de CP2 frente a <i>L. (L.) infantum</i>	48
4.7.1 Análise proteômica	48
4.7.2 Análise proteica por eletroforese bidimensional	49
4.7.3 Coloração dos géis por Comassie Blue R-350	49
4.7.4 Análise por espectrofotometria de massa – LC-MS/MS	49
4.7.5 Validação das proteínas diferencialmente expressas por qPCR	51
4.7.6 Ensaio de relaxamento do DNA	
5 Resultados e discussão	53
5.1 CP2 é o ciclopaladado mais eficaz e seguro nos ensaios antileishmania <i>in vitro</i>	53
5.2 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> do composto CP2	55
5.3 CP2 não apresentou toxicidade para fígado e rim através da análise de ALP, ALT, AST e creatinina	58
5.4 CP2 apresentou aspecto histopatológico de baço, fígado e rim semelhante ao controle negativo, porém com resposta à infecção por <i>Leishmania</i>	63
5.5 Resistência do parasito ao composto CP2	68
5.6 Curva de crescimento da cepa resistente	70
5.7 Análise proteômica	72
5.8 Efeito inibitório na topoisomerase IB de <i>L. (L.) donovani</i>	82
6 Conclusões	84
Referências	86
Apêndice I	99
Apêndice II	100

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por mais de 20 espécies de parasitos protozoários do gênero *Leishmania* e são transmitidas pela picada da fêmea infectada da subfamília Phlebotominae (WHO, 2017). Existem três principais manifestações clínicas da doença: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (WHO, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses estão distribuídas em áreas tropicais e subtropicais e são encontradas em 98 países da Europa, África, Ásia e América. São estimados 700 a 1 milhão de novos casos com 20 a 30 mil mortes anuais (WHO, 2017). A forma cutânea (LC) da doença é mais amplamente distribuída ao redor do mundo, sendo Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria os países mais afetados, representando 75% da incidência dos casos (WHO, 2011).

Com relação à LV, 90% dos casos ocorrem com maior frequência em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, sendo estimados 300 mil novos casos anualmente, com cerca de 20 mil mortes a cada ano (WHO, 2011; WHO, 2017).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A doença conhecida pelos nomes botão do Oriente, botão de Biskra, botão de Alepo, úlcera do chiclero, úlcera de Bauru entre outros, causadora da LC e caracterizada por lesões ulcerosas na pele, teve os primeiros relatos de lesões similares em 2500 a 1500 a.C. Já a doença causadora da LV, conhecida como febre

Dum-dum, febre de Assam ou Kala-azar é caracterizada por anemia, febre intermitente, emagrecimento e inchaço de baço e fígado, causada pelo protozoário *Leishmania (Leishmania) donovani*. No século 19 houve as primeiras descrições dos sintomas clínicos da doença, que ficou mais conhecida por kala-azar ou febre negra (Kala: preto; azar: febre ou doença) (Brilhante, 2017; Bailey, 1959; Akhound, 2016; Steverding, 2017).

Foram encontradas evidências de fragmentos de DNA de *Leishmania* spp. em diversos vestígios arqueológicos: a partir de técnicas moleculares foi possível detectar, em 13 múmias do Egito e Núbia, que datavam de 2000 a.C. até 700 d.C., DNA consistente com o DNA de *L. (L.) donovani* (Zink, 2006). No deserto do Atacama, foram colocados encontraram crânios com lesões faciais características das leishmanioses, e a partir de técnicas moleculares, três dos quatro crânios analisados possuíam DNA de *Leishmania* (Costa, 2009).

Segundo Nerlich e colaboradores, Eleonora de Toledo (1522-1562), esposa de Cosimo I de Medici (membro de uma das principais famílias políticas italianas durante o Renascimento), foi infectada pelo parasito *L. (L.) infantum* e faleceu aos 40 anos de uma coinfecção com tuberculose (Nerlich, 2012).

O parasito foi primeiramente descrito por Willian Boog Leishman em 1903, a partir do esfregaço do baço de um soldado indiano, e no mesmo ano Charles Donovan confirmou os achados por Leishman a partir do baço infectado de uma criança, a espécie encontrada recebeu o nome de corpos de Leishman-Donovan. Também em 1903, Ronald Ross propôs o nome *Leishmania donovani* (Leishman, 1903; Ross, 1903). Leonard Rogers, em 1904, conseguiu cultivar o organismo e observou a forma flagelada do parasito (Pai-Dhungat, 2015). A espécie *Leishmania infantum*, também causadora da LV, foi descrita em 1908 por Charles Jules Henri

Nicolle em crianças que sofriam de hiperesplenismo (Steverding, 2017). Nicolle junto com Charles Comte observaram, no mesmo ano, a presença do parasito em cães, tornando-os um reservatório importante da LV (Steverding, 2017).

Em 1909, o brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg, confirma pela primeira vez a presença da LC nas Américas, independentemente o italiano Antonio Carini e o brasileiro Ulysses de Freitas Paranhos realizaram o mesmo achado. Em 1911 o brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna descreve o parasito *Leishmania braziliensis* espécie causadora da LC (Rezende, 2008). A primeira descrição da LV nas Américas ocorreu em 1913, pelo professor Louis Migone, no Paraguai (Rotureau, 2006).

2.2 Epidemiologia

As leishmanioses são mais comumente encontradas em áreas rurais e vilarejos do que em áreas urbanas, porém nos últimos anos a doença apresentou uma distribuição geográfica mais ampla (Dawit, 2013). A doença é um problema de saúde pública em mais de 98 países, sendo endêmica em grandes áreas dos trópicos, subtropicos e países da bacia do Mediterrâneo. Mais de 90% dos casos de LV foram reportados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão, sendo estimados 300 mil novos casos anualmente, com cerca de 20 mil mortes a cada ano (figura 1). A maior parte dos casos de LC ocorreu nos países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria, e são reportados de 700 a um milhão de novos casos a cada ano (figura 2). Somente dois continentes estão livres da doença: Austrália e Antártica (Oryan, 2016; WHO, 2015a, WHO, 2017).

Figura 1: Distribuição mundial de leishmaniose visceral em 2015 (Adaptado de WHO, 2015b)

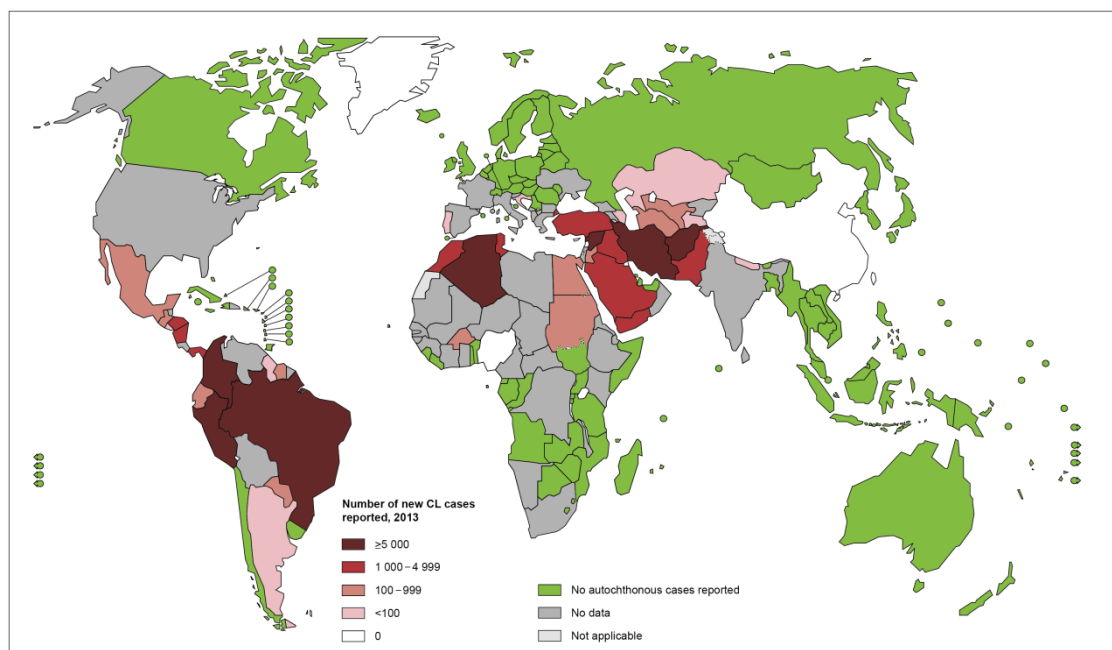
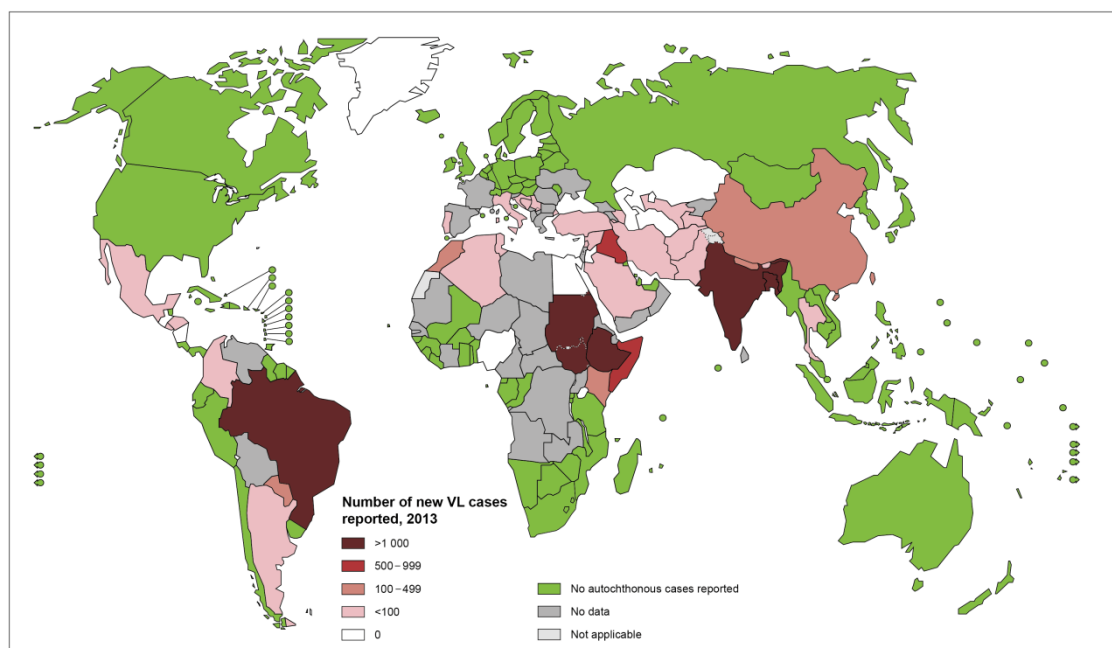


Figura 2: Distribuição mundial de leishmaniose cutânea em 2015 (Adaptado de WHO, 2015c)



Um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde em 2014, utilizando 25 países com alta incidência de leishmaniose, mostrou que 13 países apresentaram

alta carga somente para LV e 11 para LC, e o Brasil foi o único país que apresentou elevada carga para as duas espécies. No Brasil foram reportados até o ano de 2014, 3.453 casos de LV e 19.402 casos de LC (WHO, 2016).

A transmissão das leishmanioses pode ocorrer de diversas formas, como por exemplo, o compartilhamento de seringas por usuários de drogas intravenosas, por transfusão sanguínea e de forma congênita, porém os casos são muito raros, a forma mais comum de transmissão é pelo inseto vetor flebotomíneo. E a idade da população afetada pode variar de acordo com a espécie do parasito, que é endêmica na região. Por exemplo, se uma região apresenta um foco endêmico para a espécie *L. (L.) infantum*, a média de idade dos pacientes infectados é de crianças até cinco anos, já para *L. (L.) donovani* a idade varia entre 13 e 23 anos (WHO, 2010b).

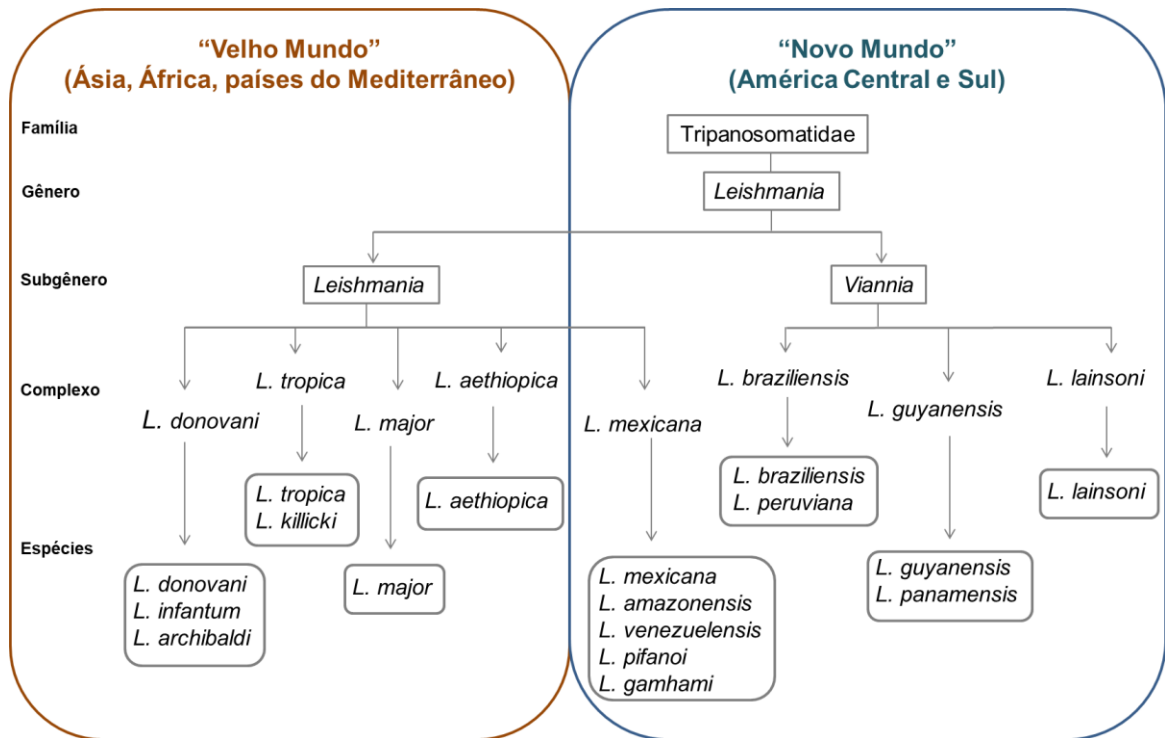
Existem vários fatores de risco que podem influenciar na epidemiologia das leishmanioses, tais como: condições socioeconômicas, em que as situações de pobreza aumentam os riscos do surgimento das leishmanioses devido à habitação em casas sem estruturas adequadas, sem condições sanitárias apropriadas e descarte de entulhos que favorecem a reprodução do inseto vetor. A má nutrição também é um dos fatores, uma alimentação deficiente em vitamina A, ferro e zinco pode aumentar os riscos de a infecção progredir para a forma mais grave da doença. Outro fator que pode influenciar o espalhamento das leishmanioses são mudanças ambientais, como a urbanização, desmatamento, construção de barragens e urbanização do ciclo de transmissão. As leishmanioses são uma doença sensível ao clima, sendo afetada por mudanças nas chuvas, temperatura e umidade, mudanças na temperatura podem afetar o ciclo de desenvolvimento do parasito no flebotomíneo, fazendo com que o inseto expanda sua área geográfica permitindo que regiões não endêmicas sejam afetadas. As mudanças climáticas podem influenciar

no surgimento de secas ou inundações levando a migração de pessoas para áreas com transmissão de leishmaniose (Okwor, 2016; Dawit, 2013, WHO, 2010b; WHO, 2017).

2.3 Agente Etiológico e Classificação

O agente etiológico dessa parasitose pertence ao gênero *Leishmania* ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Cerca de 30 espécies de *Leishmania* que infectam mamíferos estão divididas em dois subgêneros: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) de acordo com o seu desenvolvimento no inseto vetor. As espécies que se desenvolvem na porção média e anterior do tubo digestivo do flebotomíneo são consideradas do subgênero *Leishmania* e as que se desenvolvem na porção posterior do tubo digestivo são consideradas do subgênero *Viannia* (figura 3) (Antinori, 2012; WHO 2010a).

Figura 3: Ocorrência de espécies de *Leishmania* (adaptado de Boecken, 2011).

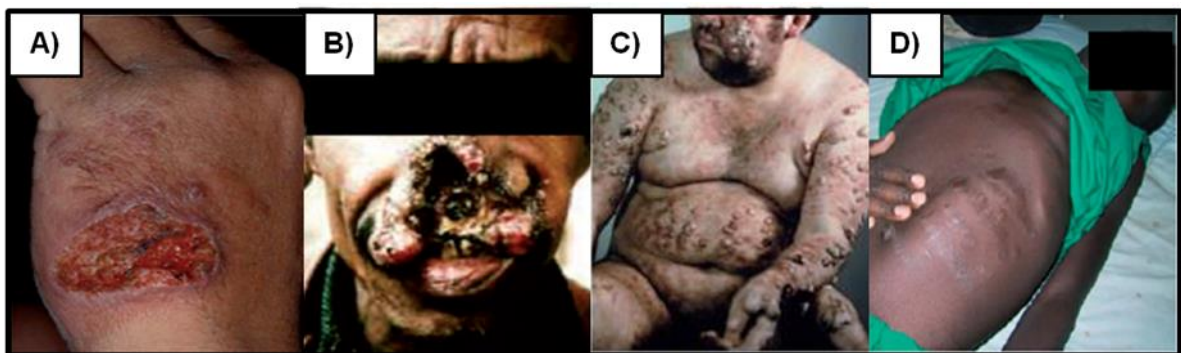


As leishmanioses apresentam diversas manifestações clínicas, e o curso de cada infecção está relacionado com fatores como a espécie do parasito, o estado imunológico e nutricional do indivíduo, pessoas imunodeprimidas, crianças e idosos são mais severamente afetados. As manifestações clínicas podem ser divididas em quatro grupos:

- leishmaniose cutânea: formas que produzem lesões exclusivamente cutâneas, com aparência ulcerativa arredondada, com borda emoldurada e fundo granuloso (figura 4A);
- leishmaniose mucocutânea: formas tegumentares que se complicam, havendo o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, palato, boca e faringe (figura 4B);

- leishmaniose cutânea difusa: formas que produzem lesões cutâneas difusas, onde as lesões aparecem em surtos periódicos, culminando com a presença de nódulos múltiplos e ricos em parasitos e que surgem tardiamente em pacientes infectados (figura 4C);
- leishmaniose visceral: formas que acometem as vísceras, apresentando tropismo pelo sistema monocítico fagocitário do baço, fígado, medula óssea e dos tecidos linfóides, causando hepatoesplenomegalia (figura 4D) (Lindoso, 2016; Stebut, 2015; WHO, 2017).

Figura 4: Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar e visceral. A) leishmaniose cutânea, B) leishmaniose mucocutânea, C) leishmaniose cutânea difusa e D) leishmaniose visceral (Adaptado de McGwire; 2014; Chappuis, 2007).



As leishmanioses geram diversos problemas para o indivíduo infectado, além dos problemas citados decorrentes de cada espécie, há também um problema social acarretado pela doença. As pessoas que sofrem com doenças tropicais negligenciadas tendem a ser estigmatizadas e discriminadas pela sociedade. Na figura 4, onde se vê as diversas manifestações clínicas das leishmanioses, as espécies de *Leishmania* que causam LC são mais amplamente distribuídas ao redor do mundo, e apesar da doença não levar à morte, causa deformidades na pele,

levando essas pessoas a serem excluídas e, afetando assim, sua condição psicossocial e sua qualidade de vida (Chahed, 2016; Hofstra, 2016).

2.4 Vetor

O flebotomíneo, representado na figura 5, é o vetor das leishmanioses e é encontrado em todas as regiões intertropicais e temperadas do mundo. O inseto pertence à ordem Díptera (derivado das palavras gregas: di=dois e ptera=asas), Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae. São insetos hematófagos que possuem de 2 a 4 mm de comprimento, são conhecidas aproximadamente 500 espécies de flebotomíneos, mas somente 30 são responsáveis por transmitir a doença. As espécies e subespécies que transmitem as leishmanioses para o homem são as pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, presentes no Velho Mundo e gênero *Lutzomyia*, presentes no Novo Mundo (Oryan, 2016; Mansueto, 2014, WHO, 2010b).

Figura 5: Fêmea do inseto flebotomíneo (Adaptado de Alten, 2015)

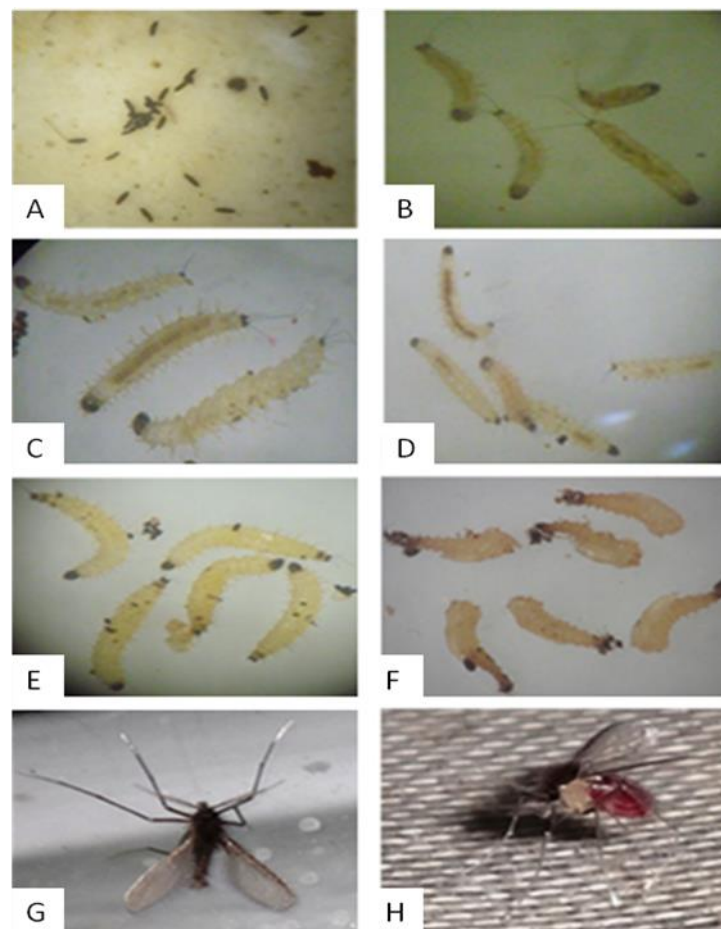


Diferentemente de outros insetos da ordem Díptera, os flebotomíneos não se reproduzem em ambientes aquáticos, mas sim em ambientes terrestres ricos em matéria orgânica, calor e umidade, como por exemplo, buracos de roedores, lixo

doméstico, fissuras nas paredes das casas, onde as larvas encontram o necessário para o seu desenvolvimento. (WHO, 2014a, Oryan, 2016).

O ciclo de vida dos flebotomíneos está representado na figura 6, sendo possível observar as quatro fases pelas quais o inseto passa desde o ovo (figura 6A) até tornar-se adulto (figura 6G e 6H). O tempo de cada fase pode variar de acordo com a temperatura, fazendo com que aumente em temperaturas frias ou diminua em temperaturas mais quentes. Os ovos levam de 7-10 dias para eclodirem, a fase larval dura em média três semanas e o adulto emerge da pupa após 10 dias. Portanto, levam-se aproximadamente cinco semanas para que ocorra o desenvolvimento completo do ovo em um inseto adulto (Chowdhury, 2016; WHO, 2010b).

Figura 6: Ciclo de vida do flebotomíneo (adaptado de Chowdhury, 2016)

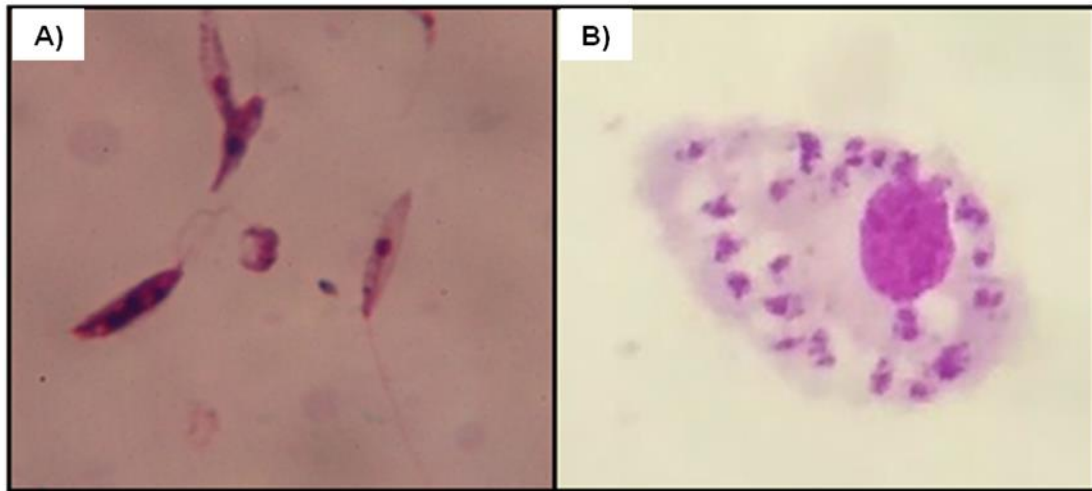


As fêmeas dos flebotomíneos, que são as responsáveis pela transmissão da doença, sugam o sangue dos mamíferos hospedeiros no intuito de obter proteínas necessárias para o desenvolvimento dos seus ovos. Quando o repasto sanguíneo é feito em um hospedeiro infectado o inseto ingere o sangue contendo as formas do parasito e se infecta. A transformação do parasito dentro do vetor dura entre 4 e 25 dias (Dawit, 2013; WHO, 2014b).

2.5 Ciclo de vida do parasito

A *Leishmania* possui duas principais formas durante o ciclo de vida: a forma promastigota (15-20 μm), presente no inseto vetor, e a forma amastigota (3-5 μm), encontrada no hospedeiro mamífero (figura 7). A forma encontrada no vetor é alongada, possui um flagelo externalizado e é adaptada para sobreviver extracelularmente dentro do flebotomíneo. Já a forma amastigota é arredondada, seu flagelo está internalizado e é a forma intracelular capaz de sobreviver dentro de macrófagos dos hospedeiros (Gluenz, 2010). O ciclo se desenvolve no vetor quando uma fêmea do flebotomíneo faz o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado e ingere sangue contendo macrófagos infectados com as formas amastigotas. No intestino médio do inseto, essas formas são liberadas e, a partir de mudanças na temperatura e no pH, as amastigotas sofrem uma transformação morfológica e se desenvolvem nas formas promastigotas procíclicas e começam a se dividir (Dostálová, 2012). As formas promastigotas procíclicas não são infectivas e, através de um processo denominado metaciclogênese, essas formas começam a se dividir e adquirir virulência, em seguida são diferenciadas em promastigotas metacíclicas, as quais se tornam infectivas, perdem a capacidade de divisão e migram para as glândulas salivares do inseto (Assche, 2011).

Figura 7: As duas principais formas da *Leishmania* durante o ciclo de vida. A) forma promastigota e B) forma amastigota internalizada. (Fonte: elaborado pelo autor)



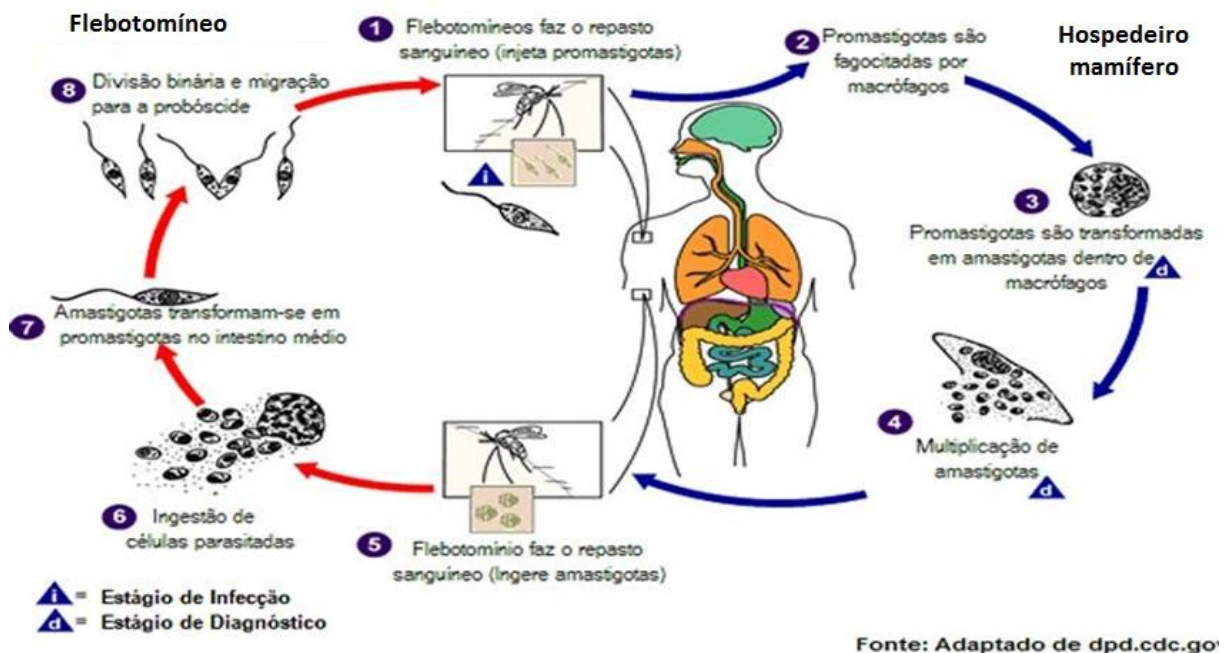
Quando uma fêmea infectada do flebotomíneo faz o repasto sanguíneo, ela regurgita, na pele do hospedeiro vertebrado, formas promastigotas metacíclicas, junto com fatores imunomoduladores e vários componentes salivares. A picada do inseto desencadeia o recrutamento de neutrófilos, monócitos e macrófagos à região (Borghi, 2017; Beattie, 2011).

Uma vez dentro do hospedeiro mamífero, o parasito não conseguiria sobreviver, sem desenvolver estratégias para escapar do sistema imune do hospedeiro. Portanto, o parasito precisa se adaptar rapidamente ao ambiente hostil no qual ele se encontra (Soulat, 2017). Para isso, utiliza várias proteínas de superfície como o lipofosfoglicano, proteofosfoglicano, glicosilinositol, gp63, conhecidas como fatores de virulência, para inibir o sistema de defesa do macrófago (Isnard, 2012, Andargie, 2015).

As formas promastigotas metacíclicas interagem com células fagocitárias, principalmente os macrófagos, e são por eles fagocitadas. Dentro dos vacúolos fagocíticos, os promastigotas diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se. Após

extensa multiplicação do protozoário, a célula parasitada rompe-se e os parasitos liberados são fagocitados por outros macrófagos (Assche, 2011; Desjeux, 1996).

Figura 8: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*



2.6 Reservatório

São consideradas reservatórios as espécies de mamíferos responsáveis por manter o parasito na natureza (Roque, 2014). Muitos mamíferos são considerados reservatórios das leishmanioses, podendo ser animais selvagens como preguiças, marsupiais, canídeos silvestres, entre outros, ou domésticos como o cachorro. Sendo esse último o principal reservatório da doença por três fatores, são animais que apresentam alto parasitismo na pele, favorecendo a transmissão para o vetor, por causa da proximidade entre eles e os humanos e, por último, casos da doença nos cães, normalmente precedem casos da doença humana (Dantas-Torres, 2007; Garcia, 2017).

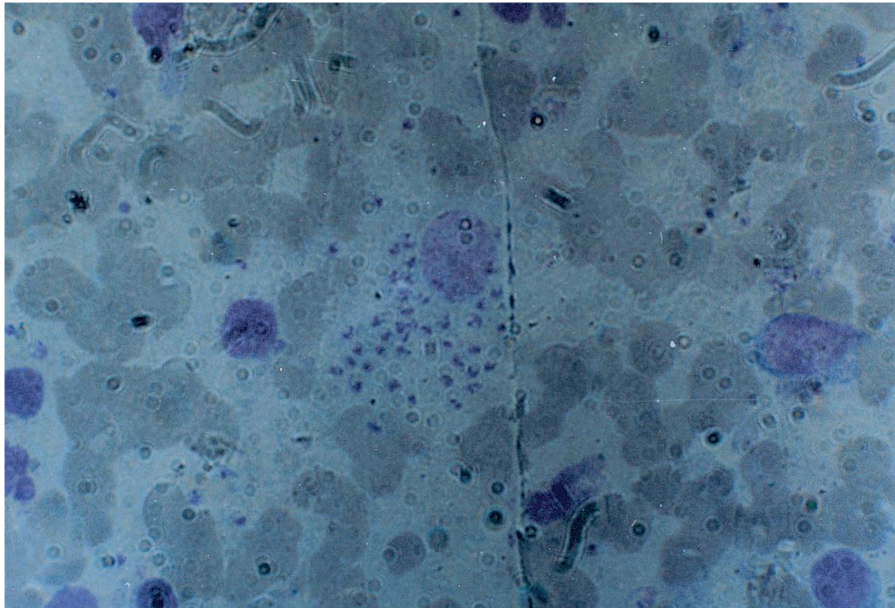
Os reservatórios podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania*. Por exemplo, no ambiente silvestre as raposas e os marsupiais são os principais reservatórios da LV, enquanto no ambiente domiciliar são os cães. Para LC, os reservatórios variam entre marsupiais, roedores e preguiças. Foram encontrados, também, equinos e mulas infectados com a espécie *L. braziliensis*, além de alguns tipos de roedores (Cardoso, 2015; Gonzalez, 2015; Harhay, 2011).

2.7 Diagnóstico

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para o diagnóstico das leishmanioses, como por exemplo, exame direto, isolamento em meio de cultura, DAT, ELISA, PCR entre outros, e apesar da quantidade de testes que podem ser empregados para diagnosticar a doença, ainda é uma tarefa extremamente complexa, uma vez que várias dificuldades podem ser encontradas (Akhoundi, 2017).

Para o diagnóstico de LV, um dos métodos utilizados é, a partir do aspirado de medula óssea ou baço, detectar formas amastigotas do parasito (figura 9), porém esse tipo de teste é muito invasivo. No caso do aspirado de medula óssea, a sensibilidade do teste varia entre 60% a 85%, já para o aspirado de baço a sensibilidade sobe para 93%, mas há um sério risco de se causar hemorragia fatal (Elmahallawy, 2014). A técnica de cultura *in vitro* de parasitos, utilizando as mesmas amostras, pode melhorar a sensibilidade do teste, mas para isso exige um longo tempo e um laboratório específico para o cultivo em meio de cultura (Garcia, 2017). Para LC também se usa o diagnóstico microscópico a partir do aspirado da lesão, raspagem ou biópsia. Porém o teste também é invasivo e pode ser variável, além de possuir baixa sensibilidade (Seyyedtabaei, 2017).

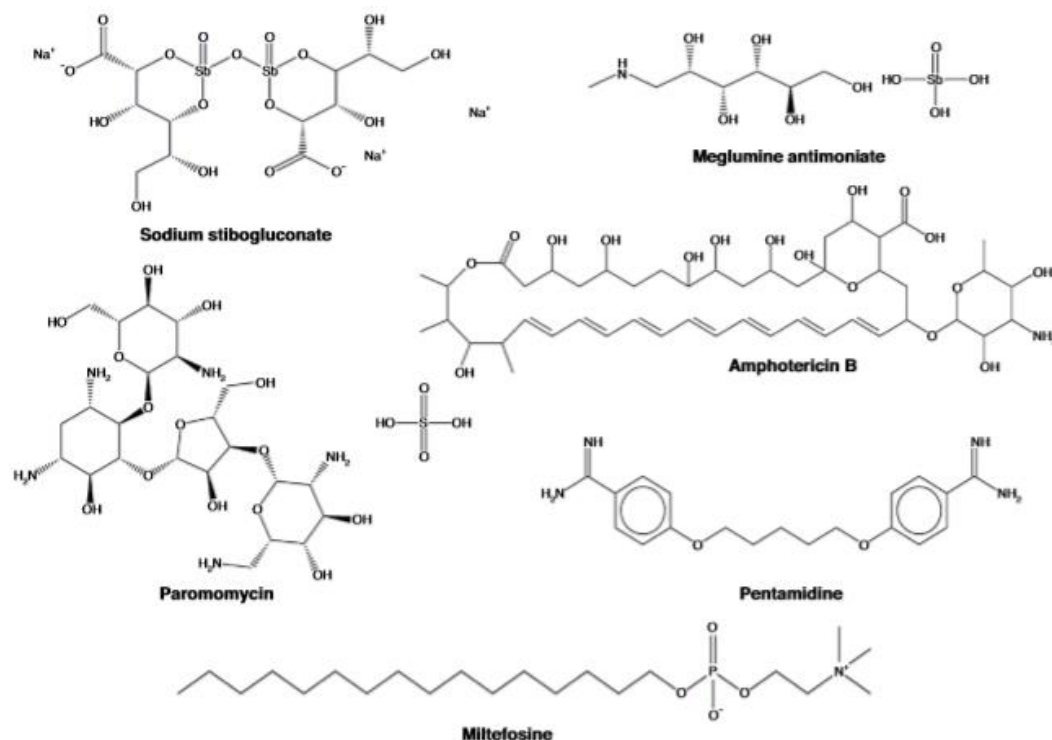
Figura 9: microfotografia de amostra de aspirado de baço contendo formas amastigotas de *L. (L.) donovani* (Sundar, 2002).



2.8 Tratamento

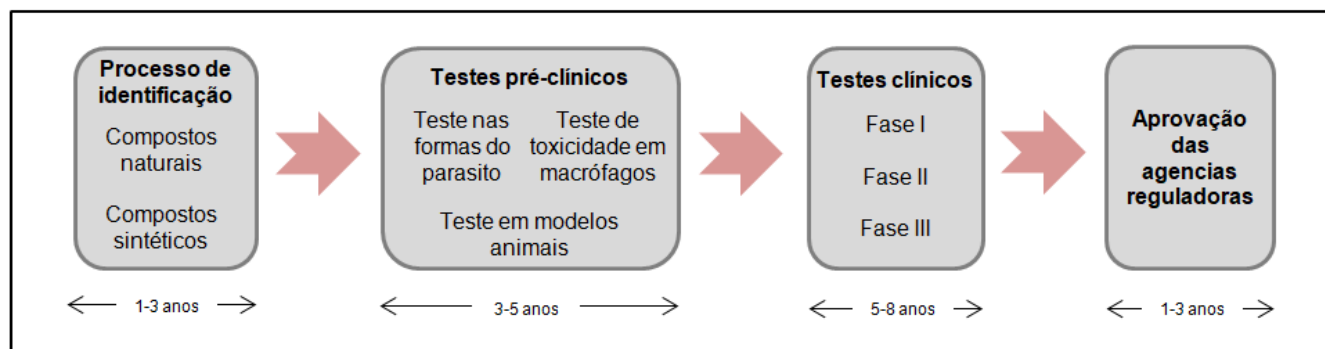
Mesmo com a disponibilidade de alguns medicamentos (figura 10), a busca por um fármaco ideal para o tratamento das leishmanioses ainda continua. Porém existe um longo caminho a ser percorrido até as agências reguladoras liberarem um fármaco. Esse processo pode levar de 15 a 17 anos e é altamente custoso (figura 11).

Figura 10: Fármacos disponíveis para o tratamento das diversas formas da doença (adaptado de Zulfiqar, 2017).



O primeiro passo consiste em identificar os compostos, em seguida são realizados testes pré-clínicos *in vitro* utilizando as formas do parasito e testes de toxicidade desses compostos, bem como testes *in vivo* em modelos animais. No próximo passo são realizados os testes clínicos, que envolvem seres humanos saudáveis ou não em três fases distintas e que pode durar até oito anos. Por último ocorre a aprovação desse composto pelas agências reguladoras, o que pode levar até três anos para acontecer (Ennes-Vidal, 2017).

Figura 11: Representação dos passos necessários para aprovação final de um medicamento (adaptado de Ennes-Vidal, 2017).



O tratamento das leishmanioses é um grande desafio por diversos fatores, não há investimento suficiente em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para a doença, o tratamento apresenta eficácia variada influenciada pelas diferentes cepas de *Leishmania* que causam a infecção (Borborema, 2016).

No ano de 2017, foram aprovados 34 medicamentos pelo FDA (Food and Drug Administration), 10 deles para o tratamento de diversos tipos de câncer e somente um medicamento foi aprovado para o tratamento de doenças negligenciadas, no caso para doença de Chagas. Porém essa aprovação consiste em um medicamento já utilizado para o tratamento da doença, que é o benznidazol, a aprovação foi somente para uso do medicamento em crianças entre 2 a 12 anos (FDA, 2017). Em 2018, foram aprovados, até o momento, cinco medicamentos, nenhum deles para tratamento de doenças negligenciadas (FDA, 2018).

Todos os fármacos disponíveis apresentam problemas que vão desde a alta toxicidade, a necessidade de hospitalização até a resistência a esses fármacos (tabela 1) (Zulfiqar, 2017; Akbari, 2017).

Pensando em novas terapias para o tratamento das leishmanioses, o nosso laboratório realiza triagens de diversos tipos de compostos utilizando tanto a

linhagem causadora da leishmaniose cutânea como a causadora da leishmaniose visceral. A atividade de um dos compostos ciclopaladados utilizados neste trabalho, **CP2**, já foi descrita para a espécie de *L. (L.) amazonensis* pelo nosso laboratório, sendo um composto com baixa toxicidade para células de mamíferos e alta seletividade pelo parasito. O composto também apresentou atividade contra *Trypanosoma cruzi*. Em ensaios *in vivo*, utilizando-se fêmeas de BALB/c infectadas com *L. (L.) amazonensis*, o composto mostrou redução de 80% da carga parasitária e não apresentou toxicidade para fígado e baço. Por fim, o composto foi capaz de inibir a enzima topoisomerase IB de *L. (L.) donovani* (Velasquez, 2017).

Tabela 1: Fármacos atuais utilizados no tratamento das leishmanioses e suas características (adaptado de Zulfiqar, 2017)

Fármaco	Dosagem	Via de administração	Eficácia	Resistencia	Toxicidade	Vantagens	Limitações	Tipo da doença	Custo
Estibogluconato de sódio, Antimoniato de meglumina	20 mg/Kg/dia durante 30 dias	Intravenosa, intramuscular ou intralinfática	Varia entre 35-95%	>65% em Bihar, Índia	Cardiotoxicidade severa, nefrotoxicidade, pancreatite e hepatotoxicidade	Disponibilidade	Resistência, tratamento prolongado e administração dolorosa.	LV	US\$ 82,36 por frasco de 100 ml
Anfotericina B desoxicolato	1 mg/Kg/dia durante 30 dias	Intravenosa	>90%	Linhagens laboratoriais	Nefrotoxicidade severa, tromboflebite e hipocalcemia	Não foi documentada resistência primária	Instabilidade térmica, hospitalização para administração intravenosa.	LV, LC	US\$ 7,50 por frasco de 50 mg
Anfotericina lipossomal	3-5 mg/Kg/dia durante 20 dias	Intravenosa	96%	Não documentada	Nefrotoxicidade leve, calafrios e febre durante a administração	Baixa toxicidade, resistência não documentada	Instabilidade térmica, alto custo.	LV	US\$ 18,00 por frasco de 50 mg
Miltefosina	2-2,5 mg/Kg/dia durante 28 dias	Oral	>94%	Linhagens laboratoriais	Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e teratogenicidade	Tratamento por via oral	Tempo de meia vida alto podendo facilitar resistência. Não pode administrar em mulheres grávidas	LV	US\$ 47,98 – 58,20 por 56 cápsulas de 50 mg
Paromomicina	15 mg/Kg/dia durante 21 dias	Intramuscular e tópica	>94% na Ásia e 46-85% na África	Linhagens laboratoriais	Ototoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade	Baixo custo	Eficácia varia entre as diferentes linhagens de Leishmania. Potencial para resistência	LC, LMC	US\$ 15
Pentamidina	3 mg/Kg/dia durante 4 dias	Intramuscular	Varia entre 36-96%	Não documentada	Hiperglicemia severa, hipotensão miocárdica e taquicardia	Dosagem pequena	Eficácia varia de acordo com a localização geográfica da doença	LV, LC	-

2.9 Compostos ciclopaladados

Compostos ciclometalados vêm sendo amplamente estudados e considerados promissores no desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos (Ulukaya, 2013; Lee, 2009; Bertrand, 2017; Lunagaryia, 2017; Tanaka, 2013). Os ciclometalados são compostos organometálicos importantes, considerados intermediários na catálise de metais de transição (Chen, 2016). As sínteses orgânicas têm incorporado a catálise de metais de transição para diversas aplicações utilizando complexos como os de paládio, platina, ouro e ródio (Egorova, 2016).

A cisplatina está entre os agentes quimioterápicos mais eficazes para o tratamento de diversos tipos de cânceres, porém seu uso é restrito devido à resistência a esse tipo de fármaco e possuir alta toxicidade com efeitos colaterais severos como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, ototoxicidade e vômito (Tanaka, 2013; Matesanz, 2013). Os derivados de paládio vêm sendo amplamente estudados como agente anticâncer, pois apresentam similaridade estrutural com os de platina, melhor solubilidade e menor toxicidade (Lazarevic, 2017).

Compostos ciclometalados despertam um grande interesse por sua aplicação em uma variedade de campos, mas principalmente, por suas propriedades quimioterápicas (Treu-Filho, 2007). Dentre estes compostos, os ciclometalados de paládio(II), ou ciclopaladados, possuem alta estabilidade termodinâmica e cinética quando são comparados com outros compostos derivados de paládio(II) devido à formação de um quelato estável, tornando-os

interessantes do ponto de vista de desenvolvimento de fármacos (Velasquez, 2016).

Para o processo de desenvolvimento de fármacos é importante não só determinar as diferentes propriedades bioativas de um composto, como também entender seus mecanismos de ação, podendo assim, contribuir para o desenho racional de moléculas mais ativas e mais seletivas. Neste contexto, nós demonstramos em 2017, que o composto **CP2** é capaz de inibir a atividade da enzima topoisomerase IB do parasito. Esta enzima é um importante alvo terapêutico para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas, devido ao papel importante que desempenha no metabolismo do DNA (D'anessa, 2015; Chawla, 2010).

2.10 Estresse replicativo e reparo do DNA

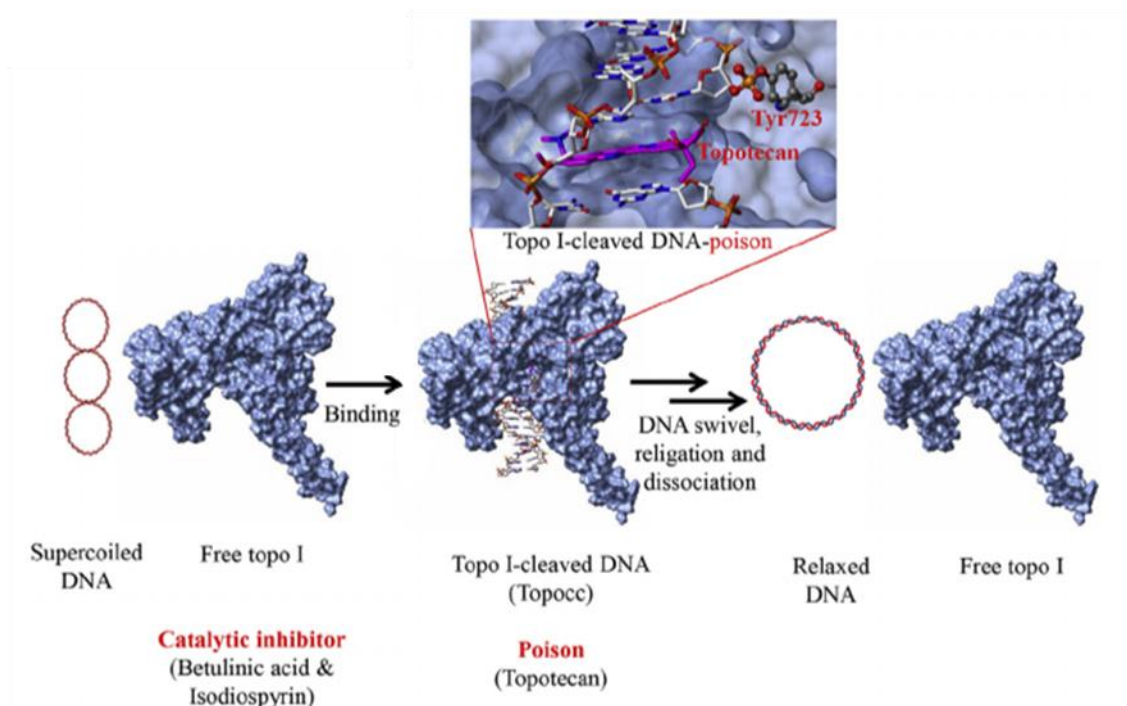
O DNA possui conformação superenovelada e, para que ocorra a replicação o DNA precisa ser relaxado. Para isso, precisam ser feitos “cortes” em uma ou em ambas as fitas do DNA, permitindo assim que este se desenrole (Jean-Moreno, 2006; Balaña-Fouce, 2014). Essas mudanças na conformação do DNA são realizadas por proteínas denominadas DNA topoisomerases (TOPs), enzimas que realizam quebra e união da fita e, portanto, contribuem para o relaxamento das moléculas, processo essencial para as células (Saha, 2013; Champoux, 2001). As TOPs possuem a habilidade de clivar e religar o esqueleto do DNA por duas reações sucessivas de transesterificação (DAS, 2006), podendo ser classificadas em TOP I e TOP II, as quais quebram uma ou ambas as fitas do DNA, respectivamente (Chowdhury, 2012).

As TOPs do tipo I podem ser divididas em dois tipos: IA e IB. O tipo IA tem a capacidade de relaxar somente o DNA superenovelado negativamente enquanto o tipo IB possui a habilidade de relaxar tanto o DNA superenovelado negativamente quanto positivamente com igual eficiência e não requer sequências específicas de DNA ou íons metálicos para funcionar ou a presença de ATP (Champoux, 2001; Stewart, 1997, Sengupta, 2011).

Devido às várias desvantagens dos fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, a identificação de novos alvos moleculares é de grande interesse. A identificação de enzimas TOPs como alvos moleculares tem-se mostrado promissora, e compostos organometálicos são conhecidos por inibir a atividade da enzima (Cheng, 2014; Chimento, 2015; Bisceglie, 2015; Barra, 2016). A topoisomerase IB de *Leishmania* (TOP IB) é composta por duas subunidades codificadas por genes diferentes. Comparando a topoisomerase humana e a do parasito, poucas semelhanças são encontradas, tornando essa enzima um alvo interessante no sentido de buscar um fármaco capaz de inibir somente a enzima do parasito (Reguera, 2007; Carballeira, 2013).

Os inibidores de TOPs são classificados em dois grupos, classe 1: os considerados veneno e classe 2: os inibidores catalíticos (figura 12). Os venenos, em sua maioria, atuam ligando-se ao complexo enzima-DNA, formando uma ligação covalente, onde ocorre a quebra da fita, porém o DNA não consegue religar-se. Já os inibidores catalíticos se ligam à TOP livre, ou seja, antes de ela se ligar ao DNA (DAS, 2018).

Figura 12: Esquema dos diferentes estágios dos processos enzimáticos de TopI e os inibidores envolvidos em cada estágio (Khadka, 2018)



Todos os dias as células estão sujeitas a dezenas de milhares de lesões causadas por agentes endógenos ou exógenos, os quais podem bloquear a transcrição e replicação do genoma e, se não reparadas, levam a células a mutações que ameaçam a viabilidade celular (Jackson, 2009).

Para a correta duplicação e manutenção da informação genética, além das topoisomerasas, existem outras enzimas envolvidas no metabolismo de DNA, dentre elas, as maquinarias de reparo, responsáveis por preservar a estabilidade do genoma corrigindo lesões causadas por condições de estresses como a exposição a espécies reativas de oxigênio (EROs), espécies reativas de nitrogênio (ERNs), radiação, agentes depurinantes, entre outros (Passos-Silva, 2010).

EROs são comumente produzidos pelas células dos organismos como resultado normal do metabolismo celular, porém quando em altas concentrações esses agentes produzem danos aos lipídios, proteínas e DNA (Birben, 2012). É chamado de estresse oxidativo o desbalanço entre a produção de substâncias oxidantes e a defesa antioxidante do organismo (Almeida, 2013).

Especificamente, tanto EROs quanto ERNs atacam o DNA e podem prejudicar o emparelhamento de bases, bloquear a replicação e a transcrição e levar a quebras de fita simples no DNA. Além disso, quando duas quebras de fita simples surgem em estreita proximidade, quebras de fita dupla são formadas, sendo mais difíceis de reparar e altamente tóxicas (Khanna, 2001; Jackson, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos ciclopaladados

- Avaliar a atividade leishmanicida (EC₅₀) dos compostos de paládio em formas promastigotas de *L. (L.) infantum*;
- Avaliar a atividade leishmanicida (EC₅₀) dos compostos em formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*;
- Avaliar a citotoxicidade (CC₅₀) dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongo Swiss;
- Determinar o índice de seletividade (IS) ($IS = CC_{50}/EC_{50}$) das substâncias e selecionar a mais ativa.

3.2 Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do composto ciclopaladado mais promissor

- Avaliar *in vivo* a atividade do composto selecionado no subitem 3.1 em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (L.) infantum*;
- Realizar estudos histopatológicos de baço e fígado após tratamento *in vivo*.

3.3 Mecanismos de ação

- Determinar o perfil proteico para inferência dos potenciais mecanismos de ação;
- Analisar a expressão de proteínas obtidas pela técnica de 2-DE, com a finalidade de verificar a influência da substância na expressão das proteínas do parasito;

- Realizar espectrometria de massas das proteínas diferencialmente expressas;
- Analisar em bancos de dados públicos (NCBI) as sequências de peptídeos para identificação das proteínas diferencialmente expressas;
- Validação dos dados proteômicos por qPCR

4 MATERIAL E MÉTODOS

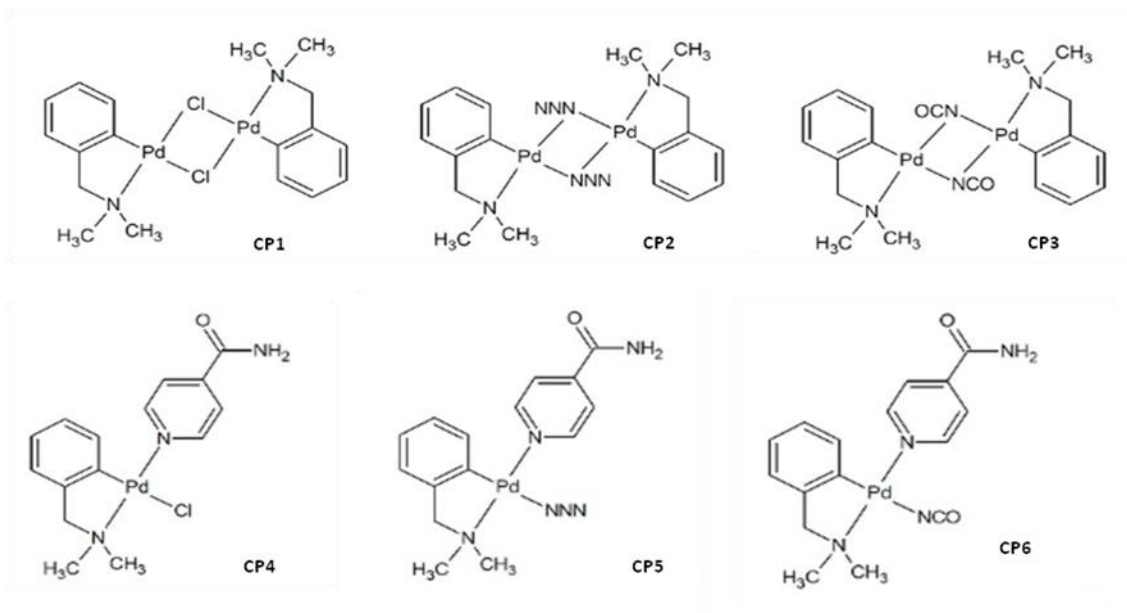
4.1 Parasitos e Células de Mamíferos

Foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) cedidas pelo Prof. Dr. José A. Lindoso do Instituto de Medicina Tropical, as quais foram mantidas e cultivadas em meio Schneider completo (meio Schneider suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino), 10% urina humana masculina, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina).

4.2 Compostos de paládio

Os compostos de paládio(II) foram sintetizados pelo grupo do prof. Dr. Antonio Eduardo Mauro e Adelino Vieira de Godoy Neto do Instituto de Química da Unesp de Araraquara. Os compostos testados foram: $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-Cl})]_2$ (**CP1**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-N}_3)]_2$ (**CP2**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{NCO})(\text{isn})]$ (**CP3**), $[\text{Pd}(\text{dmba})\text{Cl}(\text{isn})]$ (**CP4**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\text{N}_3)(\text{isn})]$ (**CP5**), $[\text{Pd}(\text{dmba})(\mu\text{-NCO})]_2$ (**CP6**) (figura 13) (Velazques, 2016; Almeida, 2007).

Figura 13: estrutura química dos compostos ciclopaladados avaliados nos ensaios biológicos.



4.3 Animais para Experimentação

Camundongos Swiss ou hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Biológicas da FCFAr-Unesp, em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em concordância com as Normas de Cuidados com Animais de Laboratório e Normas Éticas para a Investigação Experimental em Animais após aprovação pelo Comitê de Ética (CEUA/FCFAR nº 18/2015 e CEUA/FCFAR nº 44/2015, respectivamente).

4.4 Cepa resistente

Para a obtenção de parasitos resistentes ao composto **CP2**, formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram cultivadas em meio Schneider

(suplementado com 10% de SFB, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 10% de gentamicina) e em diferentes concentrações do composto **CP2** (1, 2, 3 e 4 µM). Cada concentração de **CP2** foi adicionada por pelo menos quatro passagens consecutivas. A concentração final foi mantida por 40 passagens para resistência dos parasitos (Coelho, 2015).

4.5 Ensaios *in vitro*

4.5.1 Avaliação frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum*

Para determinar a atividade *in vitro* das formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, essas foram ajustadas em uma concentração de 1×10^7 parasitos/mL em placas de 96 poços e os compostos foram adicionados nas concentrações de 0,1 a 100 µg/mL. As placas foram incubadas por 72 h a 28 °C para ação dos compostos. Como controle positivo, utilizou-se a anfotericina B (anfB). Para determinação dos valores de EC₅₀ (concentração efetiva que mata 50% dos parasitos), foi realizada contagem em câmara de Neubauer. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental.

4.5.2 Determinação da citotoxicidade *in vitro* frente a macrófagos peritoneais murinos

Camundongos Swiss foram inoculados intraperitonealmente com uma solução de tioglicolato de sódio 3% para a migração de macrófagos à região peritoneal. Essas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 completo, (RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina) e mantidos à temperatura de 37 °C em estufa a 5% de

CO₂ (Santos, 2013). Após contagem diferencial a concentração celular foi ajustada para 5x10⁵ células/mL em meio RPMI-1640. Dessa suspensão, foram transferidos 100 µL para cada poço de uma placa de 96 poços estéril. Após incubação para adesão dos macrófagos, foram adicionados a cada poço 100 µL de cada uma das substâncias diluídas em diferentes concentrações (0,78 - 100 µg/mL). Após nova incubação (24h, 37 °C, 5% de CO₂) 10 µL de uma solução MTT/PMS (2,5 mg/mL e 0,22 mg/mL respectivamente) foram adicionados aos poços, seguido por incubação de 75 min. Após esse período foram adicionados 100 µL de SDS 10% e HCl 1M para solubilizar os cristais de formazana. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV/Visível a 540 nm (leitor de microplaca – Tecan Infiniit M200 Pro). Ao final foi determinada, por regressão não linear, a concentração citotóxica que inibe 50% dos parasitos (CC₅₀). Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental (Passalacqua, 2015a).

4.5.3 Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida dos compostos ciclopaladados contra formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*

Para a avaliação da atividade leishmanicida frente às formas amastigotas intracelulares de *L. (L.) infantum*, macrófagos peritoneais foram extraídos e ajustados a uma concentração de 5x10⁵ células/mL em meio RPMI-1640 e distribuídos em lamínulas circulares em placas de 24 poços. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37 °C, 5% CO₂ para aderência das células. Após o período de incubação, os macrófagos foram infectados com

formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, em uma proporção de 10:1, e a placa foi novamente incubada por 18 horas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. O sobrenadante foi retirado e foram adicionados 480 µL de meio RPMI novo + 20 µL do composto em diferentes concentrações (0,6 a 40 µM), e procedeu-se incubação por mais 24 horas. Após incubação, o meio foi removido através de aspiração, as lamínulas foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A avaliação foi feita em microscópio óptico através da avaliação da infecção de 100 células por poço. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica e experimental (Dutra, 2014).

4.6 Ensaios *in vivo*

4.6.1 Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do composto CP2

Hamsters foram infectados intraperitonealmente com 2×10^8 promastigotas de *L. (L.) infantum* na fase estacionária de crescimento e separados em cinco grupos contendo sete animais cada, sendo dois grupos tratados com o composto **CP2** nas doses de 1,5 mg/Kg/dia equivalente a 5,3 vezes o valor do EC_{50(ama)} ou 0,75 mg/Kg/dia equivalente a 2,7 vezes o valor do EC_{50(ama)}, seguidos pelos controles experimentais, grupo saudável, infectados e não tratados e por fim tratados com o fármaco de referência anfB na dose de 20,0 mg/Kg/dia. Sessenta dias após a infecção, iniciou-se o tratamento por via intraperitoneal por 15 dias consecutivos. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o sangue foi coletado por punção cardíaca, seguido pela remoção de baço, fígado e rim para análises toxicológica e histopatológica.

4.6.2 Avaliação da carga parasitária por diluição limitante

Imediatamente após a retirada o fígado e o baço, foram macerados em tampão fosfato estéril e a suspensão obtida foi diluída 32 vezes na proporção de 1:5 em meio Schneider completo, anteriormente distribuído em placas de 96 poços (Lima, 1997). Todas as diluições foram realizadas em duplicata para cada órgão. As placas foram analisadas a cada três dias sob microscópio invertido até o 9º dia. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

4.6.3 Avaliação toxicológica

Após o sangue ter sido coletado por punção cardíaca seguido de centrifugação, o soro foi coletado para análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e creatinina. As análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Campus Araraquara. Análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey ($P < 0,01$).

4.6.4 Análise histopatológica

Para as análises histopatológicas, uma parte do fígado, baço e rim de todos os animais foram mantidas em formol tamponado 10% por 24h. Em seguida, os órgãos foram lavados e mantidos em etanol 70%. Os tecidos processados foram embebidos em parafina e seccionados em 4 μ m de espessura, colocados em lâminas de vidro e secos a 70°C por 30 minutos. Por

fim, foram corados com Hematoxilina/Eosina (Celis, 2015). A lâmina foi analisada por microscopia óptica e por um patologista que desconhecia os grupos experimentais. As análises foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Cleverton Roberto de Andrade da Faculdade de Odontologia da UNESP - Campus Araraquara.

4.7 Mecanismo de ação de CP2 frente a *L. (L.) infantum*

4.7.1 Análise proteômica

Culturas de promastigotas de *L. (L.) infantum* foram tratadas com **CP2** e topotecan, em seguida incubadas por 72 h a 28 °C. Passado o tempo de tratamento, as culturas foram centrifugadas a 514 *xg* por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado três vezes com PBS e posteriormente ressuspensos em 0,5 mL de tampão de lise (Uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4%, Tris 40 mM) contendo inibidores de proteases (PMSF 0,1 mg/mL, 1 µL de 1 M DTT, 1 µL de 1 mg/mL de pepstatina, 1 µL de 10 mg/mL de aprotinina e 1 µL de 10 mg/mL de leupeptina). A lise dos parasitos foi finalizada realizando-se cinco ciclos de congelamento/descongelamento (nitrogênio líquido/banho-maria a 37 °C). As amostras foram então centrifugadas (20.000 *xg*, 4 min, 4 °C) para a retirada de componentes insolúveis, e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi armazenado a -80 °C até o momento do uso. O extrato proteico foi dosado utilizando-se o kit de quantificação 2D-QuantKit (GE - Healthcare), seguindo recomendações do fabricante.

4.7.2 Análise proteica por eletroforese bidimensional

Os componentes proteicos isolados dos parasitos foram primeiramente submetidos à focalização isoeletrica (1ª dimensão) e separados de acordo com seu ponto isoeletrico. Após a corrida os géis foram tratados com tampão desnaturante composto por 0,08 M Tris-HCl pH 6,0, β -mercaptoetanol 0,5% (v/v), dodecil-sulfato de sódio (SDS) 2,3% (v/v), glicerol 1% (v/v), azul de bromofenol 0,01% (m/v). A segunda dimensão, para separação das proteínas de acordo com a massa molecular, foi realizada em gel de poliacrilamida 12% e SDS 1% de acordo com (Laemmli, 1970) e os géis foram corados com Coomassie Blue R-350 (GE-Healthcare).

4.7.3 Coloração dos géis por Coomassie Blue R-350

Após a corrida eletroforética (2ª dimensão) os géis foram colocados em uma solução de fixação contendo etanol, ácido acético e água overnight, sob agitação constante. Em seguida os géis foram encobertos por uma solução de Coomassie Blue R-350 a uma concentração de 0,1% e corados por 4 h sob agitação. Após a coloração os géis foram mergulhados em uma solução de descoloração overnight e em seguida mantidos em ácido acético 5% até o momento do recorte dos *spots* para análise.

4.7.4 Análise por espectrometria de massas – LC-MS/MS

Os *spots* foram recortados dos géis, com auxílio de uma lâmina de bisturi, reduzidos em fragmentos de aproximadamente 1 mm³ e transferidos

para microtubos. Os fragmentos de gel foram lavados três vezes para remoção completa do corante utilizando-se uma solução de descoloração (acetonitrila (ACN) 50% adicionado de bicarbonato de amônio (AmBic) 25 mM v/v). Após a descoloração, a solução foi removida e adicionou-se 200 µL de ACN 100% por 10 minutos para a desidratação dos fragmentos. O resíduo remanescente do gel evaporou à temperatura ambiente. Os fragmentos foram reidratados com 40 µL de uma solução de redução contendo ditioneitol (DTT) 20 mM adicionados de AmBic 50 mM, e mantidos a 56°C por 40 min. Em seguida os fragmentos foram cobertos com 40 µL de uma solução de alquilação (iodoacetamida 55 mM adicionado de AmBic 50 mM) e incubados ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Após esse período foi feita uma lavagem com 200 µL de Ambic 25 mM seguida de desidratação com 200 µL ACN 100%.

Para a digestão, os géis secos foram incubados com 10 ng/µL de tripsina em 25 mM de AmBic durante 15 minutos. Os peptídeos foram primeiramente extraídos dos géis em 50% de ACN e ácido fórmico 5%, durante 14 h a 37 °C. A segunda extração foi realizada em 50% de ACN com 1% de ácido fórmico durante 15 min, e lavou-se duas vezes com 100% de ACN. Os extratos foram secos e mantidos a -20 °C. Antes da identificação por espectrometria de massas, os peptídeos secos foram dissolvidos em 10 µL de ácido fórmico / ACN (0,1/3%). A identificação dos peptídeos foi realizada pelo grupo da Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf da Universidade de São Paulo – Campus de Bauru, em um sistema LC-MS/MS.

4.7.5 Validação das proteínas diferencialmente expressas por qPCR

Foi utilizado PCR em tempo real (qPCR) para validação dos resultados obtidos nos dados proteômicos. Para isso uma série de oligonucleotídeos foram desenhados pelo autor utilizando-se o software *Gene Runner* e o site da IDT (<http://www.idtdna.com>), tabela 2.

Tabela 2: Oligonucleotídeos testados na quantificação por PCR em tempo real (primers desenhados pelo autor).

Primer	Sequência 5' – 3'
RuvB_Li_F	CAACTGGTGCTCAAGACT
RuvB_Li_R	AACGTCGCCTACTTGAAC
HSP83_Li_F	TGCAGCAGAACAAGATCC
HSP83_Li_R	GCTTGTAGTCCTCCTTGTTT
ATM_Lm_F	GCAGTGCGACAGGAGTGGA
ATM_Lm_R	GGCACTGCTCAACGACATGG
ATR_Lm_F	TGCTTTGACCACTTCGAC
ATR_Lm_R	CTTGACACAGGAACGACAT
a_tub_Li_F	GCATGGAGGAGGGCGAGTT
a_tub_Li_R	CGTCCTCCTCACCCATGTCT

Para qPCR foi realizada a extração do RNA total com o *kit Direct-zol™ RNA MiniPrep* (Zymo Research) de uma cultura de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* na ausência e presença de **CP2** ou topotecan. Após 72 h de tratamento as células foram lavadas com PBS 1X e tratadas com Trizol, de acordo com as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase/RNase, quantificado com auxílio do *NanoDrop Lite Spectrophotometer* (Thermo

Scientific) e armazenado a -80°C até o momento do uso. Para a síntese do DNA complementar (cDNA) foram utilizados 5 µg do RNA total juntamente com a enzima *SuperScript II* RT proveniente do *kit 3'Race System for Rapid Amplification of cDNA end* (Life Technologies). O cDNA das amostras foi tratado com *RNase H*, quantificado em *nanodrop* e armazenado a -20°C até o momento das análises.

Para cálculo de eficiência, foi realizada a construção de uma curva padrão para cada gene alvo utilizando-se o DNA genômico extraído de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* com o *kit PureLink® Genomic DNA* (Invitrogen™) de acordo com as recomendações do fabricante. Também foi realizada a curva padrão do controle endógeno α -tubulina.

A reação de qPCR foi realizada com 1 µL de cDNA extraído de cada amostra (aproximadamente 25 ng), 5 µL de *Kit Fast SYBR® Green Master Mix* (Applied Biosystems®), 2 µL de primer *forward* e 2 µL de primer *reverse* (final 1 µM), utilizando-se o equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems* (Applied Biosystems®).

Por fim, realizou-se a avaliação das amostras de cDNA de *L. (L.) infantum* após o tratamento com o composto **CP2** pelo método $\Delta\Delta C_t$ (Rao, 2013).

4.7.6 Ensaio de Relaxamento do DNA

O ensaio para avaliar atividade da topoisomerase IB seguiu metodologia previamente descrita na literatura (Castelli, 2011; Sengupta, 2011). A atividade da topoisomerase IB foi testada em 20 µL de reação, contendo 0,5 µL de DNA

superenrolado negativamente, *pBlue-Script KSII* (+) e tampão de reação (25 mM Tris-HCl pH 7,5; 2,5 mM EDTA; 10 mM MgCl₂; Soro fetal bovino 150 µg/ml; 50 mM KCl, 5% glicerol; 0,5 mM DTT) a 37°C por 30 min. Mediu-se o efeito do composto sobre a atividade da enzima, adicionando-o em diferentes concentrações, em momentos diferentes. As reações foram paradas com solução de glicerol, azul de bromofenol, xileno cianol e SDS a 0,5%. Finalmente, as amostras foram visualizadas em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. DMSO foi adicionado nos controles sem o composto.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CP2 é o ciclopilado mais eficaz e seguro nos ensaios antileishmania *in vitro*

A LV vem se tornando um crescente problema de saúde pública em diversos países, incluindo o Brasil. É uma doença sistêmica que apresenta diversas manifestações clínicas como febres prolongadas, anemia, perda de peso e hepatoesplenomegalia e, se não tratada pode levar 90% dos pacientes a óbito (Singh, 2016; Oryan, 2016), indicando a importância de terapias efetivas. Considerando as poucas opções terapêuticas disponíveis, é importante o desenvolvimento de novos compostos leishmanicidas mais eficazes e seguros. Nosso grupo de pesquisa tem contribuído nos últimos anos na identificação de novos agentes leishmanicidas e fornecendo informações sobre seus mecanismos de ação (Dutra, 2014, Velasquez, 2015, Passalacqua, 2015a, Passalacqua, 2015b, Velasquez, 2017, Almeida, 2017). Dentro deste contexto, temos que compostos ciclopilados são interessantes para o

desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que já foram descritos seu potencial antitumoral, antibacteriano, antifúngico (Paladi, 2012; Albert, 2014, Velasquez, 2016). Neste trabalho, avaliou-se, inicialmente, as atividades dos compostos ciclopaladados **CP1**, **CP2**, **CP3**, **CP4**, **CP5** e **CP6** para o tratamento das LV. Para isso, foram utilizadas formas promastigotas de *L. (L.) infantum* e macrófagos peritoneais extraídos de camundongos para avaliação citotóxica.

Os ciclopaladados **CP2** ($EC_{50(pro)} = 4,0 \mu M$; $IS = 126,1$) e **CP4** ($EC_{50(pro)} = 5,4 \mu M$; $IS = 12,0$) foram os mais bioativos. Apesar do composto **CP2** ser quatro vezes menos ativo que anfB ($EC_{50(pro)} = 0,9 \mu M$; $IS = 25,1$) é cerca de cinco vezes mais seletivo para o parasito (Tabela 3).

Como a forma amastigota é a responsável pela manifestação da doença no hospedeiro mamífero o ensaio de infecção de macrófagos torna-se essencial na escolha do composto mais ativo. Nesse ensaio, o composto que apresentou melhor resultado foi, também, o composto **CP2**, com um valor de $EC_{50(ama)} = 4,7 \mu M$. Como no ensaio com formas promastigotas, o composto **CP2** também não apresentou um valor de $EC_{50(ama)}$ melhor que o controle, porém, quando se compara os valores de IS vê-se que o composto **CP2** é quase 14 vezes mais seletivo que anfB, mostrando que o composto testado é mais seletivo para o parasito que para a célula hospedeira (Tabela 3).

O composto **CP4** apresentou atividade tanto para formas promastigotas de *L. (L.) infantum*, como para *L. (L.) amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*. Considerando a *L. (L.) amazonensis*, **CP4** apresentou boa atividade anti-leishmania ($EC_{50(pro)} = 5,9 \mu M$ e $EC_{50(ama)} = 6,8 \mu M$, $IS = 10$). Atividade similar também foi encontrada para o agente causador da doença de Chagas, sendo

os valores de $EC_{50(epi)} = 5,0 \mu M$ e $EC_{50(ama)} = 12,2 \mu M$ com valores de IS de 12,9 e 5,3 respectivamente (Velasquez, 2017).

Tabela 3: atividade citotóxica e leishmanicida dos compostos ciclopaladados a partir do ensaio colorimétrico do MTT e contagem em câmara de Neubauer.

Compostos	<i>L. (L.) infantum</i> ($\mu M - EC_{50}$)				Swiss ($\mu M - CC_{50}$)
	Promastigota	IS	Amastigota	IS	Macrófagos
CP1 [Pd(dmba)(μ -Cl)] ₂	24,7 $\pm$ 1,4	2,4	42,0 $\pm$ 1,0	1,4	59,2 $\pm$ 5,3
CP2 [Pd(dmba)(μ -N ₃)] ₂	4,0 $\pm$ 0,4	126,1	4,7 $\pm$ 0,1	107,6	505,9 $\pm$ 10,7
CP3 [Pd(dmba)(NCO)(isn)]	17,5 $\pm$ 0,3	5,6	82,3 $\pm$ 2,3	1,2	98,2 $\pm$ 11,7
CP4 [Pd(dmba)Cl(isn)]	5,4 $\pm$ 0,8	12,0	51,5 $\pm$ 1,1	1,2	64,7 $\pm$ 6,6
CP5 [Pd(dmba)(N ₃)(isn)]	12,3 $\pm$ 0,3	9,5	59,5 $\pm$ 0,8	2,0	118,1 $\pm$ 14,7
CP6 [Pd(dmba)(μ -NCO)] ₂	16,6 $\pm$ 2,1	8,1	53,2 $\pm$ 0,1	2,5	134,44 $\pm$ 24,5
Ctrl AnfB	0,9 $\pm$ 0,01	25,1	2,98 $\pm$ 0,04	7,7	23,10 $\pm$ 2,5

5.2 Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do composto CP2

Após as análises *in vitro*, o composto **CP2** foi selecionado para dar continuidade aos ensaios, por ter apresentado maior atividade em formas promastigotas e menos toxicidade para as células de mamíferos. Além disso, trabalhos realizados dentro do laboratório de Bioquímica e Biologia molecular de Tripanossomatídeos (LabBioqBioMolTrip) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araquara, mostraram que o composto **CP2**, também apresentou atividade para a forma cutânea da doença, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, com redução de 80% da carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*. O próximo passo foi determinar *in vivo* a atividade do composto na forma visceral da doença causada pela *L. (L.) infantum*. Existem vários modelos experimentais, porém o hamster mimetiza a

patogenia da doença humana, apresentando hepatoesplenomegalia e imunossupressão, característicos da LV (Goto, 2004).

Para avaliação *in vivo* de **CP2**, hamsters dourados foram infectados por via intraperitoneal com 2×10^8 promastigotas de *L. (L.) infantum*. Os animais foram separados em 5 grupos, sendo o grupo 1 o controle negativo, grupo 2 animais infectados e não tratados, grupo 3 animais infectados que receberam 1,5 mg/Kg/dia do composto **CP2** (que equivale a 5,3 vezes o valor do EC₅₀ em amastigota), grupo 4 animais infectados que receberam 0,75 mg/Kg/dia do composto **CP2** (equivalente a 2,7 vezes o valor do EC₅₀ em amastigota) e grupo 5 animais tratados com o fármaco de referência anfB (20,0 mg/Kg/dia). Sessenta dias após a infecção o tratamento foi iniciado, por via intraperitoneal, com duração total de 15 dias consecutivos. Em seguida os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o sangue foi coletado por punção cardíaca para análise toxicológica, baço e fígado foram retirados para análise da carga parasitária por diluição limitante, pois são os órgãos mais afetados pela LV, os quais podem apresentar um quadro de hepatoesplenomegalia, sendo que para análise histopatológica, o rim também foi incluído.

Para quantificação da carga parasitária, foi utilizado o método da diluição limitante com todos os grupos, exceto o grupo controle negativo. Fígado e baço foram retirados, macerados e colocados nas placas de 96 poços. As placas, analisadas a cada três dias até o 9º dia, apresentaram os resultados exibidos nas figuras 2 e 3, sendo a quantificação da carga parasitária por grama de órgão.

Tanto no fígado, quanto no baço, é possível observar que o tratamento com 1,5 mg/Kg/dia do composto **CP2** foi a concentração mais eficaz na diminuição da carga parasitária, mesmo quando comparada ao fármaco de referência para o tratamento desta espécie de *Leishmania*, a anfB. Sendo que no fígado houve uma redução de 49,8% da carga parasitária para o grupo tratado com 1,5 mg/Kg/dia de **CP2** enquanto a anfB reduziu 25,4% (Figura 14). No baço a redução do grupo tratado com 1,5 mg/Kg/dia de **CP2** foi superior a 50% e a anfB reduziu 43,8% (Figura 15). Além de mostrar uma diminuição considerável, vale ressaltar que a concentração utilizada do derivado de paládio foi mais de 13 vezes menor que a concentração utilizada do fármaco controle.

A concentração de 0,75 mg/kg/dia apresentou valores de redução da carga parasitária muito próximos aos de anfB, tendo apresentado, para o fígado, redução de 25,3% e para o baço 42,4%.

Figura 14: Carga parasitária do fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum*. Os animais foram infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com **CP2** ou anfB e a carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante após o final do tratamento. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo infectado e não tratado ($P < 0,01$) foram realizadas pelo teste de Tukey.

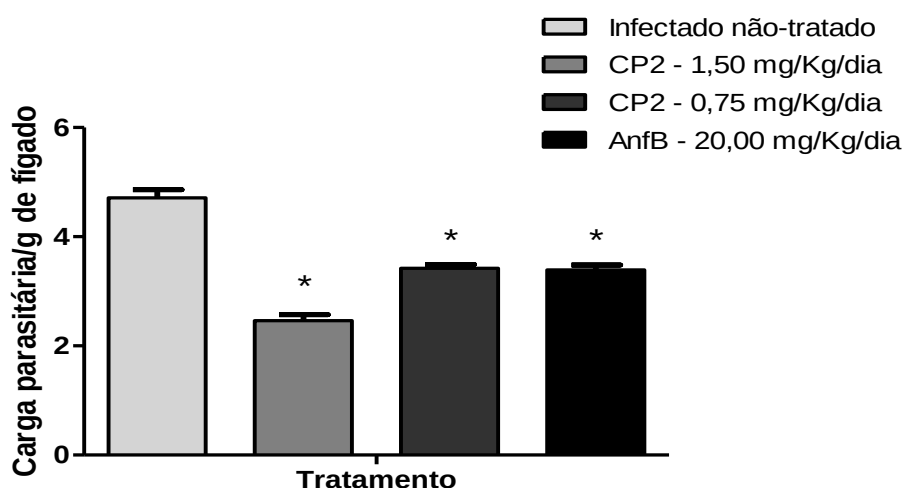
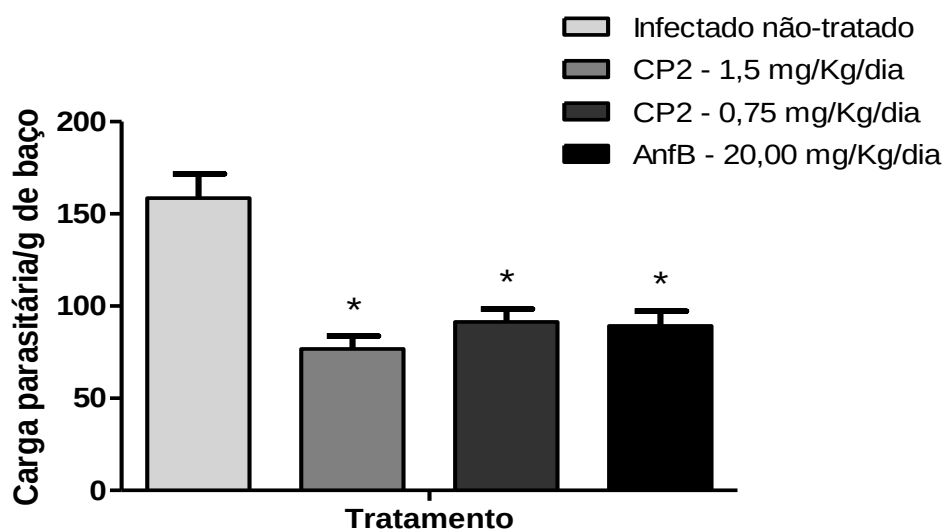


Figura 15: Carga parasitária do baço de hamsters infectados com *L. (L.) infantum*. Os animais foram infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com **CP2** ou anfB e a carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante após o final do tratamento. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo infectado e não tratado ($P < 0,01$) foram realizadas pelo teste de Tukey.

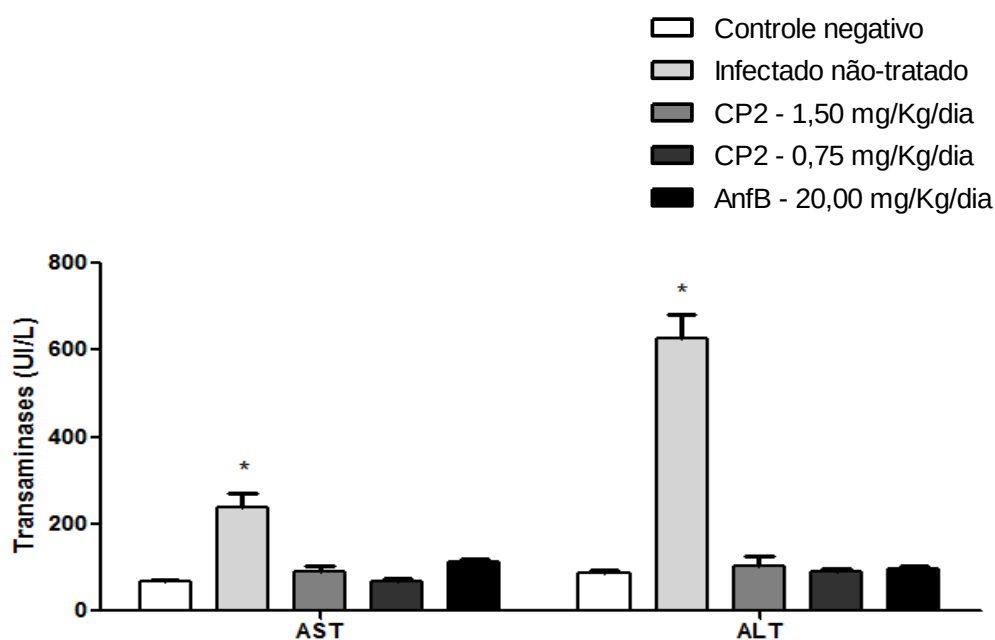


5.3 CP2 não apresentou toxicidade para fígado e rim através da análise de ALP, ALT, AST e creatinina

A avaliação da toxicidade do fígado e rim foi realizada com os grupos controles (negativo e infectados e não tratados) e grupos que receberam o tratamento (composto **CP2** e anfB). Para determinar se o composto testado *in vivo* apresentou toxicidade no fígado, foram testados biomarcadores como a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) que são marcadores simples para avaliar o grau de lesão do fígado, sendo a ALT mais específica para detectar danos hepáticos do que a AST (Bibiloni, 2016). Os níveis séricos da fosfatase alcalina (ALP) também foram testados no intuito de verificar possível dano hepático causado pelo tratamento. A enzima ALP está presente nas membranas que revestem o sistema biliar do fígado e é excretada através da bile. Quando ocorre algum distúrbio no órgão, a enzima é liberada na corrente sanguínea (Sotil, 2004).

Com relação à concentração sérica das transaminases AST e ALT (figura 16), em ambos os biomarcadores somente houve diferença estatística, comparado ao grupo controle negativo, o grupo de animais infectados e não tratados, sendo que este grupo apresentou níveis séricos maiores que os valores de referência apresentados para hamsters. O maior aumento nos níveis séricos de ALT no grupo que foi infectado e não recebeu nenhum tipo de tratamento sugere que a doença está causando danos hepáticos ao órgão, uma vez que esse biomarcador é mais específico para determinar esse tipo de toxicidade. Os grupos que receberam tratamento com **CP2** e anfB apresentaram valores séricos próximos ao grupo controle negativo.

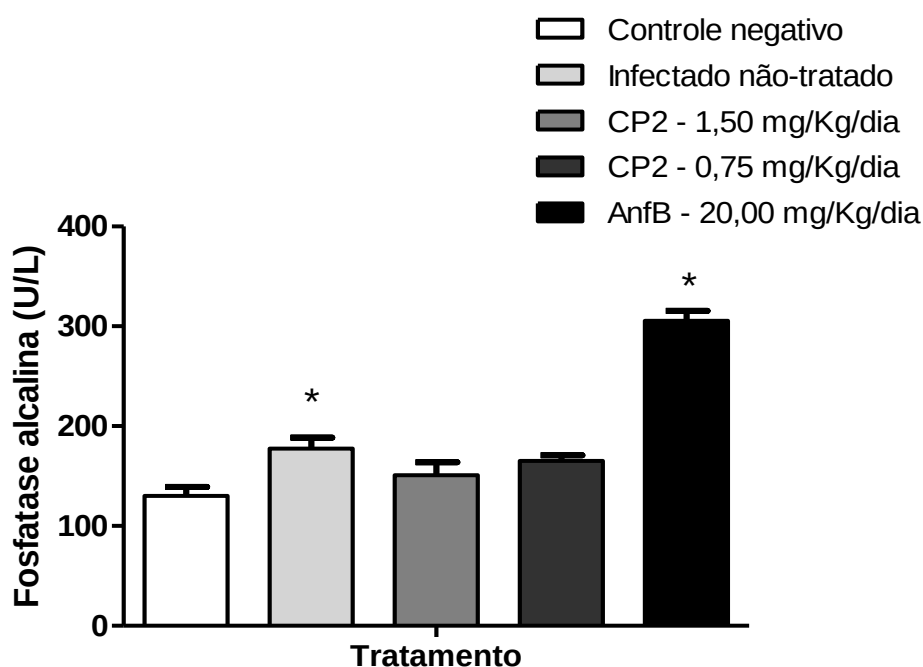
Figura 16: Análise toxicológica de hamsters infectados com *L. (L.) infantum* após tratamento com o composto **CP2** ou anfB. Concentração sérica das transaminases AST e ALT após 15 dias de tratamento. Valores de referência: AST: 20-150 UI/L, ALT: 20 – 128 UI/L. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo ($P < 0,01$) foram realizadas pelo teste de Tukey.



Os níveis séricos de ALP também podem indicar dano hepático, níveis elevados podem determinar quadros de disfunção hepatobiliar e necrose do órgão (Ozkol, 2016). O grupo dos animais infectados e não tratados e os que receberam o tratamento com anfB apresentaram valores estatisticamente diferentes quando comparados com o grupo controle negativo (figura 17). O tratamento com anfB pode afetar todo o sistema hepatobiliar, causando aumento nos níveis de ALP (Miller, 1984), como pode ser visto na figura 17, onde o grupo que recebeu 20,0 mg/Kg/dia do composto apresentou níveis séricos de ALP muito maiores que os grupos controle e os grupos que receberam o tratamento com **CP2**. E quando analisamos os valores de

referência de ALP para hamster, os níveis séricos do grupo que recebeu a concentração de anfB está bem acima do valor recomendado.

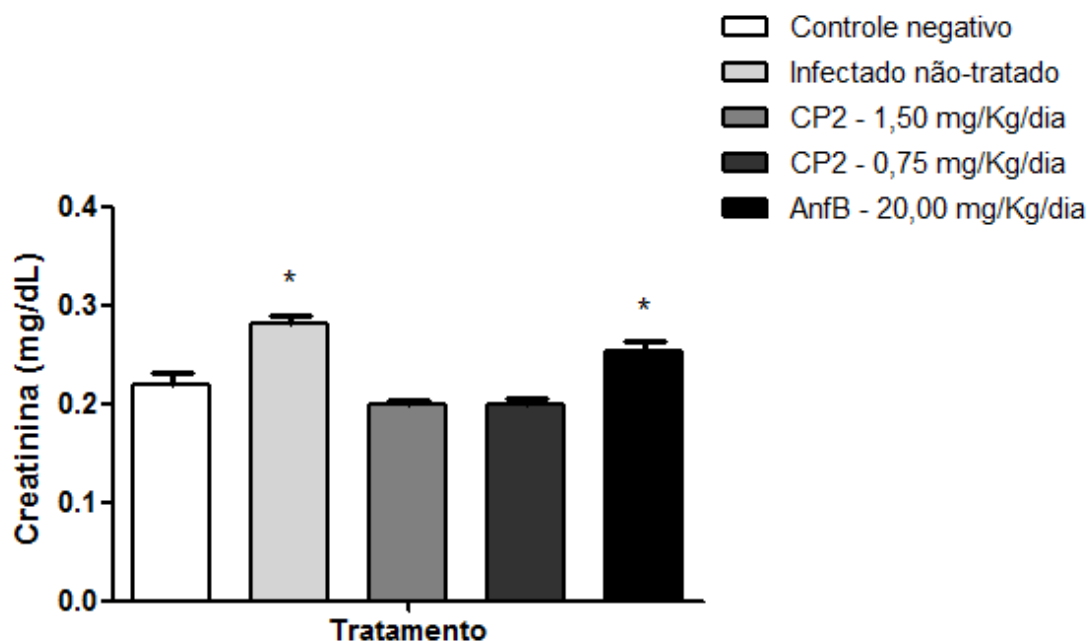
Figura 17: Análise toxicológica de hamsters infectados com *L. (L.) infantum* após tratamento com o composto **CP2** ou anfB. Concentração sérica da fosfatase alcalina após 15 dias de tratamento. Valores de referência: 50 – 186 UI/L. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo ($P < 0,01$) foram realizadas pelo teste de Tukey.



Outro parâmetro para determinar se o tratamento causou alguma toxicidade aos animais foi avaliar os níveis séricos da creatinina, que é um biomarcador de função renal. Os rins são responsáveis por excretar substâncias tóxicas do organismo, e uma dessas substâncias é a creatinina, que quando está em níveis elevados no sangue pode significar disfunção da taxa de filtração glomerular (Dalton, 2011), porém os grupos não apresentaram

alterações significativas nos níveis de creatinina (figura 18), variando entre 0,2 e 0,3 mg/dL, estando todos os grupos abaixo do valor de referência determinado para a espécie, apesar do grupo infectado e não tratado e o grupo que recebeu o tratamento com anfB terem apresentado diferenças estatísticas do controle negativo.

Figura 18: Análise toxicológica de hamsters infectados com *L. (L.) infantum* após tratamento com o composto **CP2** ou anfB. Concentração sérica de creatinina após 15 dias de tratamento. Valores de referência: 0,6 – 1,4 mg/dL. *: diferenças estatísticas significativas em relação ao controle negativo ($P < 0,01$) foram realizadas pelo teste de Tukey.



5.4 O grupo tratado com CP2 apresentou aspectos histopatológicos de baço, fígado e rim semelhantes ao controle negativo, porém com resposta à infecção por *Leishmania*

Para avaliar se a infecção com *L. (L.) infantum* e o tratamento com o composto **CP2** e anfB foram capazes de induzir alguma alteração no fígado, baço e rim, após 60 dias de infecção e 15 dias de tratamento, os animais foram eutanasiados e fígado, baço e rim foram removidos, pesados e comparados entre os grupos experimentais.

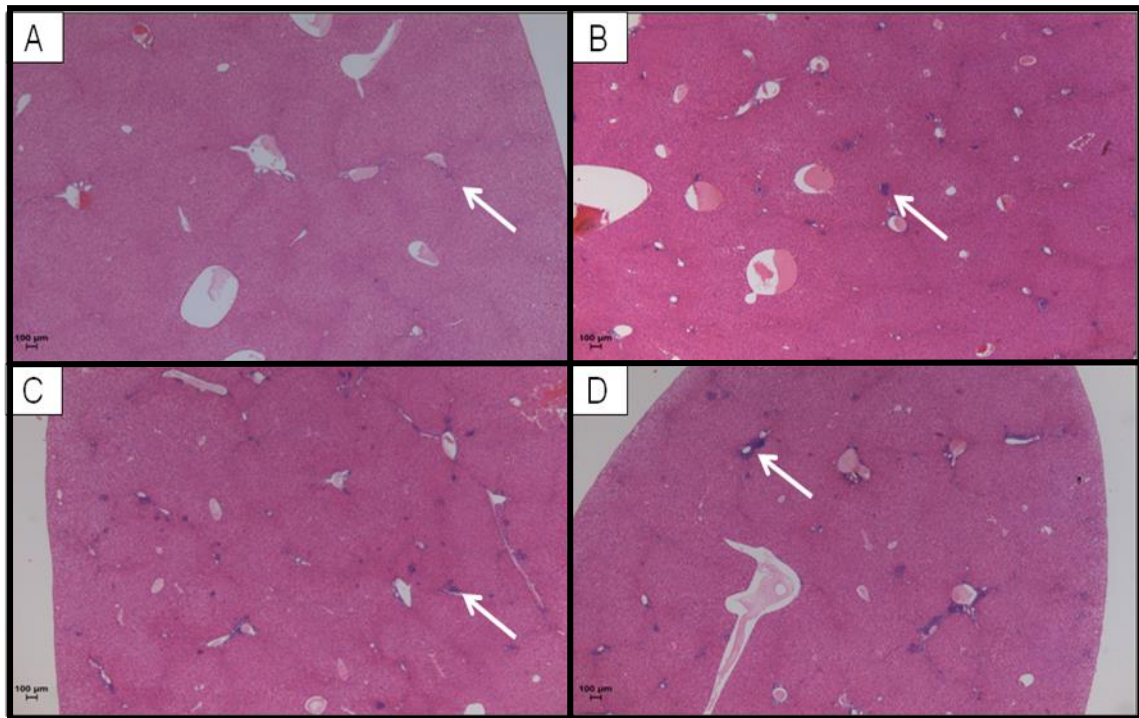
Uma importante característica da resposta do fígado ao parasitismo é a formação de inflamações granulomatosas. O protozoário *L. (L.) infantum* encontra-se principalmente dentro de macrófagos presentes no baço e fígado do hospedeiro mamífero, que possui sistemas capazes de controlar a infecção causada pelo parasito através da formação de granulomas, que são respostas do sistema imune do hospedeiro mediada por linfócitos Th1 e citocinas IL-12 (interleucina) e IFN- γ (interferon) (Murray & Nathan, 1999). A inflamação granulomatosa é lentamente formada e pode durar longos períodos, normalmente provocada por agentes intracelulares. Os granulomas são estruturas arredondadas nas quais é possível limitar a infecção causada pelo parasito, matar e remover, e ainda reparar a lesão tecidual (Murray, 2001).

A partir da análise microscópica realizada no fígado, não foram observadas alterações na estrutura geral do órgão de todos os grupos. Para o grupo controle negativo, não foram detectados granulomas, no grupo infectado e não tratado os granulomas apareceram tanto na região periportal, quanto na região lobular, porém em pouca quantidade. Já para os grupos tratados com o

composto **CP2** e anfB, os granulomas foram encontrados em maior quantidade nas duas regiões (periportal e lobular), com os grupos tratados com **CP2** sendo os que apresentaram maior intensidade de granulomas. Também foram encontradas células gigantes multinucleadas (CGM) em todos os grupos infectados, que, segundo está relatado na literatura, são macrófagos altamente estimulados e comumente encontrados na infecção granulomatosa (Hernandez-Pando, 2000).

Foi observada a presença de infiltrados inflamatórios tanto na região periportal quanto na lobular, sendo que o grupo controle negativo apresentou infiltrados leves nas duas regiões (figura 19A). Os demais grupos apresentaram infiltrados moderados nas regiões periportal e lobular (figura 19B, 19C e 19D). Foram encontradas formas amastigotas no fígado dos animais de todos os grupos infectados.

Figura 19: Infiltrados inflamatórios (indicados pelas setas) em corte histológico de fígado de hamsters. Em (A) grupo controle negativo, (B) grupo de animais infectados e não tratados, (C) grupo de animais infectados e tratados com 1,5 mg/Kg/dia de **CP2**, (D) grupo de animais infectados e tratados com 20,00 mg/Kg/dia de anfB. Aumento 2,5x.



A partir da análise microscópica realizada no baço, foi possível observar que todos os animais de todos os grupos apresentaram integridade capsular, e uma redução de polpa branca com consequente aumento de polpa vermelha. A zona marginal se apresentou aumentada para todos os grupos e os folículos organizados.

No grupo controle negativo não foram encontrados granulomas e nem infiltrados inflamatórios. Já para os grupos que foram infectados e receberam ou não tratamento, foram encontrados tanto os granulomas quanto os

infiltrados inflamatórios e também foi observada a presença das formas amastigotas.

Na análise histopatológica do rim, o grupo controle negativo apresentou aspecto de normalidade tanto para o espaço urinário (figura 20A) como para os ductos proximais e distais da região cortical. Os ductos da região medular também estavam normais e apresentaram uma inflamação leve. Não foram encontrados sinais de necrose nos órgãos.

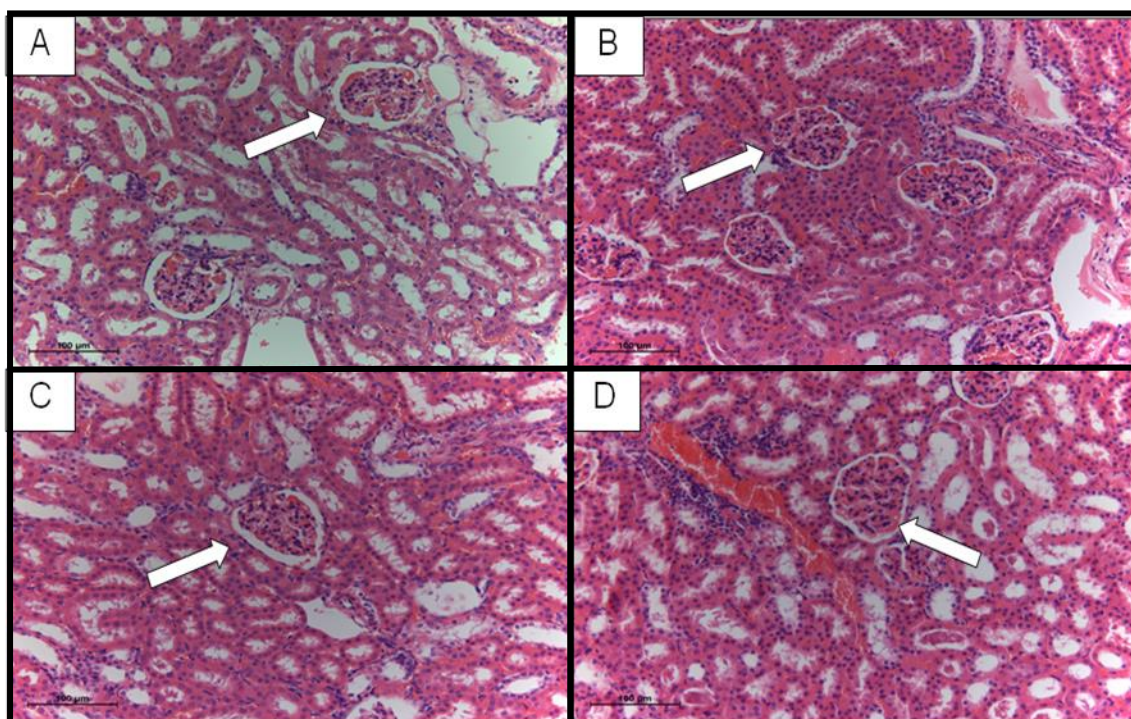
O grupo infectado e não tratado apresentou algumas características diferentes do grupo controle negativo, o espaço urinário se mostrou diminuído (figura 20B), os ductos proximais da região cortical estavam edemaciados e os ductos distais normais. Os ductos da região medular também se mostraram edemaciados e apresentaram uma inflamação leve. Não foram encontrados sinais de necrose para esse grupo.

Os animais que receberam 1,5 mg/Kg/dia de **CP2** apresentaram o espaço urinário normal, como no grupo controle negativo (figura 20C), os ductos proximais estavam edemaciados e os distais apresentaram normalidade, assim como os ductos da região medular. A inflamação na região medular também foi de caráter leve e não foram detectados sinais de necrose nos animais.

Nessa análise do rim, o que chama a atenção são os animais tratados com o fármaco de referência anfB, em que o espaço urinário se mostrou diminuído para o grupo (figura 20D), e ambos os ductos proximais e distais da região cortical se mostraram edemaciados, bem como os ductos da região medular. A inflamação neste grupo foi moderada e foram constatados sinais de

necrose nos animais. Além da necrose, que não havia sido encontrada em nenhum animal, foi detectada a presença de áreas de calcificação em todos os animais do grupo. Essas alterações no grupo tratado com a anfB podem ser decorrentes da nefrotoxicidade induzida pelo uso do fármaco, que tem como mecanismo de ação a ligação aos esteróis de protozoários interferindo na permeabilidade da membrana permitindo vazamento de componentes celulares. Apesar de anfB possuir maior afinidade pelo ergosterol que é o esterol de fungos e protozoários, o fármaco também se liga ao colesterol, que é o esterol presente na membrana de mamíferos, podendo ser esse um dos fatores da alta toxicidade apresentada pelo fármaco (Laniado-Laborín, 2009).

Figura 20: Espaço urinário (indicados pelas setas) em corte histológico do rim de hamsters. Em (A) grupo controle negativo, (B) grupo de animais infectados e não tratados, (C) grupo de animais infectados e tratados com 1,50 mg/Kg/dia de **CP2**, (D) grupo de animais infectados e tratados com 20,00 mg/Kg/dia de anfB. Aumento 20x.



5.5 Resistência do parasito ao composto CP2

Os resultados promissores apresentados pelo composto **CP2** na inibição da *LdTopIB* podem ser um indicativo de que esta enzima seja um dos alvos de ação do derivado de paládio na eliminação do parasito.

Na tentativa de determinar se há apenas um ou mais mecanismos de ação do **CP2** sobre o parasito, formas promastigotas de *L. (L.) infantum* foram cultivadas na presença do composto durante seis meses, em seguida o ensaio com essas formas resistentes foi realizado para determinar se o aumento na concentração do composto ocasionaria resistência ao parasito. Para isso, uma cultura de promastigota foi submetida a diversas concentrações de **CP2**. Uma vez que o $EC_{50(\text{pro})}$ em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* é 4,0 μM , os parasitos foram cultivados nas concentrações de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 μM de **CP2**.

O tratamento das formas promastigotas foi então iniciado com a concentração de 1,0 μM de **CP2**, em garrafa de cultura contendo: *L. (L.) infantum* em meio de cultura Schneider + 1,0 μM de **CP2** diluído em DMSO + 10% de urina estéril em um volume final de 5,0 mL. O tratamento da cepa foi realizado a cada cinco dias. Para determinar se os parasitos apresentavam resistência ao composto **CP2**, foi realizado o ensaio leishmanicida utilizando as formas promastigotas previamente selecionadas durante seis meses. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

A concentração de 4,0 μM foi então mantida por seis meses e um ensaio leishmanicida foi realizado com o intuito de calcular a resistência conferida. Após a seleção dos parasitos à concentração de 4,0 μM de **CP2**, o valor do $EC_{50(\text{pro})}$ aumentou 15 vezes, passando de 4,0 μM para 64,3 μM .

O composto topotecan, com mecanismo de ação conhecido por inibir a enzima *LdTopIB*, foi também testado, tanto na forma promastigota selvagem, quanto na forma resistente ao composto **CP2**. Foi possível observar que o topotecan também teve o EC_{50} aumentado nas formas promastigotas resistentes, sendo 9 vezes maior quando comparado com a linhagem selvagem.

Tabela 4: Atividade leishmanicida do composto **CP2** nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (L.i) selvagem (CP2-) e resistente (CP2+) a 4,0 μ M do composto.

Composto	L.i (μ M - EC_{50}) (CP2-)	L.i (μ M - EC_{50}) (CP2+) 4,0 μ M	Índice de Resistência
CP2	4,0 $\pm$ 0,4	64,3 $\pm$ 0,6	15,8
Topotecan	23,9 $\pm$ 0,7	215,7 $\pm$ 2,4	9,0

A resistência aos fármacos está relacionada com a capacidade dos patógenos em contornar os efeitos destes agentes. (Vanaerschot, 2014). No intuito de identificar genes de resistência em protozoários, realiza-se a seleção de parasitos resistentes a determinados fármacos, o que também contribui para a compreensão de mecanismos de ação desses agentes quimioterápicos (Alsford, 2013; Muller, 2011; Ouellette, 2004). Os compostos que possuem apenas um alvo protéico podem ser mais susceptíveis a resistência, que pode ocorrer por mecanismos como: a presença de uma enzima alternativa para a enzima inibida pelo fármaco; mutação no alvo do composto, o que reduz a ligação do agente inibidor; efluxo ativo do composto; superprodução do alvo do agente inibidor, entre outros (Fluit, 2001). Fármacos que apresentam uma

baixa probabilidade de desenvolvimento de resistência por pressão seletiva são aqueles que interagem com mais de um alvo molecular (Cavalli, 2009).

Uma vez que foi possível obter uma cepa resistente ao composto, esse fenômeno pode ter ocorrido por dois motivos: a célula está bombeando o fármaco para fora, através de transportadores do tipo ABC ou pode ter ocorrido uma mutação na enzima TOP do parasito. As análises de qPCR mostraram que a cepa resistente não apresentou níveis de expressão elevados para nenhum gene testado, sugerindo uma estabilidade frente a genes que danificam o DNA ou causam estresse oxidativo quando em contato com o composto.

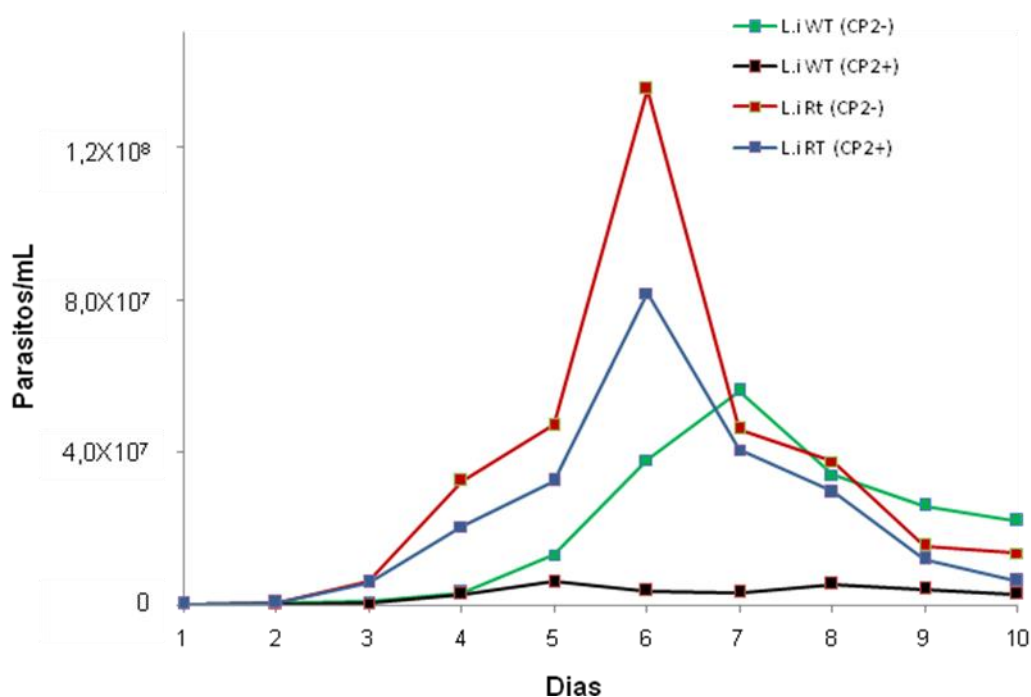
5.6 Curva de crescimento da cepa resistente

Após os seis meses de cultivo da *Leishmania* na presença de 4 μ M do composto **CP2**, uma curva de crescimento foi realizada com as formas promastigotas resistente e selvagem. Foram crescidas quatro garrafas em duplicata, sendo uma garrafa com as formas promastigotas selvagem na ausência de **CP2**, uma com as formas promastigotas selvagem na presença de 4 μ M de **CP2**, uma terceira garrafa com as formas resistentes ao composto na ausência de **CP2** e por último uma garrafa com as formas resistentes ao composto e na presença de 4 μ M de **CP2**.

As formas promastigotas selvagem não foram capazes de crescer na presença de 4 μ M do composto, já as formas promastigotas resistentes ao **CP2**, tanto na ausência quanto na presença do composto, cresceram mais que a forma selvagem na ausência de **CP2** (figura 21). A sobrevivência e

crescimento do parasito resistente ao composto na presença de **CP2** mais o resultado do $EC_{50(\text{pro})}$ para estas formas ($EC_{50(\text{pro})} = 64,3 \mu\text{M}$) sugerem que uma cepa resistente realmente foi obtida após os seis meses de cultivo.

Figura 21: Curva de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) infantum* resistente (RT) e selvagem (WT) na presença (CP2+) ou ausência (CP2-) do composto **CP2**. Formas promastigotas foram crescidas em meio Schneider a 26 °C na ausência (CP2-) ou presença (CP2+) de 4 μM do composto **CP2**. As culturas foram iniciadas em 2×10^5 células/mL e os parasitos foram contados durante 10 dias consecutivos em câmara de Neubauer.



5.7 Análise proteômica

O termo molecular “ômica” implica em uma análise abrangente de um conjunto de moléculas. A primeira “ômica” que surgiu foi a “genômica”, que consiste no estudo do conjunto total de genes encontrados em todos os organismos (Hasin, 2017). Outras “ômicas” utilizadas são a transcriptômica, a proteômica e o metabolômica.

A genômica analisa o DNA, já a transcriptômica estuda os transcritos. As proteínas são analisadas pela proteômica e por fim a metabolômica é responsável pela análise dos metabólitos (Pimenta, 2003).

O termo proteoma foi primeiramente utilizado em 1994 por Marc Wilkins, definido como o conteúdo proteico da célula. A proteômica é o estudo do conjunto completo de proteínas (proteoma) expressas por uma célula, tecido ou organismo em determinada situação (Wilkins, 1996; Wasinger, 1995). A maioria dos processos celulares são controlados por proteínas, podendo atuar como enzimas, anticorpos, hormônios entre outros (Emídio, 2015) e podem variar dependendo das condições às quais as células são expostas (Phisicky, 2003).

A presença ou a ausência de proteínas pode ajudar a entender processos celulares e a identificar alvos de compostos (Goez, 2018). Muitos fármacos existentes têm como alvo as proteínas, como por exemplo, o Glucantime, que pode atuar inibindo diversas enzimas de *Leishmania* (Passero, 2013).

Uma das técnicas mais utilizadas na análise proteômica é o gel de eletroforese bidimensional, que consiste em separar as proteínas por dois parâmetros diferentes: primeiro as proteínas são separadas de acordo com o

seu ponto isoelétrico (1ª dimensão) e depois pelo peso molecular (2ª dimensão) (Goez, 2018; James, 1997).

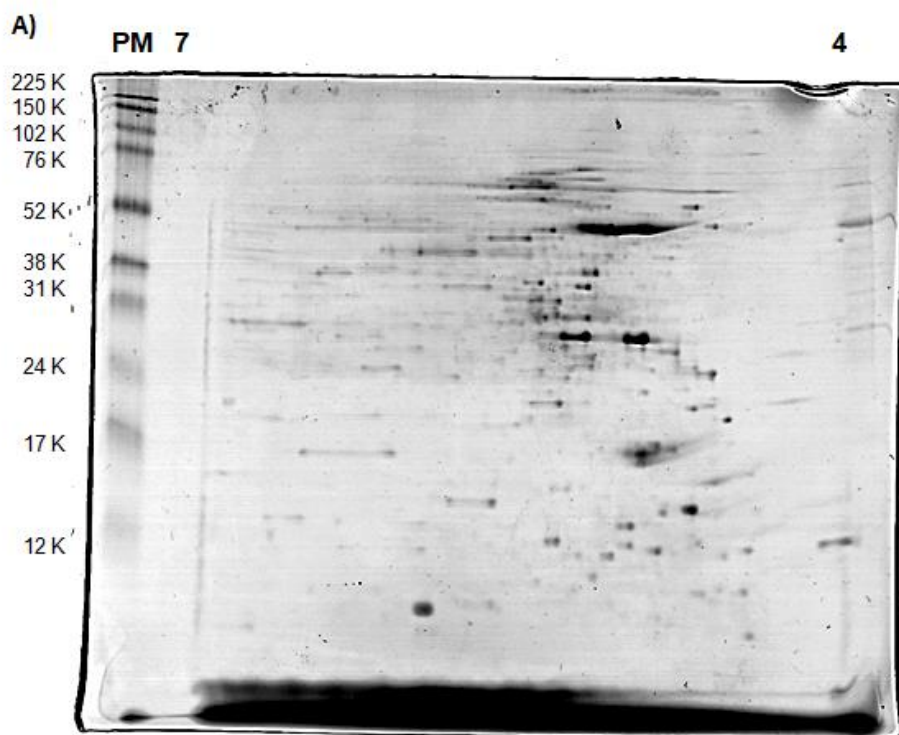
Estudos proteômicos vêm sendo utilizados para a compreensão de aspectos básicos ou aplicados referentes aos parasitos do gênero *Leishmania*. As abordagens incluem a compreensão de diferentes processos celulares, tais como diferenciação promastigota/amastigota (Rosenzweig, 2008), a caracterização de antígenos imunodominantes (Dea-ayuela, 2006) e mecanismos de ação e/ou resistência a fármacos (Drummelsmith, 2003).

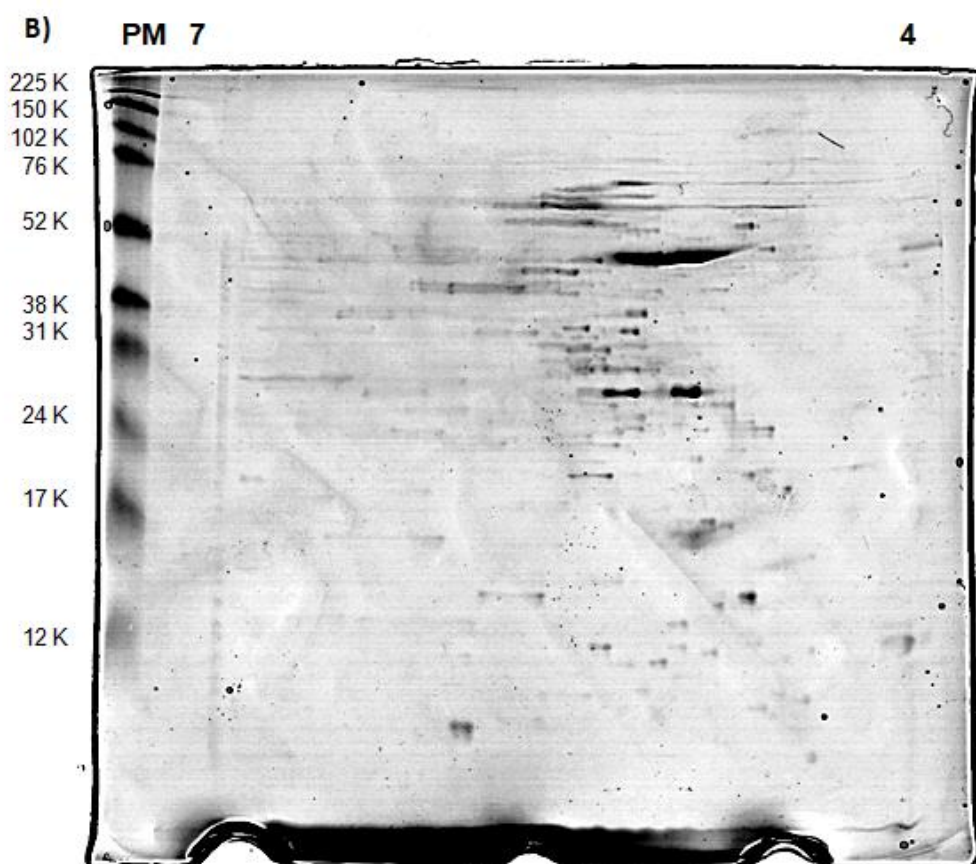
Com a intenção de compreender o mecanismo de ação do composto ciclopaladado, iniciou-se a investigação do perfil proteico de *L. (L.) infantum* tratado com o composto **CP2**. Para isso, formas promastigotas, foram cultivadas em meio Schneider até atingir a fase estacionária e tratadas com **CP2**, como controle foram utilizadas parasitos não tratados, e as garrafas foram incubadas por 72 horas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

Após a extração das proteínas foi realizada a dosagem das amostras utilizando-se o kit de quantificação 2D-QuantKit e ambas foram ajustadas para a concentração de 240 µg totais de proteína.

Primeiramente foi determinada a faixa de pH que proporcionasse melhor resolução. Para isso as proteínas foram eletrofocalizadas (1ª dimensão) em *strips* de ampla faixa de pH (3-10). Após separação por SDS-PAGE (12%) foi observado que a maior parte dos *spots* se encontrava na região de pH 4-7, portanto novos géis foram feitos utilizando essa faixa, como é possível observar na figura 22, géis tratados com o composto **CP2** e o controle.

Figura 22: Géis obtidos após separação de 240 µg de proteínas de *L. (L.) infantum* em *strips* de 17 cm pH 4-7 sendo: A) formas promastigotas tratadas com **CP2** e B) controle.





A análise comparativa entre os *spots* obtidos do controle com os obtidos após o tratamento com **CP2** revelou uma média de 15 *spots* diferencialmente expressos (tabela 5). Esses *spots* foram extraídos dos géis e processados para análise por espectrometria de massas em sistema LC-MS/MS e a identificação das proteínas foi realizada em bancos de dados do NCBI.

Tabela 5: *Spots* proteicos diferencialmente expressos obtidos por meio de eletroforese bidimensional e analisados por LC-MS/MS.

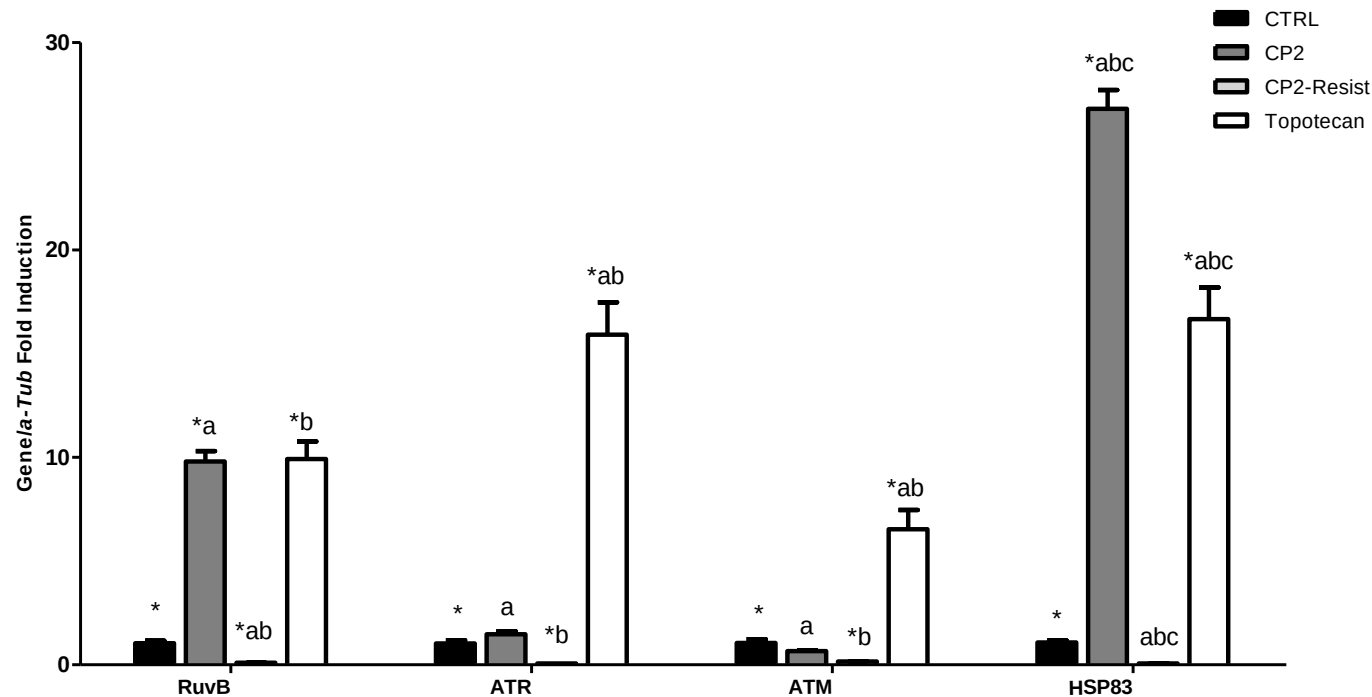
I.D.	Nome da proteína	Gene (TriTrypDB)	Função
1	Kinetoplastid membrane protein	KMP11-1	Defesa e regulação positiva da proliferação celular
2	Putative calpain-like cysteine peptidase	LINJ.14.0910	Envolvida com a regulação de cálcio em processos celulares
3	Alpha tubulin	LINJ.13.1460	Atividade GTPase, ligação de GTP e constituinte da estrutura do citoesqueleto
4	Beta tubulin	LINJ.08.1290	Atividade GTPase, ligação de GTP e constituinte da estrutura do citoesqueleto
5	Putative ribonucleoprotein p18_mitochondrial	LINJ.15.0320	Ribonucleoproteína
6	Tryparedoxin	TXN1	Envolvidas com a homeostase redox celular
7	Peroxidoxin	mTXNPx	Cataboliza peróxido de hidrogênio, homeostase redox celular
8	Putative ATP synthase_epsilon chain	LINJ.30.3660	Atividade de ATP sintase transportadora de protons, mecanismo de rotação molecular
9	Eukaryotic translation initiation factor 5A	EIF5A	Fator de iniciação e elongação translacional
10	Heat shock protein 83	HSP83	Chaperona, resposta ao estresse
11	Paraflagellar rod protein	LINJ.16.1510	Ligação de calmodulinas, motilidade
12	Putative calreticulin	LINJ.31.2670	Ligação de íons calcio
13	D-isomer specific 2-hydroxyacid dehydrogenase-like protein	LINJ.34.4360	Processos de oxidação e redução
14	RuvB-like helicase	LINJ.34.2440	Reparo do DNA, atividade de helicase, regulação da transcrição
15	Putative adenosine kinase	LINJ.30.0940	Atividade de adenosina quinase

A partir dos dados obtidos na tabela 5, duas proteínas nos chamaram a atenção: RuvB e HSP83. A proteína RuvB tem sua atividade envolvida, principalmente, no reparo do DNA, enquanto a chaperonina HSP83 (heat shock protein 83), está relacionada com resposta ao estresse. Ambas as proteínas estão envolvidas em um complexo denominado R2TP (que compreende as enzimas RuvB1 e RuvB2, HSP83, Pih1p e Tah1p), que é o responsável pela estabilização e montagem das PIKKs (quinases relacionadas à fosfatidilinositol-3-quinase) (Rivera-Calzada, 2017). As proteínas ATM e ATR, ambas pertencentes à família das lipase quinase fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), são conhecidas por serem os primeiros sinalizadores de quebras de fita dupla do DNA, (Lovejoy, 2009, Barzilai, 2004). Sendo assim, para validação dos dados proteômicos obtidos, selecionamos os genes que codificam as enzimas ATM, ATR, HSP83, RuvB e *TGMACK* e realizamos a análise dos níveis de transcritos desses genes. Para isso, realizamos ensaios de qPCR com a *L. (L.) infantum* selvagem e resistente, cultivadas na presença de **CP2** (figura 23), utilizando-se como controle o composto topotecan, inibidor classe 2 de TOPIB. Diferentemente de **CP2**, topotecan atua impedindo a religação do DNA, cuja atividade citotóxica é devida ao “aprisionamento” do complexo TOPI-DNA, levando a quebras na fita e consequentemente à morte celular (Kollmannsberger, 1999; Staker, 2002).

Os genes RuvB e HSP83 mostraram níveis muito elevados de transcritos, tanto na presença de **CP2** quanto na presença do topotecan. Verifica-se que ATR tem níveis mais elevados que o controle na presença de **CP2**, porém, inferior àqueles encontrados para topotecan. Como ATR está

relacionado a reparo de quebras de fita simples do DNA, é possível que os níveis de quebra provocados pela **CP2** sejam menores que aqueles provocados por topotecan, considerando que estes dois compostos apresentam mecanismos de inibição da TOP1 diferentes: **CP2** é catalítico (Velasquez, 2017) e topotecan estabiliza o complexo de clivagem, impedindo a religação do DNA (Kollmannsberger, 1999). Portanto, **CP2** pode, sim, estar gerando quebras no DNA, porém, por mecanismos diferentes daquele apresentado pelo topotecan.

Figura 23: Quantificação dos níveis relativos de expressão do cDNA dos genes RuvB, ATR, ATM e HSP83 por PCR em tempo real de formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. CTRL: ausência de tratamento; **CP2**: tratamento com valor do IC₅₀ do composto **CP2**; Topotecan: tratamento com valor do IC₅₀ do fármaco topotecan; e CP2-Resist: cepa resistente ao **CP2**. Os tratamentos foram realizados durante o período de 72 h. O gene de referência utilizado para todos os experimentos foi a alfa tubulina. *: diferença estatisticamente significativa com o controle; a: diferença estatisticamente significativa com **CP2**; b: diferença estatisticamente significativa com CP2-Resist e c: diferença estatisticamente significativa com topotecan, ($p > 0,01$).



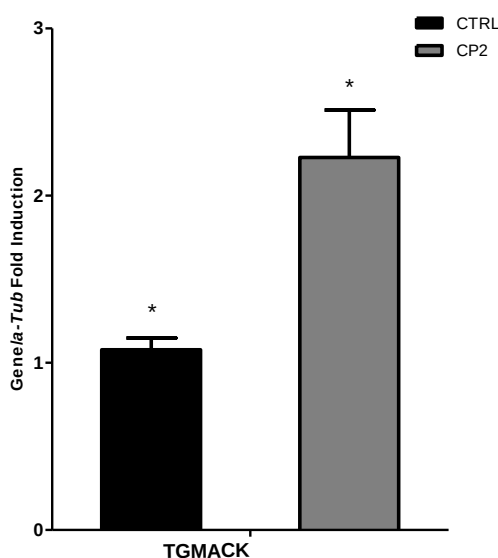
Resultados obtidos por Velasquez et al., (dados não mostrados), indicam que **CP2** pode estar produzindo EROs e devido a um desbalanço no Ca^{2+} intracelular de *Leishmania*, afetando a mitocôndria fazendo com que esta produza as EROs prejudicando o potencial de membrana mitocondrial.

Os dados obtidos nos ensaios de qPCR sugerem que, a partir da inibição da TOP, ocorre uma sequência de eventos que fazem com que a célula tente reparar o estresse causado pela ação do composto e, uma vez que a inibição é catalítica, pode estar desencadeando a produção de EROs levando a um estresse oxidativo.

Diferentemente da cepa selvagem, *Leishmanias* resistentes tiveram os níveis de transcritos de genes similares ao controle cultivado na ausência de **CP2**, o que indica que **CP2** está direta ou indiretamente implicado no estresse replicativo observado.

Interessante notar os níveis de expressão aumentados do gene de função desconhecida *TGMACK* (figura 24). Esse gene, anteriormente denominado Lc36 (Linj.36.4190), com 2219 pb, localizado no cromossomo 36 de *L. (L.) infantum*, codifica para uma proteína hipotética de 739 aminoácidos, e foi demonstrado ter potencial em desenvolvimento de testes diagnósticos (Nogueira, 2018; número do registro da patente: BR1020140228683).

Figura 24: Quantificação dos níveis relativos de expressão do cDNA do gene *TGMACK* por PCR em tempo real de formas promastigotas de *L. (L.) infantum*. CTRL: ausência de tratamento; **CP2**: tratamento com valor do IC₅₀ do composto **CP2**. O tratamento foi realizado durante 72 h. O gene de referência utilizado foi a alfa tubulina. *: diferença estatisticamente significativa com o controle, ($p > 0,01$).



Buscas realizadas em bancos de dados de domínio público (GeneDB, TritypDB, NCBI) sugerem similaridade de sequência com os genes hipotéticos LbrM2903.35.4490; LbrM2903.35.4500; LbrM.35.4231 de *L. (V.) braziliensis*; LdBPK.364190.1 de *L. (L.) donovani*; LmxM.36.3991 de *L. (L.) mexicana*; LtaP36.4110 de *L. tarentolae* e CfaC1.35.3670 de *Crithidia fasciculata*. O produto do gene *TGMACK* apresenta um domínio nucleotidiltransferase (número de acesso pfam01909), localizado entre os resíduos 220 e 270 da proteína, sendo que entre os resíduos 174 e 370 há outro domínio conservado similar ao domínio DNA polimerase sigma *TRF4* (número de acesso: COG5260), também conhecido pelos nomes Poli(A) RNA polimerase 2, DNA polimerase *kappa* e Topoisomerase 1-*TRF4* (Rajão, 2009). Este domínio Poli(A) RNA polimerase 2 é bastante

conservado em diferentes organismos e está associado à atividade de replicação, reparo de DNA (Sawaya, 1994) e controle transcricional pela via não canônica, via esta que adiciona uma cauda de poli(A) em RNAs, sinalizando-os para a degradação, como forma de sinalização em *Saccharomyces cerevisiae* (Castano, 1996; Vanacova, 2005). A sequência proteica de *TGMACK* apresenta 33% de similaridade à *TRF4* de *Saccharomyces cerevisiae* (E-value = $4,4 \times 10^{-6}$). Podem ser destacados ainda três resíduos conservados de aspartatos, essenciais para a atividade poli(A) polimerase; sendo que os dois primeiros estão separados por um aminoácido apolar (isoleucina-I, leucina-L, valina-V ou metionina -M). Esses pontos são funcionalmente importantes, pois participam de ligação com metais (magnésio ou manganês) (Rajão, 2009; Wang, 2002) e são essenciais para a atividade dessas enzimas (Sawaya, 1994; Lopes, 2008), de maneira que mutações nesses três aminoácidos levam a perda de função das mesmas (Wang, 2000; Kadaba, 2006). *TGMACK* apresenta também similaridade com o domínio central (CD), adjacente ao CAT ($hx-[I/L/V]-[E/Q]-[E/D/N]-PhxxxxNxx$) (Hamill, 2010), e assim como *TRF4* e *TRF5*, não possui o domínio RBD, podendo utilizar o domínio CD para interação com outras proteínas que participam da atividade polimerásica (Vanacova, 2005; Hamill, 2010; Nakel, 2015). Análise *in silico* para predição de localização celular da proteína Lc36, utilizando-se o banco de dados PSORT (www.psort.org), indicou uma probabilidade de 53% de *TGMACK* estar localizada no núcleo (Nakel, 2015; Bhasin, 2004), similar à *TRF4*, que também possui localização nuclear (Vanacova, 2005). Estudos preliminares conduzidos em nosso laboratório mostram que *TGMACK* é estágio-específico, sendo os níveis de expressão de seu mRNA maiores na fase amastigota, porém, este

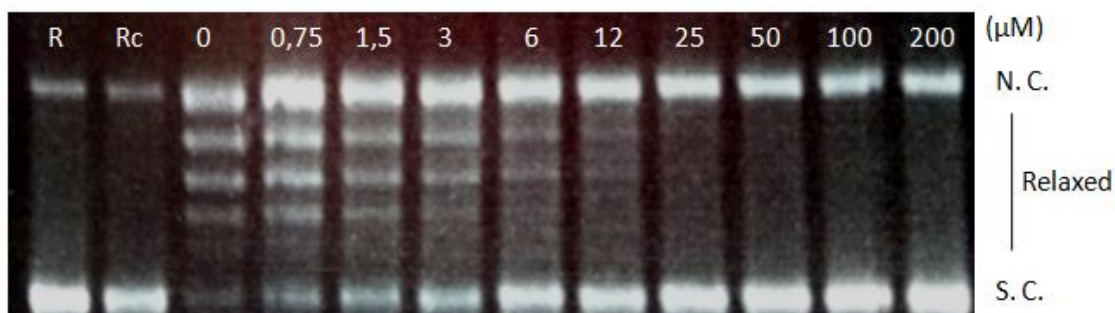
trabalho, pela primeira vez demonstrou que promastigotas expostas ao antileishmanial **CP2**, aumentam os níveis do mRNA *TGMACK*.

5.8 Efeito inibitório na topoisomerase IB de *L. (L.) donovani*.

Uma vez que o composto **CP2** apresentou atividade inibitória da enzima topoisomerase IB de *L. (L.) donovani* (*LdtopIB*) (Velasquez, 2017), decidiu-se testar se o composto **CP4**, que apresentou bons resultados na forma cutânea da doença, também apresentaria atividade na enzima topoisomerase.

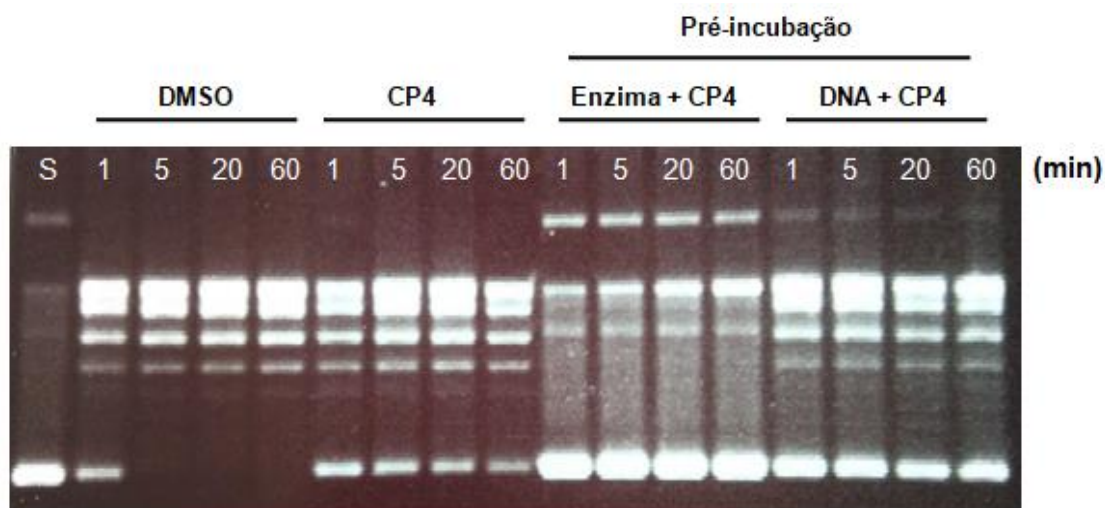
Na presença de **CP4**, a enzima *LdtopIB* mostrou reduzida capacidade em relaxar o substrato a partir da concentração de 0,75 μM , tornando-se completamente inativa em 25 μM (figura 25).

Figura 25: **CP4** e ensaio de inibição da *LdTopIB* (30 minutos de incubação a 37°C). Eletroforese de plasmídeo pBlueScript (0,5 $\mu\text{g/mL}$) em gel de agarose 1%, corado com Brometo de etídeo. R (DNA), Rc (DNA + **CP4**), 0 (DNA + *LdTopIB*), 0,75 (DNA + 0,75 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 1,5 (DNA + 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 3,0 (DNA + 3,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 6,0 (DNA + 6,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 12 (DNA + 12,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 25 (DNA + 25,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 50 (DNA + 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 100 (DNA + 100,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*), 200 (DNA + 200,0 $\mu\text{g/mL}$ de **CP4** + *LdTopIB*). A corrida eletroforética foi analisada sob iluminação ultravioleta. NC, nicked circular plasmid DNA; SC, supercoiled plasmid DNA.



Foi realizada uma pré-incubação da enzima e do **CP4** antes de adicionar o substrato e verificou-se um grande aumento na eficiência de inibição de *LdtopIB*, uma vez que a concentração de 0,75 μM foi suficiente para inibir completamente a enzima de *Leishmania* (Figura 26, poços 10-13). A pré-incubação do composto **CP4** com o DNA, antes da adição da enzima, não afetou o relaxamento do substrato pela enzima (Figura 26, poços 14-17). Como controle, os experimentos foram realizados na presença de DMSO (Figura 26, poços 2-5).

Figura 26: Ensaio de relaxamento de DNA em função do tempo foi realizado na presença de DMSO (poços 2-5), 0,75 μM de **CP4** (poços 6-9), 0,75 μM de **CP4** pré-incubado por 5 min com a enzima antes da adição do DNA (poços 10-13) e **CP4** a 0,75 μM pré-incubado por 5 min com DNA antes da adição da enzima (poços 14-17).



6 CONCLUSÕES

- O composto **CP2** apresentou os melhores valores de índice de seletividade tanto em formas promastigotas quanto em formas amastigotas;
- **CP2** reduziu em 50% a carga parasitária tanto no baço quanto no fígado, a partir da técnica da diluição limitante;
- Os valores de AST, ALT, ALP e creatinina estão dentro dos valores de referência para ambas as doses de **CP2** testadas, mostrando que a utilização do composto é segura;
- Análises histopatológicas demonstraram que o composto não apresenta toxicidade aos órgãos baço e fígado;
- Nas análises dos níveis de transcritos, os genes RuvB e HSP83 mostraram níveis muito mais elevados que o controle. O gene ATR também apresentou níveis superiores aos do controle;
- **CP2** inibe, de forma catalítica, a enzima DNA topoisomerase IB, desencadeando uma série de eventos que levam à morte do parasito;
- **CP4** foi capaz de inibir a atividade da enzima DNA topoisomerase IB.

REFERÊNCIAS

- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, v. 172, p. 86-90, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. **Plos Neglected Tropical Disease**, v. 10, n. 3, p. 1-40, 2016.
- AKHOUNDI, M. et al. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 57, p. 1-29, 2017.
- ALBERT, J. et al. Cyclopalladated and cycloplatinated benzophenone imines: Antitumor, antibacterial and antioxidant activities, DNA interaction and cathepsin B inhibition. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 80-88, 2014.
- ALMEIDA, E. T. et al. Self-assembly of organometallic Pd(II) complexes via CH₃...π interactions: The first example of a cyclopalladated compound with herringbone stacking pattern. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 10, n. 12, p. 1394-1398, 2007.
- ALMEIDA, L. et al. *In vivo* antileishmanial activity and histopathological evaluation in *Leishmania infantum* infected hamsters after treatment with a furoxan derivative. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 536-547, 2017.
- ALMEIDA, B. F. M. et al. Leishmaniasis causes oxidative stress and alteration of oxidative metabolism and viability of neutrophils in dogs. **The Veterinary Journal**, v. 198, p. 599-605, 2013.
- ALSFORD, S. A. M. et al. Genetic dissection of drug resistance in *Trypanosomes*. **Parasitology**, v. 140, p. 1478-1491, 2013.
- ALTEN, B. et al. Sampling strategies for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in Europe. **Bulletin of Entomological Research**, v. 105, n. 6, p. 664-678, 2015.
- ANDARGIE, T. E.; EJARA, E. D. Pro- and Anti-inflammatory Cytokines in Visceral Leishmaniasis. **Journal of Cell Science & Therapy**, v. 6, n. 3, p. 1-8, 2015.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109-118, 2012.

ASSCHE, T. V. et al. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

BAILEY, H.; BISHOP, W. J. Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis. **The British Journal of Venereal Diseases**, v. 35, n. 8, p. 8-9, 1959.

BALAÑA-FOUCE, R. et al. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, p. 326-337, 2014.

BARRA, C. V. et al. Dna Binding, Topoisomerase Inhibition And Cytotoxicity of Palladium(II) Complexes with 1,10-Phenanthroline and Thioureas. **Inorganic Chimica Acta**, v. 446, n. 1, p. 54-60, 2016.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, v. 3, p. 1109-1115, 2004.

BEATTIE, L.; KAYE, P. M. Leishmania–host interactions: what has imaging taught us?. **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659-1667, 2011.

BERTRAND, B. et al. Cytotoxicity of Pyrazine-Based Cyclometalated (C^NPz^C)Au(III) Carbene Complexes: Impact of the Nature of the Ancillary Ligand on the Biological Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 56, p. 5728-5740, 2017.

BHASIN, M.; RAGHAVA, G. P. ESLpred: SVM-based method for subcellular localization of eukaryotic proteins using dipeptide composition and PSI-BLAST. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W414-W419, 2004.

BIBILONI, M. M. et al. Relation between Liver Transaminases and Dyslipidaemia among 2-10 y.o. Northern Mexican Children. **Plos One**, v. 11, n. 5, p. 1-12, 2016.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKSEN, C. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **The World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BISCEGLIE, F. et al. Quinoline-2-carboxaldehyde thiosemicarbazones and their Cu(II) and Ni(II) complexes as topoisomerase IIa inhibitors. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 152, p. 10-19, 2015.

BOECKEN, G. et al. Diagnosis and therapy of cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis in Germany. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 8, p. 1-51, 2011.

BORBOREMA, S. E. T. et al. Antimonial drugs entrapped into phosphatidylserine liposomes: physicochemical evaluation and antileishmanial

activity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 2, p. 196-203, 2016.

BORGHI, S. M. et al. Leishmania infection: painful or painless?. **Parasitology Research**, v. 116, n. 2, p. 465-475, 2017.

BRILHANTE, A. F. et al. Epidemiological aspects of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in an endemic area of forest extractivist culture in western Brazilian Amazonia. **Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine**, v. 13, n. 59, p. 1-9, 2017.

CARBALLEIRA, N. M. et al. Synthesis of Marine α -Methoxylated Fatty Acid Analogs that Effectively Inhibit the Topoisomerase IB from *Leishmania donovani* with a Mechanism Different from that of Camptothecin. **Marine Drugs**, v. 11, n. 10, p. 3661-3675, 2013.

CARDOSO, R. M. et al. Expanding the knowledge about Leishmania species in wild mammals and dogs in the Brazilian savannah. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 171, p. 1-8, 2015.

CASTANO, I. B. et al. Mitotic chromosome condensation in the rDNA requires TRF4 and DNA topoisomerase I in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes & Development**, v. 10, p. 2564-2576, 1996.

CASTELLI, S.; VASSALLO, O.; KATKAR, P.; CHE, C. M.; SUN, R. W. Y.; DESIDERI, A. Inhibition of human DNA topoisomerase IB by a cyclometalated gold III compound: analysis on the different steps of the enzyme catalytic cycle. **Biochemistry and Biophysics**, v. 516, n. 2, p. 108-112, 2011.

CAVALLI, A.; BOLOGNESI, M. L. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 23, p. 7339-7359, 2009.

CELIS, R.; ROMO, D.; ROMERO, E. Blind colour separation of H&E stained histological images by linearly transforming the colour space. **Journal of Microscopy**, v. 260, n. 3, p. 377-388, 2015.

CHAHED, M. K. et al. Psychological and Psychosocial Consequences of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis among Women in Tunisia: Preliminary Findings from an Exploratory Study. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1-16, 2016.

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. **Annual Review Biochemistry**, v.70, p. 369-413, 2001.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

CHEN, D. et al. Sequential Difunctionalization of 2-Iodobiphenyls by Exploiting the Reactivities of a Palladacycle and an Acyclic Arylpalladium Species.

Organic Letters, v. 18, n. 9, p. 2130-2133, 2016.

CHENG, B. et al. Inhibition of Zn(II) Binding Type IA Topoisomerases by Organomercury Compounds and Hg(II). **PloS One**, v. 10, n. 3, p. 1-14, 2015.

CHIMENTO, A. et al. Inhibition of human topoisomerase I and II and anti-proliferative effects on MCF-7 cells by new titanocene complexes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, n 23, p. 7302-7312, 2015.

CHOWDHURY, S. et al. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **Molecular Medicine**, v. 4, n. 10, p. 1126-1143, 2012.

CHOWDHURY, S. et al. Implication of vector characteristics of *Phlebotomus argentipes* in the kala-azar elimination programme in the Indian subcontinent. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 3, p. 87-96, 2016.

COELHO, A. C. et al. *Leishmania* is not prone to develop resistance to tamoxifen. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 5, p. 77-83, 2015.

COSTA, M. A. et al. Ancient Leishmaniasis in a Highland Desert of Northern Chile. **Plos One**, v. 4, n. 9, p. 1-7, 2009.

DALTON, R. N. Creatinina sérica e taxa de filtração glomerular: percepção e realidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 8-11, 2011.

D'ANNESSA, I.; CASTELLI, S.; DESIDERI, A. Topoisomerase 1B as a target against leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 203-210, 2015.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 149, n. 3, p. 139-146, 2007.

DAS, B. B. et al. Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1-11, 2006.

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. **Journal of Medicinal Chemistry**, n. 61, p. 804-817, 2018.

DAWIT, G.; GIRMA, Z.; SIMENEW, K. A Review on Biology, Epidemiology and Public Health Significance of Leishmaniasis. **Bacteriology & Parasitology**, v. 4, n. 2, p. 1-7, 2013.

DEA-AYUELA, M. A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; BOLAS-FERNANDEZ, F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. **Proteomics**, v. 6, p. 4187-4194, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. **Clinics in Dermatology**, v. 14, n. 5, p. 417-423, 1996.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 276, p. 1-12, 2012.

DRUMMELSMITH, J. et al. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 2, p. 146-155, 2003.

DUTRA, L. A. et al. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4837-4847, 2014.

EGOROVA, K. S.; ANANIKOV, V. P. Which Metals are Green for Catalysis? Comparison of the Toxicities of Ni, Cu, Fe, Pd, Pt, Rh, and Au Salts. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 40, p. 12150-12162, 2016.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **The Journal of Infection Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961-972, 2014.

EMIDIO, N. B. et al. Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações. **HU Revista**, v. 41, n. 3-4, p. 101-111, 2015.

ENNES-VIDAL, V. et al. Why calpain inhibitors are interesting leading compounds to search for new therapeutic options to treat leishmaniasis?. **Parasitology**, v. 144, n. 2, p. 117-123, 2017.

FLUIT, A. D. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. Molecular detection of antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 836-871, 2001.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Topic:** Novel drug approvals for 2017. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm537040.htm>>. Acesso em 16 out. 2017

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Topic:** Novel drug approvals for 2017. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm592464.htm>>. Acesso em 18 mar. 2018.

GARCIA, V. S. et al. Development of a simple and economical diagnostic test for canine leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 182, p. 9-15, 2017.

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion on Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473-479, 2010.

GOEZ, M. M. et al. Preprocessing of 2-Dimensional Gel Electrophoresis Images Applied to Proteomic Analysis: A Review. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, v. S1672, n. 18, p. 1-10, 2018.

GONZÁLEZ, K. et al. Survey of Wild Mammal Hosts of Cutaneous Leishmaniasis Parasites in Panamá and Costa Rica. **Tropical Medicine and Health**, v. 43, n. 1, p. 75–78, 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 615-623, 2004.

HAMILL, S.; WOLIN, S. L.; REINISCH, K. M. Structure and function of the polymerase core of TRAMP, a RNA surveillance complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 15045-15050, 2010.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. **Genome Biology**, v. 18, n. 83, p. 1-15, 2017.

HERNANDEZ-PANDO, R. et al. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. **Immunology**, v. 100, n. 3, p. 352-358, 2000.

HOFSTRAAT, K.; BRAKEL, W. H. Social stigma towards neglected tropical diseases: a systematic review. **International health**, v. 8, n. 1, p. 53-70, 2016.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. 72, p. 1-9, 2012.

JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and disease. **Nature**, v. 46, n. 7267, p. 1071-1078, 2009.

JAMES, P. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 30, n. 4, p. 279-331, 1997.

JEAN-MORENO, V. et al. *Leishmania donovani*: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, n. 112, p. 21-30, 2006.

KADABA, S.; WANG, X. Y.; ANDERSON, J. T. Nuclear RNA surveillance in *Saccharomyces cerevisiae*: Trf4p-dependent polyadenylation of nascent hypomethylated tRNA and an aberrant form of 5S rRNA. **RNA**, v. 12, n. 3, p. 508-521, 2006.

KHADKA, D. B. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 1,3-diarylisoquinolines as novel topoisomerase I catalytic inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 200-215, 2018.

KHANNA, K. K.; JACKSON, S. P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nature Genetics**, v. 27, n. 3, p. 247-254, 2001.

KOLLMANNSBERGER, C. et al. Topotecan – A Novel Topoisomerase I Inhibitor: Pharmacology and Clinical Experience. **Oncology**, v. 56, p. 1-12, 1999.

LANIADO-LABORÍN, R.; CABRALES-VARGAS, M. N. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223-227, 2009.

LAZAREVIC, T.; RILAK, A.; BUGARCIC, Z. Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 142, p. 8-31, 2017.

LEE, K. E. et al Cyclopalladated azido complexes containing C,N-donor (HC~N=2-(2- ϕ -thienyl)pyridine, azobenzene, 3,3'-dimethyl azobenzene, N,N'-dimethylbenzylamine, 2-phenylpyridine) ligands: reactivity towards organic unsaturated compounds and catalytic properties. **Dalton Transactions**, v. 33, p. 6578-6592, 2009.

LEISHMAN, W. B. On the Possibility of the Occurrence of Trypanosomiasis in India. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2213, p. 1252-1254, 1903.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80-82, 1997.

LINDOSO, J. A. L. et al. Leishmaniasis–HIVcoinfection: current challenges. **HIV/AIDS**, v. 2016, n. 8, 147-156, 2016.

LOPES, D. O. et al. Biochemical studies with DNA polymerase beta and DNA polymerase beta-PAK of Trypanosoma cruzi suggest the involvement of these proteins in mitochondrial DNA maintenance. **DNA Repair**, v. 7, p. 1882-1892, 2008.

LOVEJOY, C. A.; CORTEZ, D. Common mechanisms of PIKK regulation. **DNA repair**, v. 8, n. 9, p. 1004-1008, 2009.

LUNAGARIYA, M. V. et al. Synthesis, characterization and biological application of cyclometalated heteroleptic platinum(II) complexes. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 1-18, 2017.

MANSUETO, P. et al. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 563-581, 2014.

MATESANZ, A. I.; LEITAO, I.; SOUZA, P. Palladium(II) and platinum(II) bis(thiosemicarbazone) complexes of the 2,6-diacetylpyridine series with high cytotoxic activity in cisplatin resistant A2780cisR tumor cells and reduced toxicity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 125, p. 26-31, 2013.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 107, n. 1, p. 7-14, 2014.

MILLER, A. M. Reversible hepatotoxicity related to amphotericin B. **Canadian Medical Association Journal**, v. 131, p. 1245-1247, 1984.

MULLER, J.; HEMPHILL, A. Drug target identification in intracellular and extracellular protozoan parasites. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2029-2038, 2011.

MURRAY, H. W.; NATHAN, A. F. Macrophage Microbicidal Mechanisms In Vivo: Reactive Nitrogen versus Oxygen Intermediates in the Killing of Intracellular Visceral *Leishmania donovani*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

MURRAY, H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249-267, 2001.

NAKEL, K. et al. Structural basis for the activation of the *C. elegans* noncanonical cytoplasmic poly(A)-polymerase GLD-2 by GLD-3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, p. 8614-8619, 2015.

NERLICH, A. G. et al. Visceral Leishmaniasis during Italian Renaissance, 1522-1562. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 184-186, 2012.

NOGUEIRA, C. T. et al. Potential application of rLc36 protein for diagnosis of canine visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 3, p. 197-201, 2018.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 3, p. 489-493, 2016.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, p. 257-266, 2004.

OZKOL, H. et al. Protective Effects of Selenium, *N*-Acetylcysteine and Vitamin E Against Acute Ethanol Intoxication in Rats. **Biological Trace Element Research**, v. 175, n. 1, p. 177-185, 2016.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925-932, 2016.

PAI-DHUNGAT, J. V.; PARIKH, F. Kala-Azar (Leishmaniasis). **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 63, p. 105, 2015.

PHIZICKY, E. et al. Protein analysis on a proteomic scale. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 208-215, 2003.

PALADI, C. S. et al. *In vitro* and *In vivo* activity of a pallacycle complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, p. 1-7, 2012.

PASSALACQUA, T. G. et al. The 2',4'-dihydroxychalcone could be explored to develop new inhibitors against the glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania* species. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 17, p. 3564-3568, 2015a.

PASSALACQUA, T. G. et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3342-3345, 2015b.

PASSERO, L. F. D. et al. In Vivo Antileishmanial Activity of Plant-Based Secondary Metabolites. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and their Components**, v. 1, p. 95-107, 2013.

PASSOS-SILVA, D. G. et al. Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania major*. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, n. 840768, p. 1- 14, 2010.

PIMENTA, A. M. C. Proteôma. **Ciência Hoje**, v. 32, n. 192, p. 16-22, 2003.

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

RAJAO, M. A. et al. DNA polymerase kappa from *Trypanosoma cruzi* localizes to the mitochondria, bypasses 8-oxoguanine lesions and performs DNA synthesis in a recombination intermediate. **Molecular Microbiology**, v. 71, p. 185-197, 2009.

REZENDE, J. M. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. **Ética Revista**, v. 5, n. 1, p. 21-22, 2008.

REGUERA, R. M. et al. Type I DNA topoisomerase from protozoan pathogens as a potential target for anti-tumoral drugs. **Medicina-Buenos Aires**, v. 67, n. 6, p. 747-757, 2007.

RIVERA-CALZADA, A. et al. The Structure of the R2TP Complex Defines a Platform for Recruiting Diverse Client Proteins to the HSP90 Molecular Chaperone System. **Structure**, v. 25, n. 7, p. 1145-1152, 2017.

ROQUE, A. L.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251-262, 2014.

ROSENZWEIG, D. et al. Retooling *Leishmania* metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The FASEB Journal**, v. 22, p. 1-13, 2008.

ROSS, R. Note on the Bodies recently described by Leishman and Donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261-1262, 1903.

ROTUREAU, B. et al. First Report of *Leishmania infantum* in French Guiana: Canine Visceral Leishmaniasis Imported from the Old World. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 1120–1122, 2006.

SAHA, S. et al. The lignan glycosides lyoniside and saracoside poison the unusual type IB topoisomerase of *Leishmania donovani* and kill the parasite both in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 12, p. 1663-1687, 2013.

SAWAYA, M. R. et al. Crystal-structure of rat DNA-polymerase-beta-evidence for a common polymerase mechanism. **Science**, v. 264, p. 1930-1935, 1994.

SENGUPTA, S. et al. ATP independent type IB topoisomerase of *Leishmania donovani* is stimulated by ATP: an insight into the functional mechanism. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 8, p. 295-309, 2011.

SEYYEDTABAEI, S. J. et al. Detection of Potentially Diagnostic Leishmania Antigens with Western Blot Analysis of Sera from Patients with Cutaneous and Visceral Leishmaniasis. **Iran Journal of Parasitology**, v. 12, n. 2, p. 206-214, 2017.

SOTIL, E. U.; JENSEN, D. M. Serum enzymes associated with cholestasis. **Clinics in Liver Disease**, v. 8, p. 41-54, 2004.

SOULAT, D.; BOGDAN, C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1838, p. 1-21, 2017.

STAKER, B. L. et al. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15387-15392, 2002.

STEBUT, E. V. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, v. 13, p. 191-200, 2015.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 82, p. 1-10, 2017.

STEWART, L.; IRETON, G. C.; CHAMPOUX, J. J. Reconstitution of human topoisomerase I by fragment complementation. **Journal Molecular Biology**, v. 269, n. 3, p. 355–372, 1997.

SUNDAR, S.; RAI, M. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 593-598, 2002.

TANAKA, M. et al. Anti-cancer effects of newly developed chemotherapeutic agent, glycoconjugated palladium (II) complex, against cisplatin-resistant gastric cancer cells. **BMC Cancer**, v. 13, n. 237, p. 1-9, 2013.

TREU-FILHO, O. et al. Experimental and theoretical study of the compound [Pd(dmba)(NCO)(imz)]. **Journal of Molecular Structure**, v. 829, p. 195-201, 2007.

ULUKAYA, E. et al. Differential Cytotoxic Activity of a Novel Palladium-Based Compound on Prostate Cell Lines, Primary Prostate Epithelial Cells and Prostate Stem Cells. **Plos one**, v. 8, n. 5, p. 1-13, 2013.

VANACOVA, S. et al. A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. **Plos Biology**, v. 3, p. 986-997, 2005.

VANAERSCHOT, M. et al. Drug resistance in vectorborne parasites: multiple actors and scenarios for an evolutionary arms race. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 38, n. 1, p. 41-55, 2014.

VELAZQUES, A. M. A. et al. Antiprotozoal Activity of the Cyclopalladated Complexes Against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 6, p. 1032-1039, 2016.

VELASQUEZ, 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1-15, 2017.

WANG, Z. H. et al. Structure/function analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* Trf4/Pol sigma DNA polymerase. **Genetics**, v. 160, p. 381-391, 2002.

WASINGER, V. C. et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. **Electrophoresis**, v. 16, p. 1090-1094, 1995.

WILKINS, M. R. et al. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. **Biotechnology**, v. 1, p. 61-65, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. 2010a. Disponível em: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf>. Acesso em 25 nov. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic: Control of the leishmaniasis**. 2010b. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>. Acesso em 17 ago. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic: Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update**. 2011. Disponível em:

<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/Leishmaniasis_worldwide_epidemiological_and_drug_access_update.pdf>. Acesso em 20 dez. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em 18 out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic**: Leishmaniasis: The vector. 2014a. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/vector/en/>>. Acesso em 12 out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic**: Leishmaniasis: The disease and its epidemiology. 2014b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/>. Acesso em 11 jul. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic**: Leishmaniasis: Epidemiological situation. 2015a. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em 15 fev. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2015**. 2015b. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf>. Acesso em 07 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2015**. 2015c. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf>. Acesso em 07 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic**: Weekly epidemiological record. 2016, v. 91, n. 22, p. 285-296. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf>>. Acesso em 15 jun. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Topic**: Leishmaniasis. 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em 09 maio 2017.

ZINK, A. R. et al. Tickborne Encephalitis Virus, Northeastern Italy. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 10, p. 1617, 2006.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516-1531, 2017.

Apêndice I

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 11/2015

Interessado: THAIS GABAN PASSALACQUA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia A. S. Graminha

Projeto: Atividade in vitro e in vivo em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e avaliação do perfil protéico a partir do uso de um composto bioinorgânico

Parecer nº 18/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 14 de abril de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Atividade in vitro e in vivo em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e avaliação do perfil protéico a partir do uso de um composto bioinorgânico”, apresentado pela pós-graduanda THAIS GABAN PASSALACQUA, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Márcia A. S. Graminha, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em JULHO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 22 de abril de 2015.



Prof Dr CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA

Apêndice II

Protocolo CEUA/FCF/CAr nº 11/2015

Interessado: THAIS GABAN PASSALACQUA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Márcia A. S. Graminha

Projeto: Atividade in vitro e in vivo em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e avaliação do perfil protéico a partir do uso de um composto bioinorgânico

Parecer nº 44/2015 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP (campus Araraquara), reunida em 19 de maio de 2015, considerou que o protocolo para uso de animais na pesquisa: “Atividade in vitro e in vivo em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* e avaliação do perfil protéico a partir do uso de um composto bioinorgânico”, apresentado pela pós-graduanda THAIS GABAN PASSALACQUA, sob orientação da Professora Doutora Márcia A. S. Graminha, do Departamento de Análises Clínicas desta Faculdade, está estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua execução.

O relatório final do protocolo de pesquisa deverá ser entregue em MAIO de 2016 em formulário para este fim.

Araraquara, 27 de maio de 2015.



Prof Dr CARLOS CESAR CRESTANI
Coordenador da CEUA