

LIGIA FERREIRA MARTINS

Avaliação *in vitro* do potencial anti-*Leishmania infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos sintéticos marinhos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

São Paulo

2016

LIGIA FERREIRA MARTINS

Avaliação *in vitro* do potencial anti-*Leishmania infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos sintéticos marinhos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Martins, Ligia Ferreira

Avaliação in vitro do potencial anti-*Leishmania infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos sintéticos marinhos / Ligia Ferreira Martins. – 2016.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças. São Paulo, 2016.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

1. *Leishmania infantum* 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Farmacologia 4. Metabolismo Energético 5. Mitocôndrias 6. Bioensaio

SES/CCD/CD-327/2016

“Agradeço a todas as dificuldades que enfrentei; se não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar.”

(Chico Xavier)

“O cientista é um elemento essencial a Ciência, além de ser dotado de um cérebro imaginativo, possui sentimentos, emoções...”

(Desconhecido)

Dedido este trabalho aos meus pais, irmãos, cunhado, sobrinhos e aos pacientes com Leishmaniose em todo o mundo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos pais Antônia e Gilberto pelo grande apoio, amor, paciência, incentivo, carinho e compreensão ao longo da minha vida inteira;

Aos meus irmãos Rodrigo e Liege, e ao meu cunhado Adonai por todo apoio, incentivo e companheirismo;

Aos meus sobrinhos João Pedro e Maria Eduarda, amor maior não existe;

À toda minha família pelo imenso amor que me doam durante toda minha vida;

Ao meu orientador professor doutor André Gustavo Tempone pela oportunidade, confiança, apoio, conhecimento, compreensão, amizade e carinho nos diversos obstáculos que encontramos ao longo desse trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura;

À Capes pela bolsa de doutorado concedida;

Ao professor doutor Andres Jimenez Galisteo Jr e à aluna de doutorado Nahiara Esteves Zorgifor pelos experimentos que envolveram citometria de fluxo;

Aos técnicos de laboratório Matília Nascimento e Vicente Duarte pela assistência e ajuda laboratorial prestada, além das longas conversas, risadas e muito trabalho;

Aos funcionários da Seção de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz pela convivência;

Às minhas amigas do laboratório de Toxinologia Aplicada Daiane, Daniela, Érika, Juliana, Marta, Viviane, Sônia, Thaís e Tatiana por toda ajuda que me deram;

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular Cida, Cristina, Gabriela, Kate, Luís, Lilian, Margarete, Marta, Jeferson, Lucas e Ricardo. Obrigada pela ajuda de todos, pelas risadas e conversas;

Obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Resumo

A leishmaniose e a doença de Chagas são infecções causadas por protozoários que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. São encontradas em regiões tropicais e subtropicais, afetando populações menos favorecidas e causando alta mortalidade e morbidade. Considerando o restrito arsenal terapêutico na leishmaniose e a elevada toxicidade dos fármacos disponíveis para seu tratamento, verifica-se a necessidade urgente da pesquisa de novas terapias. Compostos marinhos apresentam elevado potencial antiparasitários. A complexidade estrutural, juntamente com as atividades biológicas relatadas de compostos guanidínicos os tornam alvo de escolha para os estudos de desenho de fármacos. O presente trabalho teve como objetivo estudar a atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos guanidínicos sintetizados com base em protótipos marinhos naturais. Dentre os 14 compostos testados contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, onze mostraram atividade. O composto mais ativo foi o BA-22, apresentando CE_{50} no valor de 3 μM , já o menos ativo foi o composto BA-1, com valor de 88 μM . Os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30, GB-118 e PMH-6 apresentaram valores de CE_{50} inferior a 10 μM . Os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30 apresentam baixa citotoxicidade e altos índices de selectividade (IS), entre 12 e 28. Estudos na literatura também vêm demonstrando a atividade anti-*Leishmania* de compostos guanidínicos. Em nossos estudos, dos 14 compostos testados, 9 (64%) mostraram atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, e 6 (42%) contra as formas amastigotas, sendo a última a forma clinicamente relevante; destes, 4 (28,5%) resultaram em CE_{50} mais interessantes, pois apresentaram valores menores que 10 μM . Formas intracelulares de *Leishmania (L.) infantum* foram avaliadas, resultando em uma CE_{50} entre 2,3 e 18,8 μM . Os compostos apresentaram moderada a baixa citotoxicidade contra células de NCTC apresentando valores entre 42,2 μM e > 150 μM . Para investigar se esta atividade particular contra os amastigotas poderia estar relacionada com uma possível atividade imunomoduladora dos compostos em células hospedeiras, avaliou-se a produção de citocinas por macrófagos na presença compostos EB-3 e GB-118, que foram os compostos mais seletivos. Em nossos estudos, os compostos EB-3 e GB-118 não induziram regulação de NO em macrófagos, sugerindo que não há ativação deste mediador pelas células hospedeiras para que os compostos exerçam um efeito letal no parasita. Além disso, a análise em citometria de fluxo demonstrou que os compostos EB-3 e GB-118 suprimiram significativamente a produção de citocinas TNF, IFN- γ e da quimiocina MCP-1 no macrófago, não alterando significativamente os níveis de IL-6 e IL-10. Dado que a atividade dos compostos EB-3 e GB-118 não foi decorrente de uma ativação de macrófagos, estudou-se outros possíveis alvos celulares em *Leishmania (L.) infantum*. Ambos os compostos causaram despolarização do potencial de membrana mitocondrial, aumentaram os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) e houve aumento da permeabilidade da membrana plasmática nos parasitos. Estes dados *in vitro* demonstraram que os compostos EB-3 e GB-118 afetaram o metabolismo bioenergético de *Leishmania (L.) infantum*, com eliminação seletiva dos parasitos através de um mecanismo hospedeiro-independente.

Palavras chave: leishmaniose, *Leishmania infantum*, mecanismo de ação.

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic protozoan infection, found in tropical and subtropical regions, affecting the poorest population causing high mortality and morbidity. Considering the small number of drugs in clinical use against Leishmaniasis and their high toxicity and long-duration treatments, the need for new therapeutics is urgent. In this work we study synthetic guanidine derivative of marine invertebrates, in particular are by the most prolific source of all natural guanidine derivatives. The structural complexity of these compounds and their potent biological activities make these compounds a target of choice for studies in organic synthesis. Among 14 guanidines compounds 9 showed activity against promastigotes of *Leishmania* and 11 against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, with IC_{50} ranging between 6.6 - 109.3 μ M and 3.6 - 88.5 μ M respectively. Intracellular forms of *Leishmania (L.) infantum* were also evaluated, showing IC_{50} between 2.3 and 18.8 μ M. The compounds displayed moderate to low cytotoxicity against mammalian cells in the range between 42.2 μ M to > 150 μ M. To investigate particular activity against amastigotes could be related to a possible immunomodulatory activity of the compounds in host cells, we evaluated the production of cytokines by macrophages in the presence of compounds EB-3 and GB-118, which was the most selective compounds. In our studies, EB-3, and GB-118 induced no regulation in macrophages, suggesting that no activation of the mediator by the host. Furthermore, the analysis in flow cytometry demonstrated that EB-3 compounds and GB-118 significantly suppressed the production of TNF cytokines, $IFN-\gamma$ and chemokine MCP-1 in the macrophage, not significantly altering IL-6 levels and IL-10. whereas the activity of EB-3 and GB-118 compounds were not due to an activation of macrophages, he studied other potential cellular targets in *Leishmania (L.) infantum*. Both compounds caused depolarization of the mitochondrial membrane potential, increased levels Reactive oxygen species (ROS) and there was increased permeability of the plasma membrane in parasites. These in vitro data demonstrate that the EB-3 and GB-118 compounds affected the bioenergy metabolism of *Leishmania (L.) infantum*, by selective elimination of the parasites via a host-independent mechanism.

Key words: leishmaniasis, *Leishmania infantum*, mechanism of action

Lista de abreviações e siglas

CE₅₀	Concentração efetiva 50%
CE₉₉	Concentração efetiva 99%
DMSO	Dimetilsulfóxido
IS	Índice de seletividade
mg	Miligramas
mg/mL	Miligramas por mililitros
MS	Ministério da Saúde
M -199	Meio 199
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão de fosfato salino
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
µL	Microlitros
µg/mL	Microgramas por mililitros
µM	Micromolar
V/V	Volume por volume

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição global da leishmaniose visceral segundo levantamento de número de casos realizados pela OMS entre 2005-2009	11
Figura 2. Forma promastigota em cultura celular (A) e da forma amastigota em lâminas provenientes de baço de Hamster dourado (B) de <i>Leishmanias</i> sp.....	14
Figura 3. Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i> sp.....	15
Figura 4. Organização estrutural da forma promastigota e amastigota de <i>Leishmania</i> sp destacando a disposição das organelas	16
Figura 5. Representação esquemática do sistema de transporte de elétrons (complexos I, II, III, IV) e do sistema fosforilativo (complexo V)	20
Figura 6. Mecanismo enzimático da ação da enzima iNOS	22
Figura 7. Reconhecimento das formas promastigotas pelo macrófago, evidenciando a interação entre moléculas superficiais do parasito, como a gp63 e LPG, e os receptores da célula hospedeira, CR1 e CR3. gp63 – glicoproteína de 63kDa; Fn - fibronectina; FnR – receptor de fibronectina; LPK – proteína cinase de <i>Leishmania</i> ; C5b-9 (MAC) – complexo de ataque à membrana; C3bi – fator C3b do complemento inativado; C3b - fator C3b do complemento; CR1 – receptor do fator 1 de complemento; CR3 - receptor do fator 3 do complemento	23
Figura 8. Distribuição global da Doença de Chagas, áreas endêmicas	30
Figura 9. Ciclo de vida dos parasitos <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
Figura 10. Estrutura química dos compostos guanidínicos sintéticos.....	44
Figura 11. Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX green®. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por *(p<0,0001) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo	58
Figura 12. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> utilizando a sonda Rhodamine 123 realizada após uma hora de incubação com os compostos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * (p<0,001) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo	59

Figura 13. Avaliação da produção de ROS em promastigotas de *L. (L.) infantum* utilizando a sonda H2DCF-DA realizada após 120min de incubação com os compostos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por *($p < 0,001$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo 60

Figura 14. Macrófagos peritoneais foram incubadas com os compostos durante 24 h. Reação de Griess foi utilizado para medir a produção de NO em relação a determinação estável da produção de Nitrito (NO₂). * $p < 0,05$61

Figura 15. Quantificação da produção das citocinas MCP-1 e IFN- γ em macrófagos não infectados ou infectados com *Leishmania (L.) infantum*, co-cultivados ou não com linfócitos, determinados pelo do tratamento (IC₂₅) com os compostos EB-3 (30 μ M) e GB-118 (15 μ M). Os resultados são expressos em pg / mL e as citocinas foram quantificadas pelo Kit CBA (citometria de Beads Array). Lipopolissacáridos de *Escherichia coli* (LPS-SIGMA) para macrófagos e Concanavalina A (ConA) para linfócitos (1 μ M / ml) foram usados como controle.....63

Lista de tabela

Tabela 1. Atividade antiparasitária e citotoxicidade de compostos guanidínicos sintéticos56

Índice

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Leishmaniose	11
1.2. Leishmaniose Visceral.....	12
1.3. O ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.....	13
1.4. Biologia celular da <i>Leishmania</i>	13
1.4.1. Formas promastigotas e amastigotas	16
1.4.2. Membrana plasmática	17
1.4.3. Mitocôndria e o metabolismo energético da <i>Leishmania</i>	17
1.5. Interação parasito-hospedeiro	22
1.6. Manifestações clínicas	26
1.7. Tratamento.....	26
2.0. Doença de Chagas.....	29
2.1. Ciclo biológico	30
2.2. Manifestações clínicas	32
2.3. Tratamento.....	33
3.0. Desafios e estratégias para o estudo de novas terapias para Leishmaniose e Doença de Chagas.....	35
3.1. Produtos naturais como protótipos de fármacos.....	36
3.2. Organismos marinhos como protótipos de fármacos.....	38
4.0. Justificativa.....	41
2. OBJETIVOS	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Reagentes e compostos sintéticos	43
3.2. Síntese de compostos guanidínicos	43
3.2.1. Análise Computacional In silico: Predição de compostos de interferência (PAINS) e Agentes Agregantes	45
3.3. Parasitos	45
3.4. Animais de experimentação	45
3.5. Células de mamíferos NCTC.....	46
3.6. Determinação in vitro da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE50) dos diferentes compostos	46
3.7. Determinação da CE ₅₀ de compostos ativos em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	47
3.8. Avaliação da Citotoxicidade.....	48
3.9. Ensaio de mecanismo de ação em promastigotas de <i>Leishmania (L.) Infantum</i> ... 49	
3.9.1. Avaliação de permeabilidade de membrana plasmática.....	49
3.9.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	50
3.9.3. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	50
3.10. Determinação da resposta imunomodulatória.....	51
3.10.1. Óxido Nítrico (NO)	51
3.10.2. Ensaio de resposta imuno-celular: macrófagos peritoneais co-cultivados com linfócitos e infecção in vitro.....	52
3.10.3. Análise da Resposta Celular: Citocinas por Citometria de Fluxo	52
3.11. Análise estatística	53
4. RESULTADOS	54
4.1. Determinação in vitro da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE50) dos Diferentes Compostos.....	54
4.2. Determinação da CE50 de Compostos Ativos em Macrófagos Peritoneais Infectados com <i>L. (L.) infantum</i>	54

4.3. Avaliação da Citotoxicidade.....	55
4.4. Avaliação dos mecanismos de ação dos compostos EB-3 e GB-118 em Leishmania (L.) infantum.....	57
4.4.1. Alteração da permeabilidade de membrana plasmática	57
4.4.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial.....	58
4.4.3. Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	59
4.5. Determinação da resposta imunomodulatória.....	60
4.5.1. Quantificação de Oxido Nitrico (NO).....	60
4.5.2. Resposta imuno-celular: macrófagos peritoneais co-cultivados com células não aderentes de baço e infecção <i>in vitro</i>	61
4.6. Análise Computacional In silico: Predição de compostos de interferência (PAINS) e Agentes Agregantes	64
5. DISCUSSÃO.....	65
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
8. ANEXOS.....	101

1.0) Introdução

1.1) Leishmaniose

As leishmanioses são doenças parasitárias consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) um importante problema de Saúde Pública Mundial. Compreendem um grupo de patologias causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania* e são transmitidas por insetos vetores da ordem Diptera conhecidos como flebótomos (OMS, 2010).,,

Atualmente a leishmaniose ocorre em 98 países e cerca de 350 milhões de pessoas estão em situação de risco de adquirir a infecção. A doença pode ser classificada em quatro formas clínicas: cutânea, cutânea difusa, mucocutânea e visceral ou calazar (OMS, 2015) (Figura 1).

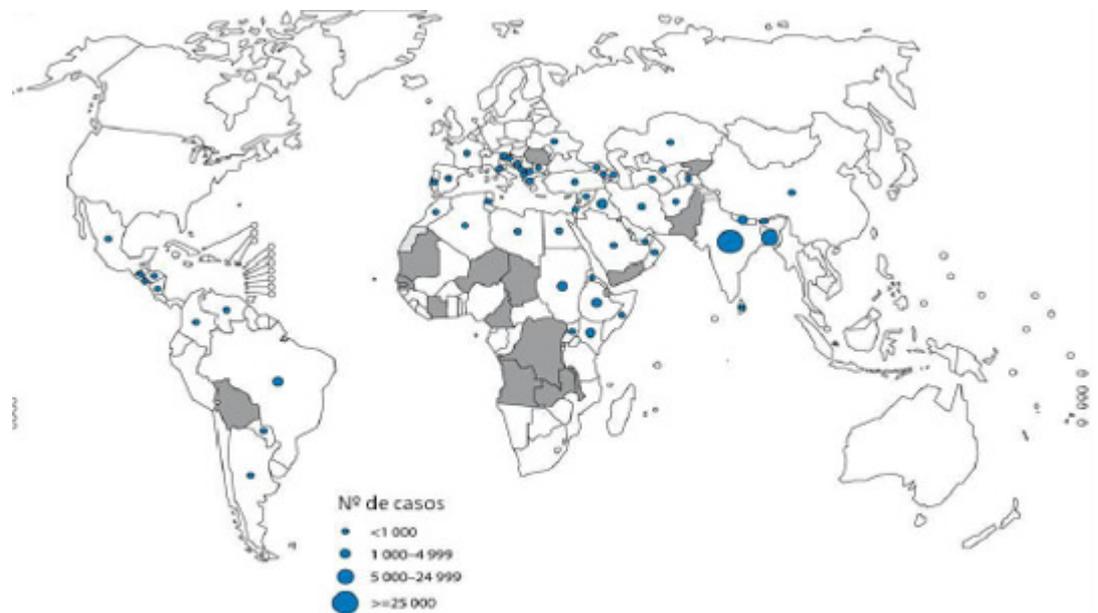


Figura 1- Distribuição global da leishmaniose visceral segundo levantamento de número de casos realizados pela OMS entre 2005-2009. Fonte: OMS (2015)

1.2) Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é a forma mais grave das leishmanioses, podendo ser fatal se não tratada. É causada pelos parasitos *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* (Jain & Jain, 2015). É uma protozoose que apresenta vários cenários epidemiológicos. Atualmente, dependendo da região geográfica pode se caracterizar como doença emergente, re-emergente ou "permanecente". Esta diversidade de padrão deve-se em parte ao fato de que, assim como outras doenças metaxênicas, ou seja, parte do seu ciclo acontece no vetor obrigatoriamente, a leishmaniose visceral quase foi extinta nos anos 1950 e 1960, em virtude do intenso uso do DDT que a princípio reduziu a população de flebotomíneos, à desestabilização dos ecótonos naturais e a intensa mobilização de fontes/reservatórios inter e intra países, o que favoreceu, a re-emergência da enfermidade em focos antigos e a emergência em novos espaços sob a forma epidêmica, intensa e persistente (Barreto et al., 1996; Carmo et al., 2003; OMS 2010). A forma zoonótica da doença, causado pela *Leishmania (L.) infantum*, existe na região do Mediterrâneo e do continente Americano enquanto a forma antroponótica, causada por *Leishmania donovani*, é prevalente nos continentes Asiático e Africano, incluindo a Índia, Nepal, Bangladesh e da África Oriental (Van Griensven and Diro, 2012).

A leishmaniose visceral é relatada em mais de 70 países dos 5 continentes Também foi encontrada em países como Timor Leste (Chevalier et al., 2000), Tailândia (Kongkaew et al., 2007) e em cangurus na Austrália (Rose et al., 2004). Em geral, estima-se que ocorram cerca de 500 mil novos casos anualmente com estimativa de 50 mil mortes. Noventa por cento de todos os casos ocorrem em seis países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (Figura 2). Com uma estimativa de 300 mil casos por ano, a Índia é onde ocorre o maior número de casos (Van Griensven and Diro, 2012).

O Brasil é o principal responsável pela maioria dos casos registrados na América Latina e, segundo o Ministério da Saúde, a leishmaniose

Visceral inicialmente tinha um caráter rural e, nos últimos anos vem se expandindo para áreas urbanas de médio e grande porte (Brasil, 2004). Casos autóctones são notificados em, pelo menos, 19 estados da Federação, distribuídos em quatro, das cinco regiões, permanecendo indene apenas a Sul (Queiroz et al., 2004; Brasil, 2006). A maior incidência encontra-se na região Nordeste (70% do total de casos), onde a doença constitui-se um importante problema de saúde pública, cuja letalidade pode alcançar 10% quando não se institui o tratamento adequado (Brasil, 2006).

1.3) O ciclo biológico da *Leishmania* sp

O protozoário *Leishmania* apresenta ciclo biológico heteroxeno, alternando-se em um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. De acordo com a fase do ciclo de vida, o parasito apresenta duas formas estruturais: promastigota e amastigota (Figura 3) que se replicam por divisão binária em seus respectivos hospedeiros (Rey, 2008). As formas promastigotas são extracelulares, flageladas e móveis, encontram-se aderidas ao epitélio do intestino médio no sistema digestório do inseto vetor e são denominadas formas procíclicas (não-infectiva). Gradualmente, os promastigotas procíclicos sofrem modificações morfológicas, bioquímicas e moleculares se diferenciando para formas promastigotas metacíclicos (infectivas), num processo denominado de metaciclogênese. Durante este processo de diferenciação, as formas promastigotas destacam-se do epitélio intestinal e migram em direção à porção anterior do aparelho digestivo do inseto vetor; neste momento, elas estão completamente diferenciadas em formas promastigotas metacíclicas (infectiva) e assim ficam disponíveis para a infecção. No momento do repasto sanguíneo, o inseto vetor repassa as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado, onde terão de subverter os mecanismos de defesa inatos, ou seja, resistir à ação lítica pelo complemento até que sejam fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear (Teixeira et al., 2013). Dentro da célula hospedeira, as formas promastigotas irão se diferenciar em amastigotas no interior dos vacúolos

parasitóforos. Para a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas dentro das células, fatores como aumento da temperatura e diminuição do pH são cruciais para sobrevivência das mesmas e assim a divisão binária dos amastigotas ocorre até a ruptura da célula hospedeira. Os amastigotas, que são células arredondadas obrigatoriamente intracelulares e com flagelo reduzido e interno, são então fagocitados por outras células da linhagem macrofágica tanto localmente quanto em tecidos distantes após a disseminação, assim, o flebotomíneo ao realizar novamente o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, ingere junto ao sangue, macrófagos infectados, perpetuando o ciclo biológico dos parasitos (Figura 4) (Lainson e Shaw,1987; Sacks e Kamhawi, 2001 e Rey, 2008; Teixeira et al., 2013).

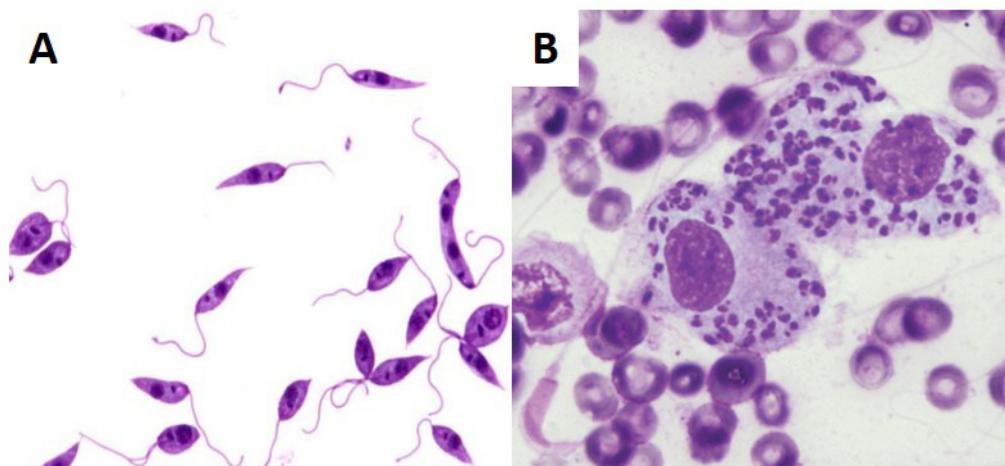


Figura 2: Forma promastigota de *Leishmanias* sp (A) e forma amastigota de *Leishmanias* sp em lâminas provenientes de baço de Hamster dourado (B) de *Leishmanias* sp. Fonte: internet: (A) <http://classconnection.s3.amazonaws.com/53291/flashcards/796063/jpg/Leishmaniadonovanipromastigotes.jpg> e (B) MS, 2006, respectivamente.

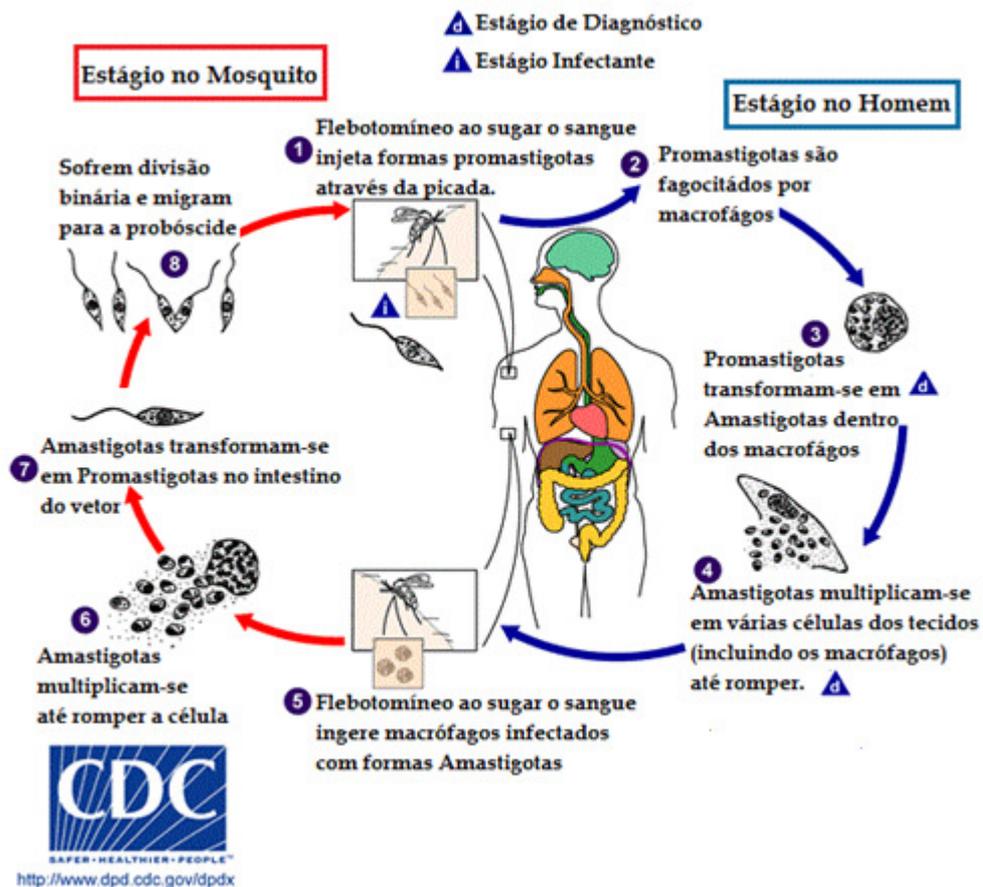


Figura 3- Ciclo de vida do parasito *Leishmania sp.* Fonte: Adaptado de CDC, 2010.

1.4) Biologia celular da *Leishmania sp*

1.4.1) Morfologia das formas promastigotas e amastigotas

As formas promastigotas (Figura 5-A) são extracelulares, alongadas e livres e apresentam dimensões entre 14 e 20 μm de comprimento e 1,5 a 4 μm de largura. Essas células possuem a parte posterior mais delgada e a extremidade anterior um pouco mais arredonda de onde se origina o flagelo, tendo esta, função de dar motilidade e auxiliar no processo de fixação no epitélio do intestino do inseto vetor, bem como nas células do sistema fagocítico mononuclear. O núcleo fica situado no terço médio da célula e o cinetoplasto encontra-se anterior ao núcleo, próximo à bolsa flagelar. Como todas as células eucarióticas, possuem organelas típicas tais como

mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e citoesqueleto. No entanto, a forma promastigota possui algumas estruturas exclusivas da família Trypanosomidae como cinetoplasto, estrutura paraflagelar, glicossomo e microtúbulos subpeculares (Rey, 2008; Teixeira et al., 2013).

A forma amastigota (Figura 5-B) é intracelular, arredondada e pouco móvel e possui dimensões geralmente de 2 a 6µm de comprimento e 1,5 a 3µm de largura. O flagelo é curto e emergindo da bolsa flagelar podendo ser visto apenas por microscopia eletrônica. O núcleo é excêntrico e geralmente contém dois nucléolos e abundante material granuloso forrando a membrana nuclear. O cinetoplasto, de aspecto baciliforme ou curvo situa-se diante do núcleo. Os amastigotas apresentam todas as organelas e estruturas semelhantes aos promastigotas, com exceção dos megassomos presentes nos amastigotas e ausentes nos promastigotas, e a estrutura paraflagelar, que está ausente nos amastigotas (Rey, 2008).

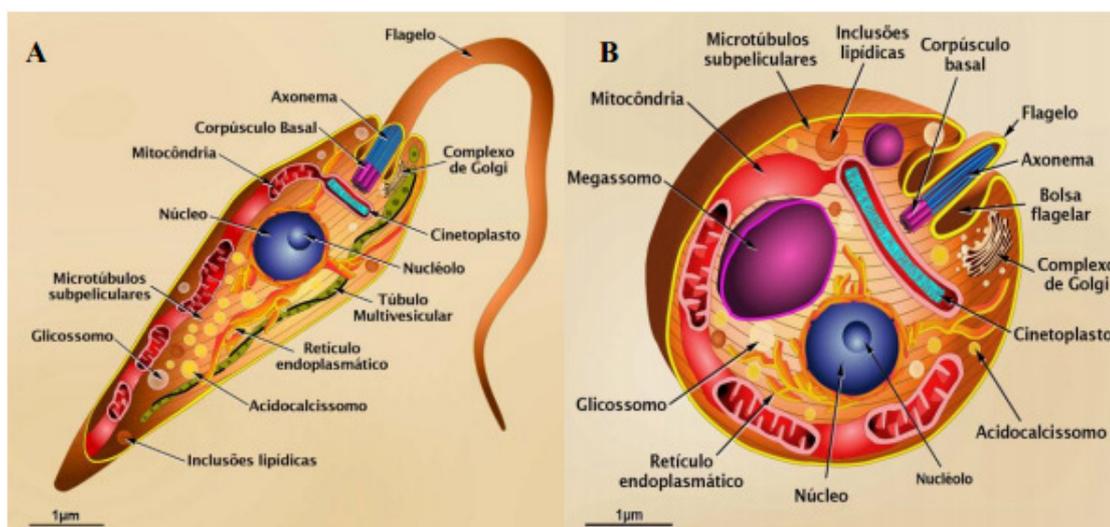


Figura 4: Organização estrutural da forma promastigota (A) e amastigota (B) de *Leishmania spp*, destacando a disposição das organelas. Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013.

1.4.2) Membrana plasmática

Toda a célula, seja procarionte ou eucarionte, apresenta uma membrana plasmática que a isola do meio exterior. Essa membrana é fina com dimensões entre 6 a 9 nm. Similar aos outros organismos, a membrana plasmática dos protozoários do gênero *Leishmania*, é constituída de proteínas, lipídeos e carboidratos (de Souza & Brasil, 1976).

A membrana celular é unitária e sustentada em sua face interna por vários microtúbulos, distribuídos paralelamente de um extremo ao outro do protozoário (Rey, 2008). Os lipídios predominantes na *Leishmania* são os fosfolipídios, correspondendo à aproximadamente 70% do total (Wassef et al., 1985; Beach et al., 1979). Neste grupo se encontram os fosfatidilcolinas (30 a 40%), fosfatidiletanolamina (~10%) e os fosfatidilinositois (~10%) (Zhang & Berveley, 2010). O restante está dividido entre os lipídios neutros, dos quais aproximadamente 60% correspondem à esteróis, e os glicolipídios que juntamente com as proteínas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GP63) fazem parte dos glicoconjugados de superfície, sendo importantes para o processo de infecção do parasito (Yoneyama, et al., 2006).

1.4.3) Mitocôndria e o metabolismo energético da *Leishmania*

A diferença morfológica mais marcante entre células eucarióticas superiores e os tripanossomatídeos é número relativo de mitocôndrias existentes. Inúmeras mitocôndrias podem ser observadas em células de mamíferos, representando cerca de 20% do volume total celular, ao passo que apenas uma única organela ramificada é observada nos tripanossomatídeos, onde se pode observar o DNA mitocondrial condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo – nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central - chamado cinetoplasto, onde fica armazenado o kDNA (Simpson, 1972; de Souza et al., 2009, Menna Barreto & Castro, 2014). A informação genômica mitocondrial está contida no kDNA, que representa cerca de 30% do DNA celular. A estrutura

morfológica aparece como uma forma de disco na matriz mitocondrial e consiste em pequenas moléculas circulares de tamanho uniforme, mais ou menos com 0,45 μm de comprimento, correspondendo a 1440 pares de bases e com peso molecular de $0,94 \times 10^6\text{Da}$ (Fidalgo & Gille, 2011).

A mitocôndria é uma organela que possui uma membrana mitocondrial externa, a qual constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol e separa o espaço intermembranar. O espaço intermembranar, cuja composição iônica é semelhante à do citosol, contém um distinto grupo de proteínas. Também possui uma membrana mitocondrial interna paralela à membrana externa, permeável ao oxigênio, dióxido de carbono e água. Pequenas porções desta membrana invaginam para o interior da matriz como cristas mitocondriais, onde estão localizados o sistema de elétrons, o sistema fosforilativo e os transportadores membranares. A matriz mitocondrial contém as enzimas metabólicas, o DNA e o RNA mitocondrial, onde os genes codificam algumas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Lesnefsky et al., 2001). Entre as proteínas mais estudadas destaca-se: ferro superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), citocromo b5 (CytB5) e citocromo P450 (CYP) (Mesquita-Rodrigues et al., 2013).

A mitocôndria possui um papel chave na regulação da sobrevivência e morte celular, uma vez que a manutenção do potencial de membrana mitocondrial é indispensável para a sobrevivência gerando a síntese ATP e mantendo a fosforilação oxidativa. A respiração mitocondrial ocorre via cadeia transportadora de elétrons através de quatro complexos proteicos localizados na membrana mitocondrial interna. Os complexos I, III e IV funcionam como bombas de prótons H^+ gerando um gradiente eletroquímico que direciona a síntese de ATP na F0F1-ATP sintase, acoplando assim a respiração e a fosforilação oxidativa (Sen & Majumder, 2008; Roy et al., 2008).

Na *Leishmania*, a mitocôndria está envolvida em diversos processos e vias metabólicas, tais como: 1) conversão do piruvato a acetil-CoA, processo este catalisado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; 2)

ciclo do ácido cítrico; 3) fosforilação oxidativa, que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória acoplada à síntese de ATP; 4) degradação dos ácidos graxos; 5) ciclo da uréia; 6) fornecimento de intermediários metabólicos à célula; 7) armazenamento de cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático a um nível baixo e constante; 8) síntese de DNA, RNA e proteínas; 9) reparação do DNA e 10) formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pedersen, 1999).

O ciclo de vida da *Leishmania* adapta seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de substratos disponíveis. A energia do metabolismo dos tripanossomatídeos é especial, pois grande parte da glicólise ocorre no glicosomo (Tielens & van Hellemond 2009). Durante o ciclo, há grandes variações de oxigênio, visto que vias sanguíneas possuem muito oxigênio, enquanto certos estágios, como no inseto, podem se confrontar com condições de hipóxia. As formas promastigotas de *Leishmania* possuem baixa capacidade funcional anaeróbica e dependem da respiração mitocondrial para gerar energia (van Hellemond et al., 1997, van Hellemond & Tielens, 1997). Recentemente, Chakraborty e colaboradores, 2010 sugeriram que a forma amastigota de *Leishmania* é menos dependente de energia respiratória, esta pode ser a razão pela qual as células se adaptaram tão bem dentro dos fagolisossomos, onde ocorrem persistentes condições de hipoxias.

Em geral, em mitocôndrias de mamíferos, a cadeia de transporte de elétrons (CTE) é composta por quatro elétrons integrantes dos complexos na membrana mitocondrial interna: Complexo I (NADH: ubiquinona desidrogenase), Complexo II (succinato: ubiquinona oxidoreductase), Complexo III ou citocromo b_{c1} (ubiquinol: citocromo c^{3+} oxidoreductase) e Complexo IV (citocromo-oxidase c^{2+}), com ubiquinona (coenzima Q) e citocromo c, funcionando como transportadores de elétrons entre os complexos (Mather et al., 2007). Os dinucleotídeos de nicotinamida adenina (NADH) e o succinato conduzem os elétrons para os complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente, resultando na liberação de prótons para o interior da matriz e na transferência de elétrons para o transportador

mais próximo na cadeia respiratória, a Coenzima Q (CoQ), que transfere os elétrons entre estes dois complexos e o complexo III. Posteriormente, os elétrons são transferidos para o citocromo c e finalmente para o complexo IV onde ocorre mais entrada de prótons. É no complexo IV que o O_2 , fornecido na respiração pelo sistema circulatório, funciona como receptor de elétrons e se liga aos prótons existentes na matriz levando à formação de H_2O . Assim, o transporte de elétrons através dos complexos respiratórios tem como finalidade a transferência de energia dos substratos energéticos existentes na matriz mitocondrial para uma forma de energia (gradiente eletroquímico de H^+) que poderá ser utilizada para fosforilar o ADP. As mitocôndrias produzem ATP através da associação entre o gradiente de prótons, gerado pela respiração, e a fosforilação oxidativa do ADP pelo complexo V (F_0F_1 ATPase ou ATPsintase) (Dey et al., 2010) (Figura 6).

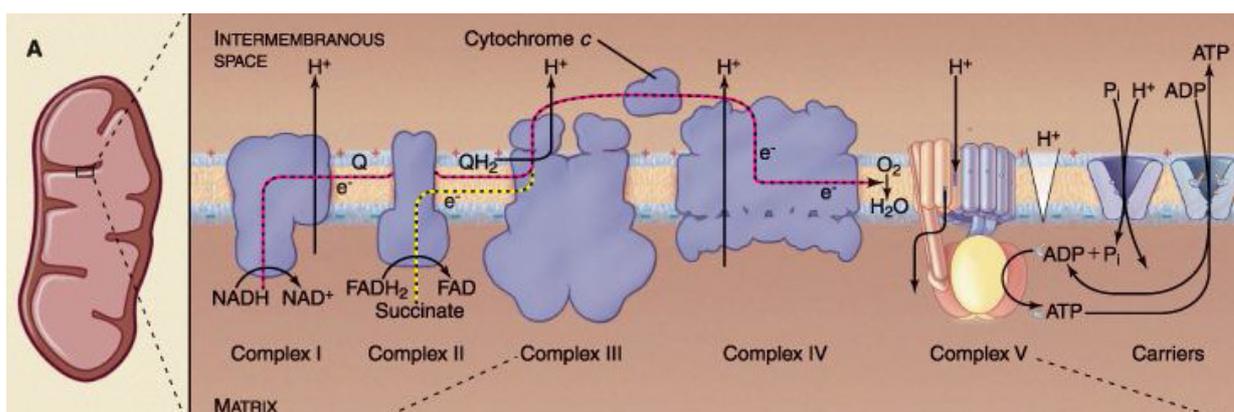


Figura 5: Representação esquemática do sistema de transporte de elétrons (complexos I, II, III, IV) e do sistema fosforilativo (complexo V). Fonte: Scarano, 2008.

Em protozoários, a cadeia de transporte de elétrons tem particularidades que a tornam um alvo promissor para pesquisa de fármacos. Um deles é o complexo I onde o NADH: quinona oxidoredutase é insensível à rotenona (substância que inibi o NADH-qredutase), o que não acontece em células de mamíferos (Abrahamsen et al., 2004; Chen et al., 2001). Estudos bioquímicos básicos mostraram que em protozoários o complexo II está presente e demonstram a ausência completa do complexo I (NADH ubiquinona redutase), uma vez que o transporte de elétrons é

limitado entre os complexos I-III, o succinato pode ser um doador de elétrons para a produção de energia primária. No entanto, nos parasitos, o succinato pode prover do fumarato através da fumarato redutase (FRD). Esta enzima foi encontrada em *Leishmania donovani* (Santhamma & Bhaduri, 1995) e *Trypanosoma brucei* (Turrens, 1987) e está ausente em mitocôndrias de mamíferos.

A disfunção da cadeia de transporte de elétrons pode resultar em liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas mitocôndrias. O desvio de elétrons a partir dos complexos mitocondriais é a principal fonte de ROS endógena (Gille et al., 2001). Para estudo do mecanismo de ação por essa via é feita uma análise da produção de ROS, uma sonda específica é utilizada, a DCFH₂, na qual reage diretamente com O₂⁻ e H₂O (Fidalgo & Gille, 2011). Em tripanossomatídeos, utilizando a sonda, a inibição aparece no complexo II, o que possivelmente está relacionado com a produção de ROS. Dentro das células eucarióticas superiores, os complexos envolvidos para produção de ROS são os complexos I e III (Chen et al., 2003), o que representa mais uma diferença entre tripanosomatídeos e eucariotos superiores.

ROS são formados por um radical superóxido (O₂⁻) e seus derivados como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (HO[•]), hipoclorito (OCl⁻) e peroxinitrito (ONOO⁻) e esses derivados são importantes na sinalização de que algo vai errado com a célula e a sua acumulação conduz ao stress oxidativo causado por uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial da *Leishmania* (Mesquita et al., 2013). *Leishmania (L.) infantum* adota mecanismos de defesa para lidar com o estresse oxidativo, incluindo a expressão de enzimas antioxidantes como tripanotiona (T (SH)₂) (Olin-Sandoval et al., 2010), superóxido dismutase (Mehlotra, 1996), peroxidases (Krauth-Siegel et al., 2007), tripanotiona S-transferase (Vickers et al., 2004) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) (Dardonville et al., 2003). Alguns desses mecanismos de expressão enzimática estão localizados nas mitocôndrias como ferro superóxido dismutase (FeSODA) (Mishra, et al., 2013) e peroxiredoxina (Castro, 2011).

1.5) Interação parasito-hospedeiro

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, e apresentam tropismo por macrófagos, mas também infectam fibroblastos, neutrófilos e células dendríticas (Silva, 2010; Charmoy et al., 2010). Ao entrar em contato com o agente infeccioso, os macrófagos sofrem alterações morfológicas características da ativação celular, o complexo de Golgi fica bem desenvolvido, os lisossomos abundantes e o retículo endoplasmático se torna proeminente e essas alterações são acompanhadas pelo rearranjo do citoesqueleto (Gruenheid & Finlay, 2003; Lazaro-Diequez, et al., 2008)

Em resposta à estimulação de vários agentes, os macrófagos produzem uma serie de produtos citotóxicos incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^\bullet), hipoclorito (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$), denominado estresse oxidativo. Também ocorre a produção de NO através da ativação de iNOS que converte L-arginina em NO e L-citrulina (FIGURA 7) (Mosser & Edwards, 2008; Heinsbroek & Gordon, 2009)

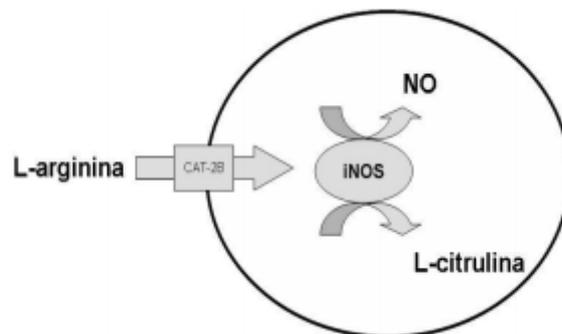


Figura 6: Mecanismo enzimático da ação da enzima iNOS. Passero, et al., 2011

O processo de fagocitose se inicia através de receptores presentes na membrana do macrófago, a aderência do parasito ao macrófago é mediada pelo receptor CR3 do complemento e induz uma a supressão da síntese da IL-12, uma das principais citocinas responsáveis pela ativação linfócitos T

auxiliares do tipo 1, além de inibir a ação dos metabólitos do oxigênio (como ex., o peróxido de hidrogênio) no interior da célula fagocítica. A presença da glicoproteína gp63 na superfície da forma metacíclica por um lado ativa o sistema complemento, entretanto, mais uma vez, favorece a fagocitose pelos macrófagos permitindo que o parasita inicie a multiplicação no interior do mesmo (Cunningham, 2002; Liu & Uzonna, 2012).

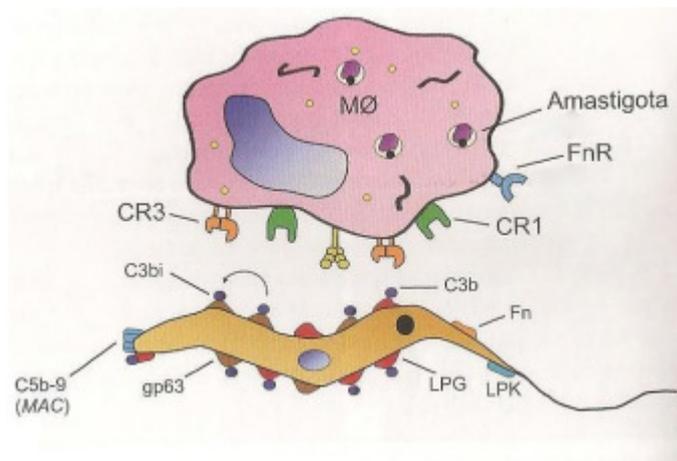


Figura 7: Reconhecimento das formas promastigotas pelo macrófago, evidenciando a interação entre moléculas superficiais do parasito, como a gp63 e LPG, e os receptores da célula hospedeira, CR1 e CR3. gp63 – glicoproteína de 63kDa; Fn - fibronectina; FnR – receptor de fibronectina; LPK – proteína cinase de *Leishmania*; C5b-9 (MAC) – complexo de ataque à membrana; C3bi – fator C3b do complemento inativado; C3b - fator C3b do complemento; CR1 – receptor do fator 1 de complemento; CR3 - receptor do fator 3 do complemento. Fonte: Passero, et al., 2011.

Parasitas do gênero *Leishmania* utilizam eficazmente a resposta imune do hospedeiro para estabelecimento da infecção dentro do macrófago. Uma vez fagocitados, eles manipulam o ambiente através da inibição das enzimas hidrolíticas, produtos metabólicos tóxicos, sinalização celular, produção de citocinas e outros eventos. Essas estratégias permitem a sobrevivência do parasita no interior da célula hospedeira e progressão da doença (FIGURA 8) (Cunningham, 2002).

O controle da infecção por *Leishmania* é dependente da resposta imune mediada por células. Uma citocina importante na resposta imune à

Leishmania é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4⁺ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos, células TCD4⁺ do tipo Th1 produzem IFN- γ , que ativará macrófagos, os quais passarão a expressar a enzima óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2). Esta enzima induzirá a produção de óxido nítrico (NO), e conseqüentemente os microorganismos intracelulares serão eliminados. A liberação de NO leva à morte do parasita em macrófagos, que podem também ser estimulados pela ação de quimiocinas como MCP-1 e MIP-1 α (Bogdan et al., 2000; Brandonisio et al., 2002). As quimiocinas constituem um grupo de proteínas estruturalmente definidos, com 8 a 10 kDa e atuam como quimioatrativos para monócitos e neutrófilos. A proteína inflamatória de macrófagos (MIP) - 1 α e a proteína quimiotática de monócitos (MCP) -1 pertencem à subfamília de quimiocinas CC e são ativadores de leucócitos para a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbidas (Brandonisio et al., 2002).

Camundongos da linhagem BALB/c infectados por *Leishmania (L.) donovani* e *Leishmania (L.) infantum* ficam infectados por poucas semanas, conseguindo controlar a infecção. Por outro lado, o hamster é considerado o melhor modelo para reproduzir a doença progressiva, pois ele consegue desenvolver um perfil similar ao ser humano. Sendo assim, este é o modelo utilizado para estudar os mecanismos de imunossupressão (Goto e Lindoso, 2004). Neste modelo em estudo realizado com proliferação *in vitro* de linfócitos com antígenos dos parasitos ocorre diminuição de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ e IL-12) com aumento de citocinas Th2 (IL-4 e IL-10), mas, apesar da diminuição da resposta Th1 no ensaio *in vitro*, uma alta expressão de IFN- γ e IL-10 tem sido verificada localmente no fígado, baço e medula óssea de hamster infectado, assim, a produção local de TGB- β no fígado parece estar relacionada com a inibição do IFN- γ , promovendo assim a visceralização dos parasitos (Wilson et al., 2002).

Na leishmaniose visceral a resposta Th1 está associada com resistência à morte dos parasitos, uma vez que animais resistentes à infecção por *Leishmania (L.) donovani* produzem grandes quantidades de

IFN- γ na fase inicial da infecção e mantém a produção em fases mais tardias. *In vitro*, foi visto que a ativação de macrófagos com IFN- γ na fase inicial leva à morte do parasito na espécie *Leishmania donovani* (Murray et al., 1983). Em pacientes assintomáticos são encontrados forte resposta DTH e produção de IL-2, IL-12 e IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (PBMC) (Carvalho et al., 1992). Por outro lado, a ausência de DTH, a redução da capacidade de linfoproliferação e de produção de IL-2 e IFN- γ por PBMC em resposta ao antígeno do parasita são encontradas em pessoas que desenvolvem leishmaniose visceral por *Leishmania (L.) infatum*, além de presença de níveis elevados de IL-10 (Carvalho et al., 1989; Carvalho et al., 1994; Nylén et al., 2007b).

Na leishmaniose humana e experimental, a imunidade é mediada por linfócitos T. Eles desempenham papel importante na geração de respostas específicas e de memória para parasitas intracelulares. Essas células apresentam duas subpopulações com funções distintas e com produção de citocinas a depender da resposta. A resposta Th-1 é capaz de produzir IL-2, TNF- β e IFN- γ , já a resposta Th2, as interleucinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (Costa, 2008; Alexander & Brison, 2005; Arandse et al., 2005). Porém, a imunidade adquirida pode ser protetora ou não. Estudos mostraram que em *Leishmania (L.) major*, onde camundongos BALB/c considerado o modelo clássico de susceptibilidade, associado a uma alta produção de citocinas, como a interleucina IL-4, Th2, e IL-10 (Treg). Já os camundongos da linhagem C57BL/6, considerado um modelo de resistência, apresentam lesões auto-resolutivas, com grande produção de IL-12 e IFN- γ (Th1). Estes trabalhos demonstraram existir uma clara dicotomia entre a produção de citocinas linfocitárias associada à apresentação clínica da doença, caracterizando assim a resposta Th1 e Th2 (Passero, et al., 2011).

1.6) Manifestações clínicas

Nas leishmanioses, as principais manifestações clínicas são determinadas a partir da interação entre os parasitos e a resposta imune do hospedeiro, dependendo da espécie infectante e do estado imunológico do hospedeiro pode desencadear uma série de eventos responsáveis pela ocorrência das mais diversas manifestações clínicas relacionadas a esta doença (Murray et al., 2005).

Consiste na forma mais severa da leishmaniose, sendo crônica, com alta letalidade caso não seja tratada e apresenta aspectos clínicos e epidemiológicos diversos e característicos para cada região onde ocorre. Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença incluem desnutrição, uso de fármacos imunossupressores e co-infecção com o vírus HIV. Representa uma doença infecciosa sistêmica, caracterizada por febres irregulares de média intensidade e longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipoalbuminemia, hipergamaglobulinemia, além de outros sintomas (Sundar & Chakravarty, 2013). O emagrecimento, o edema e a debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito na ausência de tratamento. Há evidências de pessoas que contraem a infecção e não chegam a desenvolver a doença, se recuperando espontaneamente ou mantendo um equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, de modo que permaneçam assintomáticas (Murray et al., 2005).

1.7) Tratamento

Os fármacos utilizados na clínica estão associados com elevada toxicidade, além de problemas de resistência, fazendo com que o desenvolvimento de um fármaco eficaz contra todas as formas de leishmaniose seja indispensável (Elmahallawy & Agil, 2015). Devido à existência de várias espécies de *Leishmania* e diferentes manifestações clínicas o desafio da pesquisa de novos fármacos ainda é muito grande. O

diagnóstico precoce faz com que o tratamento seja mais eficaz a fim de reduzir a prevalência e o progresso da doença. O esquema de tratamento é determinado por muitos fatores, tais como: espécies de parasitos, forma de infecção, estado imunológico do paciente infectado, e / ou a localização geográfica onde a doença é adquirida (Elmahallawy & Agil, 2015).

Os antimoniais pentavalentes são os fármacos chamados de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses e estão disponíveis no mercado em duas formulações: estibogliconato de sódio (Glucantime®) e o antimoniato-N-metil glucamina (Pentostam®) (Frézard et al., 2009). Existe uma variação da eficácia para o tratamento de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar e há também a variação terapêutica de um país para o outro (Tiunan et al., 2011, Carvalho et al., 2000), sendo assim, a OMS indica adequação do tratamento de acordo com a área geográfica.

Os antimonias pentavalentes, são pró-fármacos e ocorre a redução do pentavalente (Sb^{5+}) a antimônio trivalente (Sb^{3+}) por ação de enzimas existentes na forma amastigota do parasito. Sabe-se que o possível mecanismo de ação desse fármaco inclui a inibição de enzimas dos parasitos como a glutatona redutase e a tripanotiona redutase (Cunningham e Fairlamb, 1995).

Devido à acumulação nos tecidos como baço e fígado, antimoniais podem causar efeitos adversos graves, tais como náuseas, vômitos, anorexia, mialgia, dor abdominal, dor de cabeça, artralgia e arritmia cardíaca (WHO, 2010). Estes efeitos adversos são devido à cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade, o que induz o paciente à hospitalização e necessidade de acompanhamento (Freitas-Junior, 2012). Os efeitos adversos e o longo período de administração podem levar o paciente ao abandono do tratamento, favorecendo com que apareçam isolados resistentes de *Leishmania*, como ocorrido em Bihar, na Índia e em partes de Bangladesh (Sundar, 2001; Le Pape, 2008).

A anfotericina B é um antibiótico macrolídeo, antifúngico eficaz contra leishmaniose visceral e menos efetiva na Leishmaniose Tegumentar. Sua forma de ação é baseada no metabolismo de esteróis de *Leishmania* e

fungos, onde o 24-ergosterol é o principal esterol sintetizado e existente nas membranas desses organismos. Os macrolídeos ligam-se aos esteróis e criam poros na membrana, mudando a permeabilidade celular. Essa interferência é capaz de alterar o balanço iônico da célula levando à sua destruição (Croft e Coombs, 2003; Neumann et al., 2010). Casos de resistência a anfotericina B são raros, no entanto, quando ocorrem, em geral é resultado de uma redução da concentração de ergosterol na membrana ou substituição por outro esterol alterado a partir do ergosterol ao qual o fármaco não possui afinidade (Fries & Fairlamb, 2003). Sua administração intravenosa é bastante tóxica, principalmente para o sistema renal, levando a graves efeitos colaterais como anemia, calafrios, febre, miocardite dores generalizadas e anorexia (WHO, 2010; Croft et al., 2006, Croft et al., 2003).

Novas formulações lipídicas associadas à lipossomas (Ambisome®) desse antibiótico foram desenvolvidos para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e a biodisponibilidade. Embora comprovada sua menor toxicidade, estas formulações alternativas de anfotericina B têm limitações para o uso em países em desenvolvimento: elas tem um elevado custo e são instáveis em temperaturas mais altas (o que exige refrigeração) e possuem a necessidade de administração em hospitais e longos períodos de tratamento (Croft & Olliaro, 2011; Meheus et al., 2010).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, tem ação eficaz sobre *Leishmania* sp (Seiferd et al., 2006; Sindermann et al., 2004). Este fármaco age interferindo na membrana plasmática dos parasitos e posterior interferência na transdução do sinal, homeostase de cálcio e inibição da síntese de fosfatidilcolina e RNA (Croft e Coombs, 2003)

Tendo em vista a importância das leishmanioses e as dificuldades envolvidas em seu tratamento, tais como resistência aos antimoniais, a miltefosina vem sendo usada como fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia (Dorlo, et al., 2012). Existem limitações como alto custo, monitoramento dos pacientes, pois estes sofrem efeitos colaterais como problemas gastrointestinais, toxicidade hepática,

nefrotoxicidade e, além disso, um medicamento teratogênico (Alvar et al., 2006).

Atualmente, inúmeros casos de resistência têm sido relatados em pacientes tratados com miltefosina, devido, principalmente, ao seu longo tempo de meia-vida plasmática (100-200 horas). Assim, novas estratégias terapêuticas estão sendo estudadas para a melhora do tratamento. O uso da combinação terapêutica entre a miltefosina, anfotericina B e a paromomicina está em andamento e com sucesso em testes clínicos na Índia e África (Sundar, 2008).

Os fármacos usados para o tratamento de pacientes coinfetados *Leishmania*-HIV são as mesmas utilizadas em pacientes imunocompetentes. Em pacientes coinfetados, tanto na forma visceral quanto na tegumentar, o fármaco de primeira escolha é a anfotericina B. Alternativas terapêuticas disponíveis são o antimoniato de N-metil glucamina, o isotionato de pentamidina e a anfotericina B lipossomal (MS, 2011).

2.0) Doença de Chagas

Os parasitos da espécie *Trypanosoma cruzi* pertencem à ordem Kinetoplastida e são da família Trypanosomatidae (Hoare e Wallace, 1966; Urbina, 2001).

São protozoários causadores da doença de Chagas, ocorrendo em 21 países da América Latina, com cerca de 8-10 milhões de pessoas infectadas e uma taxa de mortalidade anual de aproximadamente 14 mil indivíduos (Schmunis & Yadon, 2010) (Figura 9). Esta doença é um problema emergente na América do Norte, Europa e alguns países ocidentais devido à migração internacional de áreas endêmicas para áreas não endêmicas (Gascon et al., 2010; Schmunis e Yadon, 2010; OMS, 2013).



Figura 8: Distribuição global da Doença de Chagas, áreas endêmicas. Fonte: Morel e Lazdins, 2003

No Brasil dados apontam cerca de 2-3 milhões de pessoas infectadas (Akhavan, 2000; Dias, 2007; Ramos Jr. et al., 2010) e aproximadamente 6.000 mortes são registradas por ano (Martins-Melo et al., 2012a, Martins-Melo et al., 2012b; Martins-Melo et al., 2012d).

Não há vacinas disponíveis e os fármacos usados atualmente (nifurtimox ou benznidazol) para tratar os pacientes têm graves efeitos colaterais. A transmissão dos parasitos aos seres humanos ocorre principalmente por triatomíneos que vivem em domicílios, mas também ocorrem por ingestão de alimentos contaminados, transfusões de sangue e transmissão congênita (Burle Caldas et al., 2015).

A doença apresenta curso clínico bifásico, com uma fase aguda por muitas vezes não identificada, podendo evoluir para a fase crônica, a qual pode apresentar-se de quatro formas: indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva. A gravidade dos casos está relacionada à cepa infectante, à via de transmissão e à existência de outras patologias concomitantes (Boletim epidemiológico, 2015).

2.1) Ciclo biológico

Trypanosoma cruzi, durante seu ciclo de vida, apresenta-se sob as formas flageladas (epimastigota e tripomastigota) e sem flagelo livre

(amastigota). No homem e nos demais vertebrados, o tripomastigota se encontra no meio circulante e o amastigota, nos tecidos. Nos invertebrados (insetos vetores), ocorre um ciclo com a transformação dos tripomastigotas sanguíneos em epimastigotas, que depois se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes presentes nas fezes do inseto (MS, 2009).

Durante o repasto sanguíneo o inseto vetor (barbeiro) infectado defeca liberando as formas tripomastigotas metacíclicas que possuem forma fina e alongada com núcleo também alongado e cinetoplasto posterior a ele. Esses parasitos infectam o hospedeiro mamífero por meio de lesões na pele, da mucosa ocular ou até mesmo por via oral através da ingestão de alimentos contaminados. O tripomastigota metacíclico é capaz de infectar diversos tipos celulares. Ao interagir com a membrana celular é fagocitado e permanece no interior do vacúolo parasitóforo. Os parasitos podem escapar desse vacúolo e alcançar o citoplasma da célula onde irá se diferenciar em amastigota, que possui forma arredondada com núcleo também arredondado e flagelo curto. Através de fissões binárias, os amastigotas se multiplicam dentro da célula e então, se diferenciam em tripomastigotas. Nesse momento ocorre a ruptura da célula e os tripomastigotas são liberados podendo: infectar outras células e repetir o ciclo, atingir a circulação sanguínea ou ainda infectar células musculares ou tecido nervoso formando ninhos de amastigotas. Os tripomastigotas presentes na circulação sanguínea podem ser ingeridos pelo vetor barbeiro durante o repasto sanguíneo e então se transformar em epimastigotas, que são alongados com núcleo arredondado e cinetoplasto anterior a ele. Estes se multiplicam no intestino do vetor invertebrado e após migrarem para o intestino posterior, aderem ao epitélio e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos que são liberados nas fezes fechando o ciclo (Tyler & Engman, 2001) (Figura 10).

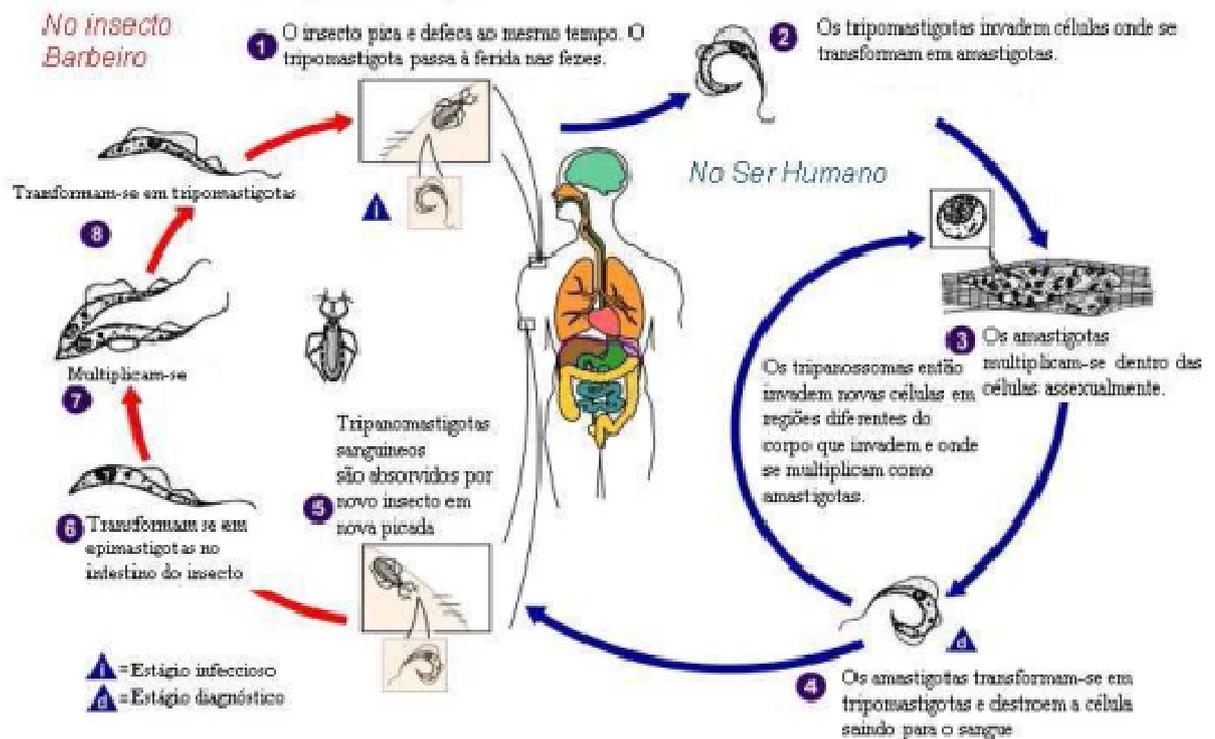


Figura 9: Ciclo de vida dos parasitos *Trypanosoma cruzi*. Fonte: CDC

2.2) Manifestações clínicas

Após a entrada dos parasitos no organismo, ocorrem duas etapas fundamentais na infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi*, conhecidas como fase aguda e fase crônica (MS, 2009).

O período de incubação da doença é de 1 a 2 semanas. A principal característica da fase aguda é a parasitemia microscopicamente detectável onde os parasitos estão circulante na corrente sanguínea. Geralmente é uma fase assintomática ou oligossintomática onde incluem sintomas tais como, febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em raros casos ocorre um inchaço cutâneo (chagoma) ou um edema palpebral (sinal de Romaña) podendo indicar o local da inoculação. A grande maioria das infecções agudas não são detectadas. Menos de 1% dos casos nessa fase causam risco de morte, apenas aqueles que apresentam mielocencefalite

e/ou miocardite e normalmente aparecem em crianças (Murcia et al., 2013; Berne, 2015).

Surtos que ocorrem oralmente por *Trypanosoma cruzi*, ou seja, transmitido por comidas ou bebidas que estão contaminados com fezes do vetor, estão relacionados à maior incidência de morte devido à miocardite. (Bern, 2015).

Em pessoas que sobrevivem à fase aguda da doença, a resposta imunológica faz com que a replicação dos parasitos descontinue e os sintomas desapareçam espontaneamente e a parasitemia desaparece em 4-8 semanas (Bern, 2015). A fase crônica da doença é caracterizada pela baixa incidência de parasitos circulantes na corrente sanguínea e costuma ser assintomática. Cerca de 60% dos pacientes apresenta esse quadro conhecido como forma indeterminada, que se mostra como o melhor prognóstico clínico para os pacientes crônicos, uma vez que, não existe comprometimento cardíaco ou digestivo podendo perdurar pelo resto da vida (Soares-Sobrinho et al., 2007; Pereira e Navarro, 2013).

Alguns pacientes podem evoluir para a forma cardíaca e/ou digestiva da doença (Sathler-Avelar et al., 2009). Evidências sugerem que a resposta imune do hospedeiro é determinante para a progressão da doença (Dutra et al., 2014) e acredita-se que eliminando o parasito ou ao menos reduzindo sua quantidade pode-se melhorar a eficácia da resposta imune e reduzir a progressão da doença (Marin-Neto et al., 2009; Sosa-Estani et al., 2009).

2.3) Tratamento

O tratamento da doença de Chagas é baseado no uso do nifurtimox ou benznidazol, desenvolvido na década de 1960 e 1970, respectivamente. Apesar da comprovada eficácia durante a fase aguda da doença, a eficácia do tratamento é muito baixa quando administrada durante a fase crônica da doença. Além disso, o efeito terapêutico depende também características intrínsecas de resistência natural do *Trypanosoma cruzi* ou genótipos, mesmo durante a infecção aguda. Um dos desafios mais difíceis no

tratamento da doença de Chagas é o estabelecimento de um critério de cura parasitológica viável e consensual (de Lana & Martins-Filho, 2015). Para atenuação dos sintomas durante a fase crônica costuma-se usar cardiotônicos e antiarrítmicos, para o coração, ou através de cirurgias corretivas do esôfago e do cólon (Kirchhoff, 1996).

O benznidazol é um derivado nitroimidazólico. Sua ação antiparasitária inibe a síntese de proteínas e de RNA nas formas extracelulares e intracelulares presentes no hospedeiro. (Maya et al., 2006; Oliveira et al., 2008). Benznidazol apresenta certa eficácia durante a fase aguda da doença, porém, um recente estudo do projeto BENEFIT, demonstrou que o fármaco apesar de reduzir a carga parasitária no organismo, não é eficaz na fase crônica da doença, pois não previne os danos cardíacos ocasionados pela doença (Morillo et al., 2015). Em recente relato, a entidade *Drugs for Neglected Disease initiative* (DNDi) estimou que cerca de 200 mil pessoas morrerão da doença nos próximos cinco anos pela ausência de tratamento (Pecoul et al., 2016). Complementa ainda que novos fármacos são de extrema urgência.

O nifurtimox é um derivado nitrofurânico que apresenta atividade contra as formas tripomastigotas e amastigotas dos parasitos e que foi amplamente empregado no tratamento da doença de Chagas (Coura et al., 2002). Seu mecanismo de ação envolve a produção de radicais livres: superóxido, peróxido de hidrogênio e metabólitos eletrolíticos que levam a intoxicação devido ao aumento do consumo de O₂ pelos parasitos e a formação desses radicais. Como consequência, os tecidos do hospedeiro também acabam sendo lesados (Apt e Zulantay, 2011).

Nos anos 80, o medicamento nifurtimox teve sua comercialização interrompida no Brasil e em seguida na Argentina, no Chile e Uruguai em decorrência dos inúmeros efeitos colaterais que apresentava como, anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e complicações digestivas (náuseas, vômitos, cólicas intestinais e diarreia) (Soares-Sobrinho et al., 2007; Oliveira et al., 2008; Marin-Neto et al., 2009).

3.0) Desafios e estratégias para o estudo de novas terapias para Leishmaniose e Doença de Chagas

A falta de interesse das companhias farmacêuticas no desenvolvimento de novos fármacos faz com que as doenças negligenciadas sejam em geral tratadas com medicamentos pouco eficazes e de alta toxicidade, já que estas acometem populações de baixa renda em países subdesenvolvidos. Diante disso, é necessário que a comunidade científica contribua para a identificação de novos alvos quimioterápicos para os tratamentos dessas doenças. A pesquisa e o desenvolvimento de fármacos envolvem o planejamento, a identificação e a síntese de compostos biologicamente ativos (protótipos), bem como o estudo do metabolismo, do mecanismo de ação e a relação entre estrutura química e atividade biológica destes protótipos (Wermuth, 2008).

As principais abordagens nessa busca de novas terapias são: modificação estrutural de compostos novos ou já existentes, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos e química de produtos naturais (Tempone et al., 2011; DNDi, 2015).

A modificação estrutural se baseia na tomada de uma substância química bem determinada e de ação biológica conhecida como modelo ou protótipo e posterior síntese de novos compostos derivados que sejam congêneres homólogos ou análogos estruturais do protótipo. Fármacos como a efedrina, cinarina e predinazato foram descobertos através desses estudos (Korolkovas, 1982).

Outra abordagem é o reposicionamento de fármacos, que consiste na busca de novos usos para fármacos aprovados (Andrews et al., 2014). Casos de reposicionamentos bem sucedidos para tratamento de Leishmaniose incluem a miltefosina, um fármaco usado no tratamento de câncer (Croft et al., 1996), anfotericina B, antifúngico altamente utilizado, a pentamidina, um agente fdhipoglicemiante, e o próprio antimônio trivalente,

utilizando como agente emético desde a Antiguidade (Sundar et al., 2006). O reposicionamento tradicionalmente tem ocorrido por meio de estudos de triagem *in vitro*, no entanto, métodos de triagem computacional (*in silico*) também podem ser aplicáveis (Ekins et al., 2007).

O conceito de associação terapêutica para doenças causadas por tripanossomatídeos tem ganhado uma atenção especial nos últimos anos; permite a redução das doses e diminuição do tempo de tratamento, assim há redução da toxicidade e diminuem a resistência aos fármacos pelos patógenos (Macedo-Silva et al., 2015). Vários estudos mostraram a eficiência da associação de fármacos contra a leishmaniose. Tratamentos com anfotericina B seguidos de miltefosina ou paromomicina, bem como a administração concomitante de miltefosina e paromomicina foram muito eficazes na Índia, com taxas de cura maiores que 95%. O estibogluconato de sódio combinado com paromomicina mostrou taxas de cura maiores que 90% na África Oriental, (Olliaro, 2010). Além disso, a anfotericina B lipossomal combinada com miltefosina, mostrou-se eficaz contra espécies resistentes ao antimônio pentavalente na Índia (Sundar et al., 2008b).

As fontes naturais estão disponíveis em abundância e oferecem boas possibilidades de seleção de substâncias de interesse terapêutico. De fato, mais de uma centena de compostos derivados de produtos naturais está em fase de testes clínicos, principalmente para tratamento do câncer e de doenças infecciosas (Harvey et al., 2008; Tempone et al., 2011). Um exemplo de derivado de produto natural em uso clínico é a anfotericina B, um antifúngico, que hoje reposicionado para leishmaniose, foi isolado pela primeira vez a partir da bactéria *Streptomyces nodosus* (Tempone et al., 2011). Dentre todas as abordagens citadas, o presente trabalho explorou compostos provenientes de fontes naturais marinhas.

3.1) Produtos naturais como protótipos de fármacos

Produtos naturais são normalmente moléculas pequenas, com um peso molecular inferior a 3000 Da, que são produzidos por uma fonte

biológica, tal como plantas, animais e microrganismos (Martins et al., 2014). Os produtos naturais têm sido a maior fonte de inspiração para diversas áreas da química e da ciência de um modo geral. Usando, copiando ou modificando as moléculas sintetizadas pelos seres vivos, o homem tem obtido inovações para o seu benefício em diversas áreas e, entre elas, a produção de fármacos. Do analgésico morfina, ao antibiótico penicilina, passando pelo anticâncer paclitaxel (Taxol®), estima-se que 80% dos fármacos em uso são produtos naturais ou foram inspirados pela natureza (Costa-Lotufo et al., 2009).

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos, venenos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas, sendo que a maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais.

A descoberta dos primeiros compostos bioativos restringia-se a curiosidade humana. A falta de conhecimento específico associava-se a “serendipidade”, palavra relacionada às descobertas acidentais, resultando no conhecimento popular traduzido na etnofarmacologia, usada ainda hoje como ponto de partida para a obtenção de compostos bioativos. No entanto, a consolidação do conhecimento químico e farmacológico, segundo a contribuição de alguns cientistas, resultou na descoberta de diversos produtos naturais bioativos no século XX (Silva, 2013). Como um notável exemplo, poderíamos citar os trabalhos de Fleming. Ao notar a inibição do crescimento bacteriano em culturas de células pela indevida contaminação por fungos, Fleming estimulou a pesquisa que resultou na identificação do *Penicillium notatum* e na descoberta da penicilina (Nogrady et al., 2005).

Por muitos anos os produtos naturais extraídos de plantas sempre exerceram um papel importante na descoberta de novos fármacos. Podem atuar como modelos estruturais para a síntese de substâncias novas ou protótipos ativos. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos destes medicamentos tradicionais foram derivados predominantemente de plantas, que constituíram a base da maioria dos primeiros medicamentos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (Sneader, 1996; Newman

et al., 2000; Buss et al., 2003; Butler, 2004). A artemisinina, proveniente de uma planta chamada *Artemisia annua*, popularmente conhecida como Qinghao, hoje é o fármaco que possui a mais rápida ação de todos os medicamentos atuais contra a malária, doença da qual o protozoário *Plasmodium* é o agente etiológico (Miller & Su, 2011).

Ao contrário das plantas terrestres, os organismos marinhos não apresentavam uma história significativa na medicina tradicional, e assim, até relativamente pouco tempo, eles não tinham recebido a mesma atenção para pesquisa de possíveis fontes de metabólitos bioativos. Sendo assim, considerando que os oceanos do mundo cobrem mais de 70% do planeta, eles representam um enorme recurso para a descoberta de potenciais de agentes quimioterapêuticos.

3.2) Organismos marinhos como protótipos de fármacos

As pesquisas realizadas com produtos naturais marinhos enfatizam principalmente algas, esponjas, celenterados, briozoários, moluscos, tunicados, equinodermos e microrganismos (Blunt et al., 2015). Blunt e colaboradores, em 2012, mostraram que as esponjas são os organismos mais estudados e mostrou um grande número de substâncias isoladas. Muitos metabólitos secundários se notabilizaram como matérias-primas valiosas para a produção de inúmeros medicamentos contemporâneos (Cragg & Neumann, 2004; Wall, 1993), comprovando que a parceria entre químicos medicinais e químicos de produtos naturais é estratégica para a descoberta de fármacos inovadores (Lombardino & Lowe, 2004).

Uma descoberta muito relevante para medicina foram os trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores Bergmann e Feeney (1951) com a esponja *Tectitethya crypta* (*Cryptotheca crypta*) encontrada no Caribe, para fins medicinais. Esses estudos resultaram na descoberta da azidotimidina (AZT) (Donia e Hamann, 2003), importante tratamento quimioterápico da AIDS. Ainda pode-se citar o aciclovir e a dideoxinosina (DDI), como

exemplos de agentes antivirais potentes usados clinicamente (Donia e Hamann, 2003; Tziveleka et al., 2003).

Outros fármacos que foram aprovadas pelo FDA provenientes de produtos naturais marinhos ou seus derivados foram a A citarabina (Ara-C), sendo comercializado sob a marca de Cytosar-U® (Upjohn) e vidarabina (Ara-A), comercializado como Vira-A® (Parke-Davis); esses fármacos são pirimidinas sintéticas e nucleosídios de purina, respectivamente, desenvolvido a partir de nucleosídios originalmente isolados da esponja *Tethya crypta*. A citarabina foi aprovada pelo FDA em 1969 como um fármaco anti-cancer, enquanto a vidarabina foi aprovada em 1976 como um agente antiviral (Ireland et al., 1993, Oliveira e Freitas, 2001; Mayer et al., 2010). Após 20 anos, em 2004, outro medicamento importante, a ziconotida (Prialt®), ganhou a aprovação da FDA para tratamento de dores severas. É um equivalente sintético de um peptídeo isolado a partir do veneno do moluco marinho *Conus magus*, veneno esse que o animal utiliza para paralisar suas presas (McIntosh et al., 1982; Skov et al., 2007). Outro medicamento proveniente de produto natural, é um alcalóide marinho isolado a partir do tunicado *Ecteinascidia turbinata* denominada trabectedina (Yondelis®), um anticancerígeno utilizado para o tratamento de sarcoma de tecido mole e recidiva de câncer de ovário, o qual foi aprovado pela Comissão Europeia (Pommier et al., 1996; Zewail-Foote, 1999). Para o tratamento de câncer de mama metastático, o FDA aprovou o fármaco Halaven® (mesilato de eribulina), medicamento de origem marinha, também proveniente do tunicado *Ecteinascidia turbinata* (Huyck et al., 2011).

Brentuximab vedotin 63 (Adcetris®) é o mais recente fármaco de origem marinha que entrou no mercado. Foi aprovado para o tratamento da doença de Hodgkin e linfoma anaplásico de células grandes. Esse composto é baseado em um análogo sintético da dolastatina 10, no qual foi isolado em 1972, a partir da *Dolabella auricularia* (Martins et al., 2014; Pettit et al., 1987).

Atualmente, existem pelo menos 13 compostos derivados de produtos naturais marinhos em ensaios clínicos e nove foram aprovados

para serem utilizados como medicamentos. Considerando que, em oito anos, mais de 1000 novos compostos de organismos marinhos foram descritos, a expectativa é que mais fármacos poderão ser descobertos a partir de derivados naturais marinhos futuramente (Rangel & Falkenberg, 2015).

Compostos guanidínicos, provenientes de metabólitos secundários de esponjas marinhas, têm sido utilizados como uma fonte de compostos biologicamente ativos, demonstrando atividades anticâncer, antidiabetes, antifúngico, antibiótico, antiparasitários e antivirais (Berlinck, et al., 2012). No ambiente marinho esses metabólitos são produzidos e/ou acumulados por uma grande variedade de invertebrados marinhos (Ebada & Proksch, 2011). O composto tubastrina foi isolado do coral *Tubastraea aurea* e tem atividade para herpes e estomatite vesicular (Ebada & Proksch, 2011). Demonstrando atividade antimalárica e antimicrobiana, a leptoclinidamina foi isolada de uma ascídia chamada *Leptoclinides durus* (Carrol & Avey, 2009). Muitos alcalóides guaninínicos foram isolados dos gêneros *Axinella* e *Agella*, exibindo atividade antiparasitária contra *Plasmodium falciparum* (Scala et al., 2010).

4.0) Justificativa

Com base no exposto, observa-se uma grande necessidade de se buscar novos tratamentos tanto para a leishmaniose como para a doença de Chagas. Conhecendo a importância de metabólitos marinhos, o presente projeto investigou o potencial de derivados marinhos sintéticos como agentes antiprotozoários em *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*.

2) Objetivos

2.1) Gerais

O presente trabalho visou o estudo da atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de compostos sintéticos guanidínicos derivados de organismos marinhos, com ênfase nos estudos de mecanismos de ação.

2.2) Específicos

1. Avaliar *in vitro* a atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* e anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados sintéticos marinhos, determinando-se a Concentração Efetiva 50% em formas extracelulares e intracelulares.
2. Avaliar *in vitro* a citotoxicidade para determinação do índice de seletividade dos compostos ativos, utilizando-se células de mamíferos.
3. Avaliar *in vitro* os possíveis mecanismos de ação dos compostos ativos em formas promastigotas de *L. (L.) infantum* como: alteração da permeabilidade da membrana celular, avaliação do potencial de membrana mitocondrial e produção de espécies reativas de oxigênio.
4. Avaliar a produção de óxido nítrico em células de mamíferos.
5. Avaliar a resposta imune celular *in vitro* de macrófagos infectados com amastigotas tratados e não tratados com os fármacos e co-cultivados com linfócitos esplênicos, avaliando a produção de citocinas.

3) Material e métodos

3.1) Reagentes e compostos sintéticos

3-(4,5- dimetiltiazol- -2-yl)-2,5-brometo difeniltetrazólio (azul de tiazolilo; MTT), resazurina (Alamar blue®), SYTOX Green®, Rodamina 123 e H₂DCFDA foram adquiridos pela Molecular Probes (Brazil). Coloração Giemsa, dimetilsulfóxido (DMSO) e metanol (MeOH) foram obtidos da Merck (Brazil). Meio RPMI-1640, meio M-199, Hanks Balanced Salts, solução salina tamponada com fosfato (PBS), azul de tripano e miltefosina foram comprados da Sigma (Brazil). Outros reagentes e o benzonidazol foram adquiridos pela Sigma Aldrich (Brazil). Cytometric Beads Array (CBA, Mouse Inflammation Kit Biosciences, Becton Dixon).

3.2) Síntese de compostos guanidínicos.

A síntese dos 14 compostos guanidínicos marinhos foi realizada pelo Prof. Patrick Murphy da University of Bangor no País de Gales (Reino Unido) (Figura 11) com apoio do projeto temático FAPESP 2013/50228-8. Os compostos guanidínicos foram preparados de acordo com publicações do grupo (Nattrass & Alberti, 1978; Black et al., 1996; Black et al., 1998; Cawkett et al., 1999; Black et al., 2001; Allingham et al., 2003; Bridges et al., 2014).

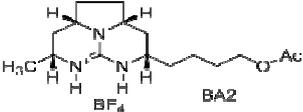
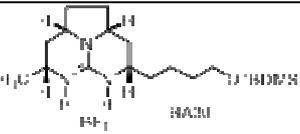
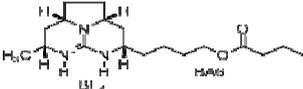
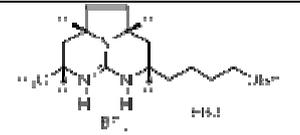
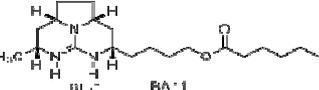
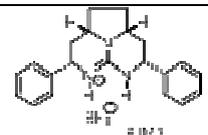
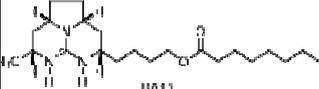
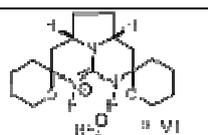
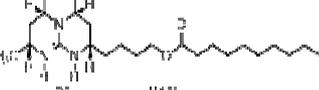
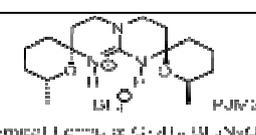
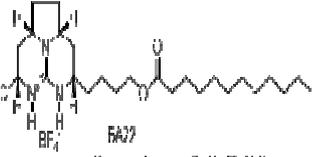
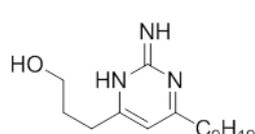
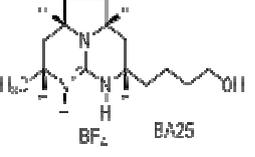
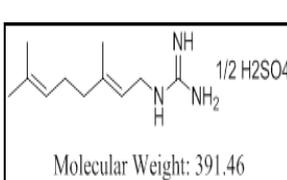
Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
BA-2	 <p>BA2 Chemical Formula: C₁₀H₂₅BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 381.2226</p>	BA-30	 <p>BA30 Chemical Formula: C₂₂H₄₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 454.4496</p>
BA-6	 <p>BA6 Chemical Formula: C₁₈H₃₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 408.2766</p>	EB-3	 <p>EB3 Chemical Formula: C₂₂H₄₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 454.4496</p>
BA-11	 <p>BA11 Chemical Formula: C₂₄H₅₁BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 437.3306</p>	GB-118	 <p>GB118 Chemical Formula: C₂₆H₃₁BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 456.2476</p>
BA-13	 <p>BA13 Chemical Formula: C₂₇H₅₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 465.3346</p>	PJM-1	 <p>PJM1 Chemical Formula: C₃₂H₅₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 503.2356</p>
BA-18	 <p>BA18 Chemical Formula: C₃₂H₆₅BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 493.4386</p>	PJM-2	 <p>PJM2 Chemical Formula: C₃₂H₅₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 503.2356</p>
BA-22	 <p>BA22 Chemical Formula: C₂₄H₅₁BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 437.3306</p>	PMH-6	 <p>PMH6 Chemical Formula: C₂₄H₅₁BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 437.3306</p>
BA-25	 <p>BA25 Chemical Formula: C₁₄H₂₉BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 339.1856</p>	ZA-1	 <p>ZA1 Chemical Formula: C₂₂H₄₇BF₄N₃O₂ Molecular Weight: 454.4496</p>

Figura 10. Estrutura química dos compostos guanidínicos sintéticos.

3.2.1 Análise computacional *in silico*: Predição de compostos de interferência (PAINS) e agentes agregantes

Todas as estruturas deste trabalho foram submetidas a análise *in silico* realizadas pela Profa. Dra Carolina Horta Andrade da Universidade Federal de Goiás. Para validar a ausência de compostos de interferência e agregantes. As estruturas foram transferidas para o software KNIME workspace v. 2.12.1 e incluídas em filtros para PAINS utilizando a estratégia de estudo segundo Saubern e colaboradores (Saubern et al., 2011). Visando estimar o potencial de agregação foi calculado o valor de clogP e o coeficiente de Tanimoto, utilizando o *Morgan fingerprints* (Saubern et al., 2011; Morgan et al., 1965; Riniker et al., 2013; Rogers et al. 2010; Irwin et al., 2015) entre cada composto e um banco de dados de 12.600 compostos agregantes conhecidos.

3.3) Parasitos

Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD), foram cultivadas em meio M-199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 0,25% de hemina, a 24°C, sem a adição de antibióticos. Hamsteres Dourados (*Mesocricetus auratus*) foram infectados mensalmente para manutenção da cepa. Amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foram purificadas de baço de hamsteres dourados por meio de centrifugação diferencial e o número de parasitos foi determinado pelo método de Stauber (1958) 60 a 70 dias após a infecção.

As formas tripomastigotas de *T.cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em células LLC-MK2 em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SFB a temperatura de 37°C em estufa com 5% CO₂.

3.4) Animais de experimentação

Os animais foram obtidos no biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsters Dourados foram infectados

a cada mês com amastigotas provenientes de baço de animais infectados para manutenção da cepa. Camundongos BALB/c fêmeas foram utilizados para obtenção de macrófagos peritoneais. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, com o projeto CEUA-IAL/Pasteur N° 02/2011 (Anexo).

3.5) Células de mamífero NCTC

Células de tecido conjuntivo de camundongo, NCTC clone 929, do American Type Culture Collection (ATCC CCL1), foram fornecidas pela Seção de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz, SP e armazenadas em nitrogênio líquido ou freezer à -70 °C. Posteriormente foram mantidas em meio M-199 suplementado com 10% SFB, sob a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂.

3.6) Determinação *in vitro* da atividade antiparasitária e da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos diferentes compostos

Os 14 compostos foram dissolvidos em DMSO, diluídos em meio de cultura e incubados com os parasitos em diferentes concentrações (150 até 1µM, serialmente distribuídos em base 2) com o objetivo de se determinar as respectivas CE₅₀. A concentração do solvente não ultrapassou a 0,5% (v/v) para não causar danos aos parasitos, A CE₅₀ dos diferentes compostos foi determinada utilizando-se promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Foram aplicadas à 1x10⁶/poço em placas de 96 poços contendo os diferentes compostos, utilizando-se meio M-199 suplementado com 10% de SFB. Após um período de 24 horas de incubação em estufa BOD a 24°C a viabilidade dos promastigotas foi verificada por atividade de oxidação mitocondrial através do ensaio colorimétrico utilizando-se MTT 3-(4,5- dimetiltiazol- -2-yl)-2,5-brometo difeniltetrazólio (Tada et al., 1986). Depois de 48 horas, a leitura

foi realizada por absorvância em espectrofotômetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) a 570 nm (Gehrke et al., 2013). Utilizou-se o fármaco miltefosina como controle positivo do ensaio (100% de morte dos parasitos). Os ensaios foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos duas vezes.

Também avaliou-se a CE_{50} em *Trypanosoma cruzi*, onde os 14 compostos foram diluídos em série (150 até 1 μ M, base 2) utilizando-se meio RPMI-1640, sem adição de antibióticos em placas de 96 poços e em seguida formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram adicionadas na concentração de 1x10⁶ parasitos/poço. As placas foram mantidas a temperatura de 37°C em estufa com 5% de CO₂ durante 24 horas. Após esse período para a determinação da viabilidade dos parasitos, foi adicionado 20 μ L de Alamar Blue® (resazurina) a 10%. As placas permaneceram incubadas por mais 20 horas sob as mesmas condições. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorvância em espectrofotômetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) (Gehrke et al., 2013). Como controle positivo, utilizou-se o fármaco padrão benznidazol, devido sua utilização na terapia clínica, e como controle (100% de células vivas), utilizou-se as células não tratadas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e repetidos pelo menos duas vezes.

3.7) Determinação da CE_{50} de compostos ativos em macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania (L.) infantum*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas pela lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB; os macrófagos foram adicionados a 1x10⁵ em placas NUNC® de 16 poços, permanecendo a 37°C em estufa de CO₂ (5%) e incubados por 24 horas. Após esse período os macrófagos foram infectados com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* extraídas de baço e separadas por centrifugação diferencial na proporção de 10:1 (amastigotas/macrófago), ou seja, 1x10⁶ amastigotas por poço e

incubadas com diferentes compostos serialmente diluídos e incubados por um período de 120 horas nas mesmas condições acima (Tempone et al., 2005). Ao final do ensaio, as lâminas foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico. A CE₅₀ foi determinada pela contagem de 200 macrófagos/poço, avaliando-se os macrófagos infectados em relação ao controle não tratado. Como controle negativo (100% infectado), foram utilizados macrófagos não tratados, e como controle positivo (100% tratados), macrófagos tratados com miltefosina. Os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

3.8) Avaliação da Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade foram utilizada células de mamíferos NCTC (Clone 929), cultivadas conforme descrito anteriormente e aplicadas na concentração de 6×10^4 /poço em placas de 96 poços, contendo os diferentes compostos diluídos serialmente em M-199 com 10% SFB. Incubou-se as placas por um período de 24 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ e se determinou a viabilidade celular através do ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5- dimetiltiazol- -2-yl)-2,5-brometo difeniltetrazólio) (Tada et al., 1986), ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorvância em espectrofotômetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) a 570 nm (Gehrke, et al., 2013). Como controle negativo foi utilizado células não tratadas (100% células vivas) e como controle positivo foram utilizado a miltefosina (100% de morte das células). Os ensaios foram feitos em duplicatas e repetidos pelo menos duas vezes.

Com o objetivo de se determinar a toxicidade dos compostos com comprovada atividade antiparasitária em células de mamíferos, foi determinado o Índice de Seletividade (IS) dos mesmos, através da seguinte razão:

$$\text{IS} = \frac{\text{CE}_{50} \text{ em células de mamíferos}}{\text{CE}_{50} \text{ em células de parasitas}}$$

3.9) Ensaio de mecanismo de ação em promastigotas de *Leishmania (L.) Infantum*

3.9.1) Avaliação de permeabilidade de membrana plasmática

O SYTOX® green é um fluoróforo utilizado para avaliar a permeabilidade de membranas celulares. Neste caso, o método utilizado foi observar se os fármacos estudados alteravam ou não a permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Os compostos mais seletivos foram testados (**EB-3** e **GB-118**), utilizando as respectivas concentrações dos seus valores de CE₉₉. As formas promastigotas (2x10⁶ parasitos/poço) foram lavadas com PBS e incubadas com 30µL de SYTOX® Green (1µM) em placas pretas de 96 poços por 15 minutos em estufa BOD a 24°C. Posteriormente, os compostos foram adicionados. O aumento na fluorescência devido à permeação do fluoróforo pela membrana danificada e ligação do marcador ao DNA dos parasitos foi mensurado utilizando-se um espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação 485nm e emissão de 520nm. A leitura foi realizada a cada 20 minutos num total de 60 minutos. A normalização da leitura foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle negativo). A permeabilização máxima da membrana máxima foi obtida na presença do detergente Triton X-100 a 0,5% (controle positivo) (Kulkarni et al., 2009). Os seguintes controles internos foram utilizados na avaliação: (i) a fluorescência dos compostos testados, (ii) a possível interferência de DMSO, (iii) promastigotas não tratados, e (iv) meio sem células. As amostras foram testadas em triplicata (Kulkarni et al, 2013).

3.9.2) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Um dos parâmetros importantes relacionados com a funcionalidade da mitocôndria é o potencial de membrana mitocondrial. A variação desse potencial é avaliada com base na acumulação diferencial da sonda rodamina 123. Esta sonda é facilmente sequestrada pelas mitocôndrias integras e difunde-se passivamente através da mitocôndria ativa sem efeitos citotóxicos (Luque-Ortega et al., 2001). Formas promastigotas (2×10^6 parasitos / poço) foram lavadas duas vezes em HBSS-Glc e incubadas com os compostos **EB-3** e **GB-118** na CE₉₉ durante 60 min a 25°C. Depois disso, os parasitos foram incubados com a rodamina 123 durante 10 min (0,3 µg/mL, 5 min, 37°C), lavadas por centrifugação e ressuspensas em HBSS-Glc e a fluorescência foi determinada usando um espectrofluorímetro de placas (Filter Max F5 Multi-Mode Microplate Reader-Molecular Devices) com filtro de excitação e emissão de comprimentos de onda de 488 e 525 nm, respectivamente. Os seguintes controles internos foram utilizados na avaliação: (i) a fluorescência dos compostos testados, (ii) a possível interferência de DMSO, (iii) promastigotas não tratados, e (iv) meio sem células. As amostras foram testadas em triplicata.

3.9.3) Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína utilizada como um indicador de ROS. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, a sonda H2DCF-DA que não é fluorescente, é convertida para a forma altamente fluorescente, o 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Esse método foi utilizado para avaliar a produção de ROS nos parasitos. Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* (2×10^6 parasitos por poço) foram lavados em solução HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) e incubados com os

compostos **EB-3** e **GB-118**, utilizando a CE₉₉ por 60 minutos. Posteriormente, as células foram lavadas e incubadas por 15 minutos com H2DCF-DA (5 µM) e foi feita a leitura da fluorescência em espectrofluorímetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader) com filtro de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Como controle positivo, utilizaram-se parasitos tratados com azida sódica (10 mM) (Carvalho et al., 2011) e como controle negativo, utilizaram-se parasitos não tratados. A normalização da leitura foi realizada subtraindo-se a fluorescência basal do grupo não tratado (controle). Poços contendo os fármacos em estudo, adicionados de meio de cultura e o fluoróforo em questão foram utilizados para avaliar uma possível fluorescência dos fármacos. Além disso, o solvente utilizado, metanol ou DMSO, foi utilizado como controle para verificar possível interferência nos resultados.

3.10) Determinação da resposta imunomodulatória

3.10.1) Oxido Nítrico (NO)

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas pela lavagem em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB e adicionados em placas de 96 poços (1X10⁵) à 37°C em estufa de CO₂ (5%) over night. Após esse período os macrófagos foram tratados por 24 horas (triplicata) com os compostos estudados. Em seguida, o sobrenadante das células foi retirado (50 µL) para dosagem de NO pelo método de Griess (Lezama-Davila et al., 2008). Para dosagem, as amostras foram comparadas a uma curva padrão de nitrito de sódio (400 µM a 0,048 µM). Adicionou-se 50µL do reagente Griess em todos os poços para detecção do NO. Como controle negativo, utilizou-se células não tratadas. Ao final do ensaio, a leitura foi realizada por absorbância em espectrofotômetro de placas (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader).

3.10.2) Ensaio de resposta imuno-celular: macrófagos peritoneais co-cultivados com células não aderentes de baço e infecção *in vitro*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas por lavagem com meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SFB, e adicionados em placas de 24 poços (1×10^5). Após 24h, os macrófagos foram infectados com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* usando uma proporção de infecção 1:10 (1 macrófago / 10 amastigotas) (Yardley & Croft, 2000). Após 24h, os macrófagos infectados foram co-cultivados com células não aderentes de baço em uma taxa de 6:1.

Obtenção células não aderentes de baço - baço de camundongo BALB/c fêmea foi dissociado em PBS (pH 7.2) e filtrados em peneiras “*cell stainers*” (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA); as células foram transferidas para um tubo contendo 20 mL de PBS seguida de centrifugação (1000 rpm) por 10 min à 4°C. Sobre o pellet foi adicionado tampão ACK pH 7,2 (NH_4Cl 0,15M; KHCO_3 10mM; Na_2EDTA 0,1M) por 5 minutos em repouso, para lise das células vermelhas, lavados duas vezes com PBS por centrifugação a 4 ° C durante 10 min (1800 rpm) e ressuspensos em meio RPMI-PR 1640 suplementado com 10% de SFB, à 37°C em estufa com 5% de CO_2 em placa de 24 poços (500 μl /poço - 1×10^6 /poço mL v/v). As células então foram tratadas após 24 h de co-cultivo infecção com os respectivos fármacos por 48 h e após o término do tratamento o sobrenadante celular foi colhido para dosagem de citocinas por citometria de fluxo. A viabilidade das células utilizadas no experimento foi superior a 85%, mensurados por exclusão de azul de tripan (Sigma).

3.10.3) Análise da resposta celular: citocinas por citometria de fluxo

A análise de citocinas foi feita por citometria de fluxo utilizando o kit *CBA "cytometric beads array"* no sobrenadante dos macrófagos infectados e co-cultivados com células não aderentes de baço, conforme as instruções do fabricante. O Kit CBA foi utilizado para a quantificação das citocinas envolvidas na resposta inflamatória (IL-4, INF- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-7) em uma mesma amostra. Seis populações de beads com distintas intensidades de fluorescência conjugadas com um anticorpo de captura específico para cada citocina são misturadas para formar o CBA e após incubação com o sobrenadante de cultura celular, as *beads* de captura das citocinas foram misturadas com o anticorpo de detecção conjugado com o fluorocromo PE, e depois incubadas com as amostras para formar o ensaio "em sanduíche" e lidas no citômetro de fluxo FACSCanto II. As populações de beads foram visualizadas de acordo com as suas respectivas intensidades de fluorescência.

3.11) Análise estatística

As CE_{50} dos fármacos analisados foram determinadas por meio de curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares (R). As diferenças entre amostras foram estatisticamente avaliadas por meio dos valores de P (one-way ANOVA, non parametric e post Test Tukey).

4) Resultados

4.1) Determinação *In vitro* da Atividade Antiparasitária e da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) dos Diferentes Compostos

Os 14 compostos foram incubados por 48 h em concentrações que variaram 150 até 1µM com formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e a viabilidade determinada pelo método colorimétrico MTT. Dos 14 compostos testados, 9 apresentaram atividade anti-*Leishmania (L.) infantum* em formas promastigotas. O valor de CE₅₀ variou entre 6,6 µM, sendo o **BA-30** o composto mais ativo e **BA-11** o menos ativo (Tabela 1). A miltefosina foi utilizada como fármaco padrão e resultou em um CE₅₀ de 16 µM.

Tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram incubadas serialmente por 24 horas na concentração de 150 até 1µM com os 14 compostos e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de resazurina. Os compostos demonstraram valores entre 3,6 e 88,5 uM (Tabela 1). Benznidazol foi utilizado como padrão e resultou numa CE₅₀ de 440,7 µM.

4.2) Determinação da CE₅₀ de Compostos Ativos em Macrófagos Peritoneais Infectados com *L. (L.) infantum*

Os 14 compostos guaninínicos foram incubados serialmente com amastigotas intracelulares, e após 120 horas, 6 compostos apresentaram atividade antiparasitária. Dentre os compostos ativos a CE₅₀ variou entre 2, µM e 18 µM; o composto **GB-118** foi o mais ativo e o **ZA-1** o menos ativo. Miltefosina foi usado como padrão e nos demonstrou uma CE₅₀ de 17,80 µM (Table 1).

4.3) Avaliação da Citotoxicidade

Com o objetivo de se avaliar a citotoxicidade, os 14 compostos foram incubados *in vitro* na presença de células NCTC, iniciando na concentração de 150 até 1 μM . Após 48 horas de incubação, a viabilidade foi determinada pelo método colorimétrico de MTT. Os compostos apresentaram diferentes valores de citotoxicidade (Tabela 1) e os valores de CE_{50} variaram entre 42,2 μM até >150 μM . Miltefosina e benznidazol foram usados como padrão e demonstraram valores de CE_{50} de 122 μM e 469,9 μM , respectivamente. O composto PMH-6 apresentou o menor valor de CE_{50} com 42,22 μM (35,1 – 50,8 μM), e os compostos BA-2, BA-6, BA-11, BA-25, PJM-1 e PJM-2 não demonstraram toxicidade até a concentração máxima testada de 150 μM (Tabela 1).

O Índice de seletividade em relação as formas amastigotas de *Leishmania (L.) infantum* variou de 3 a 25, sendo o maior índice observado para o composto **EB-3**. O Composto **GB-118** foi o segundo composto mais seletivo para *Leishmania (L.) infantum*. Quando considerado as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, observou-se um índice variando entre >1,7 a 28, sendo o composto BA-18, o mais seletivo (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade antiparasitária e citotoxicidade de compostos guanidínicos sintéticos.

Compostos	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	<i>L. (L.) infantum</i>	Células NCTC	Índice de	
	tripomastigotas	promastigotas	amastigotas		seletividade	
	CE ₅₀ (µM) CI 95%	CE ₅₀ (µM) CI 95%	CE ₅₀ (µM) CI 95%	CC ₅₀ (µM) CI 95%	a	b
BA-2	88.5 (65.7-119.2)	NA	NA	>150	ND	>1.7
BA-6	49.2 (43.1-56.1)	NA	NA	>150	ND	>3.0
BA-11	22.6 (21.2-24.2)	109.3 (97.1-123.1)	NA	>150	ND	>6.8
BA-13	8.5 (8.1-8.9)	53.8 (45.2-64.1)	NA	99.7 (93.0- 107.0)	ND	12.4
BA-18	4.0 (1.8-8.6)	59.0 (46.9-74.1)	NA	84.1 (79.7-88.5)	ND	28.0
BA-22	3.6 (3.5-6.6)	48.5 (38.8-60.7)	NA	57.0 (45.3-71.4)	ND	18.7
BA-25	NA	NA	NA	>150	ND	ND
BA-30	4.5 (3.9-5.3)	6.6 (4.3-10.2)	17.7 (14.8-1.2)	65.3 (58.3-73.2)	3.7	16.3
EB-3	41.1 (35.8-47.2)	57.0 (49.9-65.3)	5.51 (4.4-6.9)	137.8 (115.5-164.4)	25	3.3
GB-118	9.4 (8.06-10.0)	34.0 (29.6-38.9)	2.3 (1.2-4.2)	45.2 (41.6-49.2)	19.9	5
PMJ-1	NA	NA	8.1 (5.6-11.6)	>150	>18.6	ND
PMJ-2	NA	NA	NA	>150	ND	ND
PMH-6	8.1 (7.2-9.1)	41.7 (35.7-48.6)	5.2 (1.8-14.3)	42.2 (35.1-50.8)	8.1	5.3
ZA-1	35.4 (30.8-40.7)	9.2 (8.6-9.9)	18.8 (6.2-56.6)	115.8 (105.5-127.8)	6.1	3.2
Benznidazol	440.7 (406.1-478.4)	ND	ND	469.9 (414.9-532.2)	15.4	1.1
Miltefosina	ND	16.4 (15.4-17.4)	16.8 (11.57-24.5)	122.0 (94.78-157.0)	7.2	ND

Valores expressos em µM. CE₅₀: Concentração Efetiva 50%; CC₅₀: concentração citotóxica 50% (NCTC, células de mamíferos); IC95% intervalo de confiança 95%; a: índice de seletividade em amastigotas (CC₅₀ células de mamíferos / CE₅₀ amastigotas de *L. infantum*); b: índice de seletividade em tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CC₅₀ células de mamífero / CE₅₀ tripomastigotas); NA: Não ativo; ND: Não determinado.

4.4) Avaliação dos mecanismos de ação dos compostos EB-3 e GB-118 em *Leishmania (L.) infantum*

Considerando a seletividade dos compostos **EB-3** e **GB-118** em *Leishmania (L.) infantum*, foi realizado um estudo mais aprofundado sobre os possíveis mecanismos de ação destes compostos.

4.4.1) Alteração da permeabilidade de membrana plasmática

Para avaliação da alteração da permeabilidade da membrana plasmática foi utilizado a sonda fluorescente Sytox®Green. Ambos os compostos induziram alteração da permeabilidade da membrana plasmática. O composto **GB-118** resultou em 64% de permeabilização (Figura 1) aos 60 min, quando comparado com os parasitos não tratados ($p < 0,001$). Da mesma forma, o composto **EB-3** também induziu de forma significativa ($p < 0,0001$) a permeabilização da membrana plasmática aos 60 minutos de incubação, mostrando uma permeabilização de 160% maior que o controle. O DMSO foi usado como controle interno e não alterou a membrana plasmática (dados não apresentados) (Figura 12).

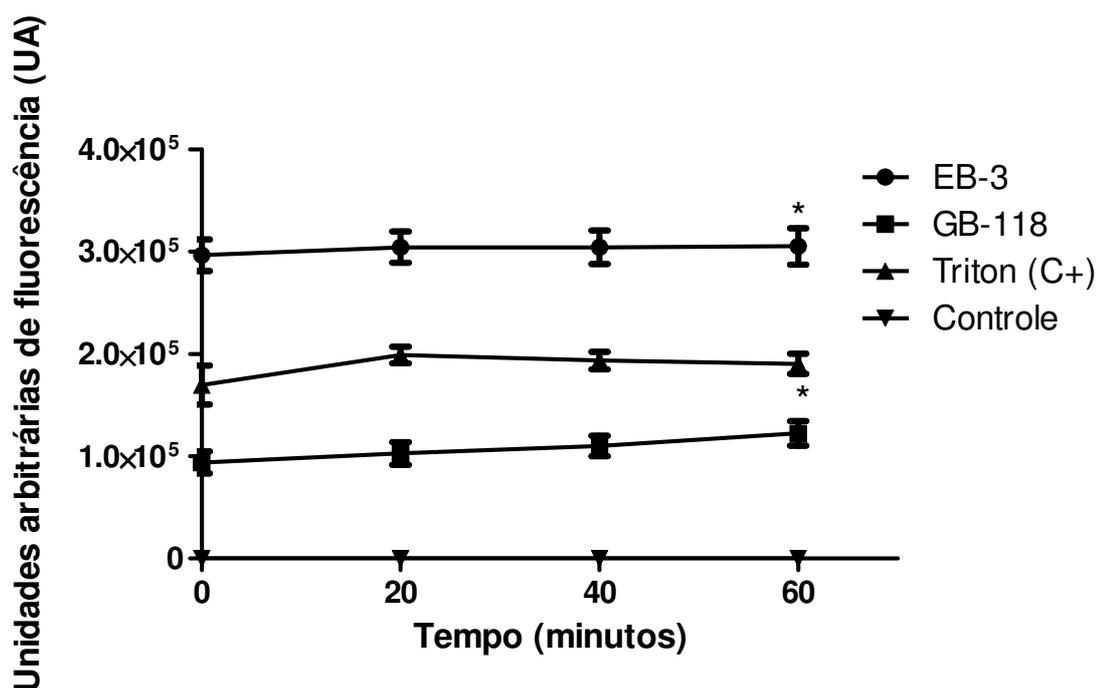


Figura 11: Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, representada em unidades de fluorescência das leituras realizadas a cada 20 minutos de incubação na presença da sonda SYTOX green®. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * ($p < 0,0001$) em relação ao controle. A barra é representada pela média das triplicatas de um ensaio representativo

4.4.2) Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial da membrana mitocondrial foi investigado na presença dos compostos testados. Promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* foram incubadas com compostos **EB-3** e **GB-118** durante 60 minutos e o potencial de membrana mitocondrial foi monitorado usando a sonda fluorescente rodamina 123. Ambos os compostos induziram uma redução intensa ($p < 0,001$) na intensidade de fluorescência da sonda quando comparado a promastigotas não tratados. A intensidade de despolarização (70%) causada por ambos os compostos foi semelhante aos níveis observados no controle positivo (azida de sódica) (Figura 13).

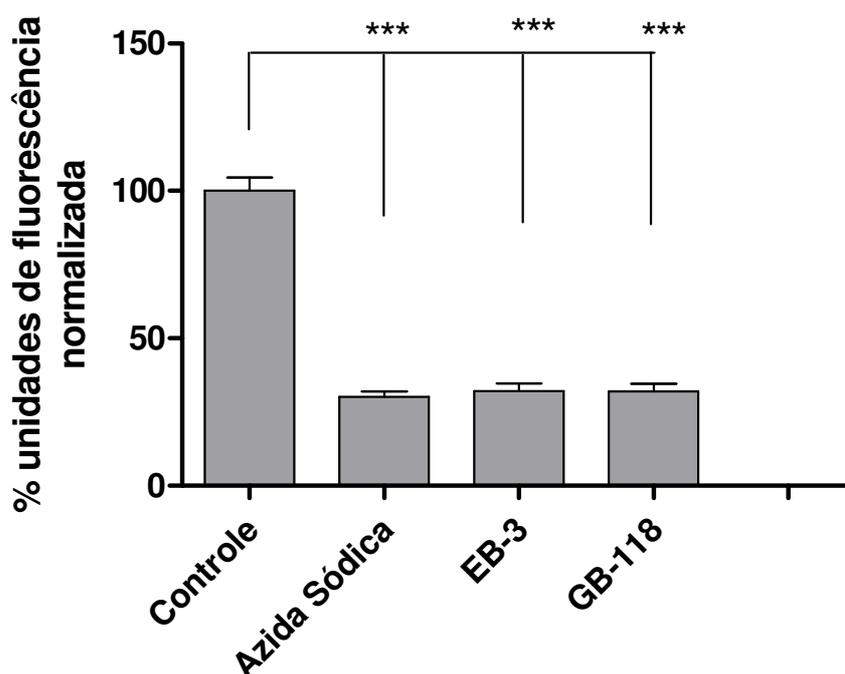


Figura 12: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* utilizando a sonda rodamina 123 realizada após uma hora de incubação com os compostos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * ($p < 0,001$) em relação ao controle. A barra representa a média das triplicatas de um ensaio representativo.

4.4.3) Alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A produção de ROS em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* na presença de **EB-3** e **GB-118** é determinada utilizando a sonda fluorescente H₂DCf-DA. Após 120 minutos de incubação, **EB-3** demonstrou a maior capacidade de alterar os níveis de ROS em *Leishmania* ($p < 0,001$), induzindo um aumento 3 vezes maior do que o controle positivo (azida sódica). O composto **GB-118** também alterou os níveis de ROS, induzindo um aumento de 60% em relação aos parasitos não tratados ($p < 0,05$) (Figura 14).

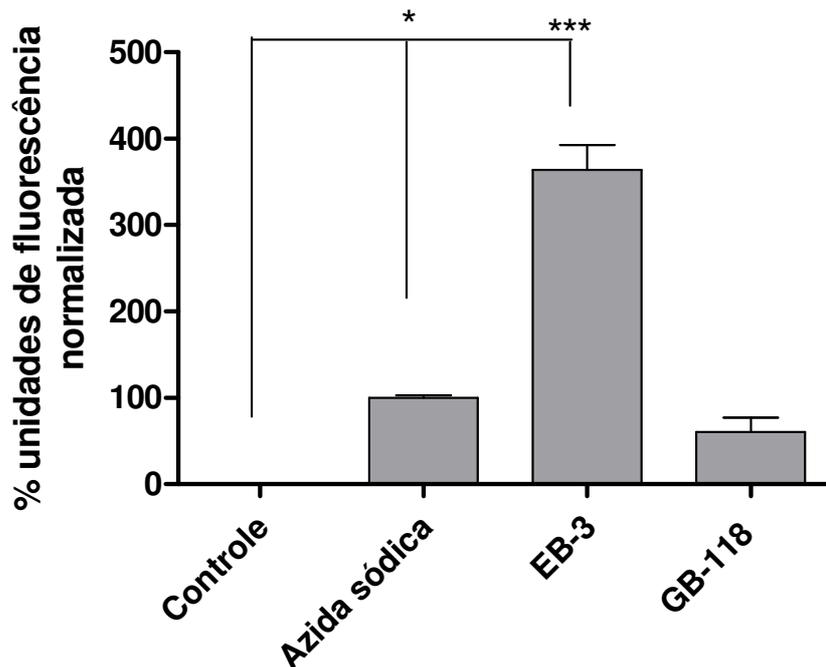


Figura 13: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* utilizando a sonda H₂DCF-DA após 120min de incubação com os compostos. O valor de p (teste de variância, não paramétrico) é representado por * (p < 0,001) em relação ao controle. A barra representa a média das triplicatas de um ensaio representativo.

4.5) Determinação da resposta imunomodulatória

4.5.1) Quantificação de Óxido Nítrico

Compostos **EB-3** e **GB-118** foram incubados com macrófagos peritoneais e a quantificação de NO foi realizada após 24 h. Ambos os compostos não demonstraram produção significativa de NO em relação às células tratadas com LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), no qual é usado como controle positiv, sendo normalizada em 100% a produção de NO. Células não tratadas foram utilizadas como controle para demonstrar a produção basal de NO (Figura 15).

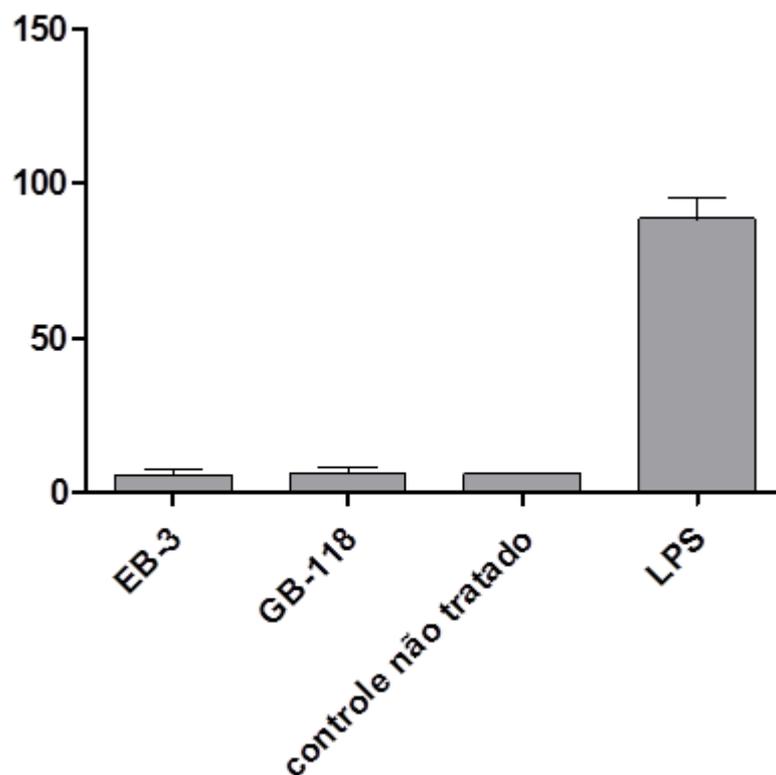


Figura 14: Macrófagos peritoneais foram incubados com os compostos durante 24 h. Reação de Griess foi utilizada com indicador na produção de NO em relação a determinação estável da produção de nitrito (NO₂⁻). * p <0,05

4.5.2) Resposta imuno-celular: macrófagos peritoneais co-cultivados com células não aderentes de baço e infecção *in vitro*

Macrófagos não infectados por *Leishmania (L.) infantum* e macrófagos infectados com *Leishmania (L.) infantum* foram tratados durante 48 h com os compostos **EB-3** e **GB 118** e co-cultivados ou não com linfócitos. A produção das citocinas de MCP-1, IL-6, IL-10, TNF e INF- γ foram detectados por análise de citometria de fluxo. Os resultados demonstram que o composto **EB-3** diminui a produção de citocinas de MCP-1 (p <0,05) e INF- γ (p <0,05) em macrófagos não-infectados por *Leishmania (L.) infantum* e macrófagos infectados com *Leishmania (L.) infantum* e também quando co-cultivada ou não com linfócitos. Um efeito semelhante a

regulação negativa ($p < 0,001$) da MCP-1 também foi observada em esplenócitos incubados com compostos **EB-3** e **GB-118**. Compostos **EB-3** e **GB-118** demonstraram uma modulação não significativa das citocinas TNF, IL-6 e IL-10 em todos os ensaios. A produção da citocina $\text{INF-}\gamma$ também foi negativamente modulada por **EB-3** ($p > 0,05$) e **GB-118** ($p > 0,05$) em macrófagos não-infectados e macrófagos infectados por *Leishmania (L.) infantum* co-cultivada com esplenócitos (Figura 16).

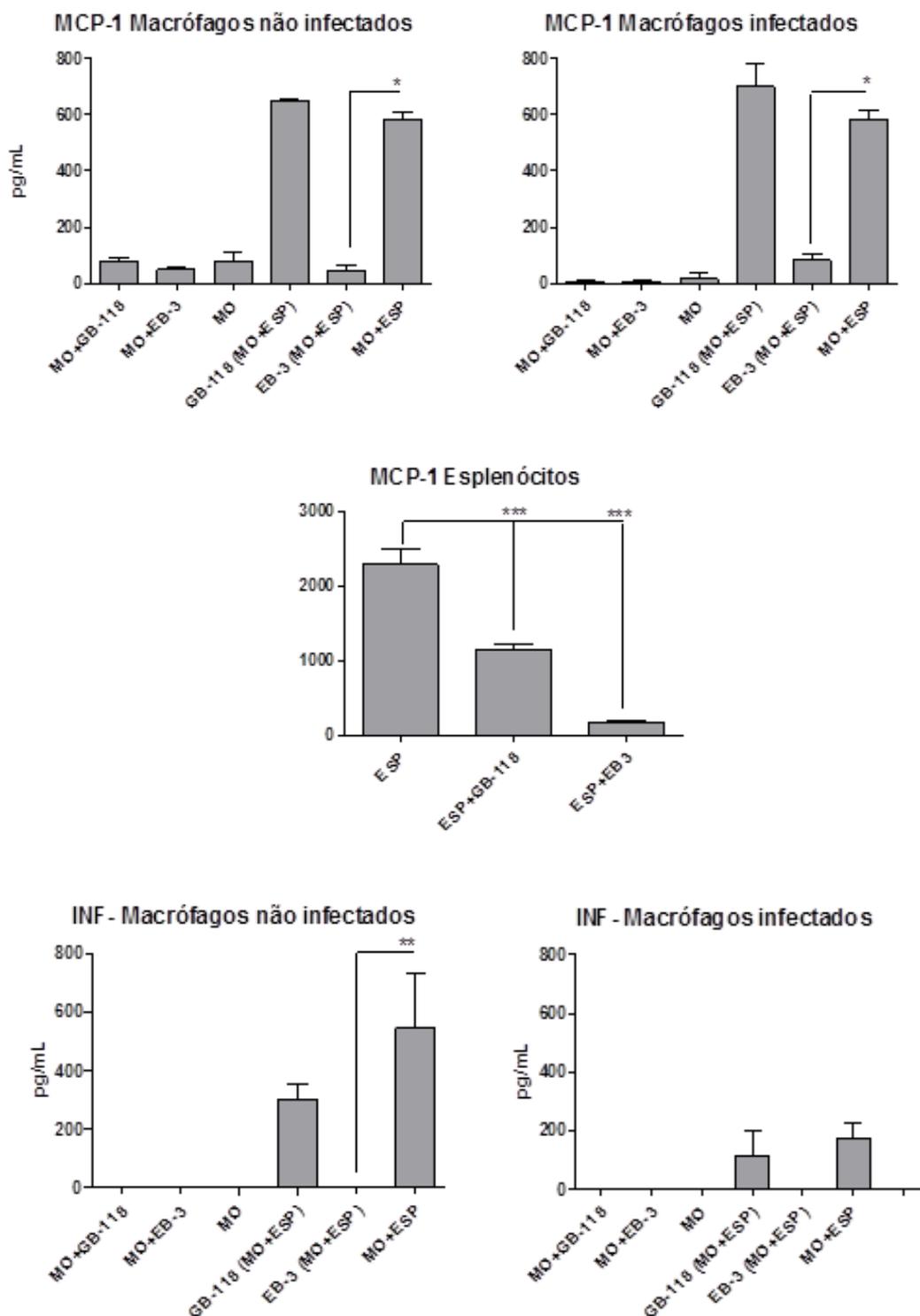


Figura 15: Quantificação da produção da citocina IFN- γ em macrófagos não infectados ou infectados com *Leishmania (L.) infantum*, co-cultivados ou não com células não aderentes, determinados pelo tratamento (na CC₂₅) com os compostos **EB-3** (30 μ M) e **GB-118** (15 μ M). Os resultados são expressos em pg / mL e as citocinas foram quantificadas pelo Kit CBA (citometria de Beads Array). Lipopolissacarídeos de *Escherichia coli* (LPS-SIGMA) para macrófagos e concanavalina A (ConA) para células não aderentes (1 μ M / mL) foram usados como controle.

4.6 Análise computacional *In silico*: predição de compostos de interferência (PAINS) e agentes agregantes

Todos os compostos foram submetidos a um filtro computacional, a fim de identificar estruturas PAINS conhecidas. Do presente estudo, nenhum dos compostos foi previsto como PAINS. Todos os compostos deste estudo mostraram baixa similaridade química (coeficientes Tanimoto <0,25) a qualquer composto dentre um conjunto de dados de 12.600 agregantes prováveis com $clogP < 3.00$. Conseqüentemente, a probabilidade de atuarem como agregantes foi muito reduzida.

5) Discussão

A biodiversidade do ambiente marinho e a diversidade química dos organismos constituem um recurso importante de novos compostos antiparasitários que podem ser usados como recursos na pesquisa de novos fármacos. A utilização de invertebrados marinhos em estudos de novos fármacos (*Drug Discovery*) vem demonstrando ser uma poderosa ferramenta na aquisição de novas e inéditas moléculas (Kossuga et al., 2008; Reimão et al., 2008). Entre 1981 e 2010 moléculas sintéticas provenientes de derivados naturais ou com base em modificações químicas, foram responsáveis por mais de 50% de novas entidades químicas no mercado (Newman & Cragg, 2010).

Compostos guanidínicos, provenientes de esponjas marinhas, têm sido utilizados como uma fonte de compostos biologicamente ativos, demonstrando atividade antitumoral, antidiabetes, antifúngico, microbiana, antiparasitários e antivirais. A complexidade estrutural destes compostos e as suas atividades biológicas relatadas os tornam alvo de escolha para os estudos de desenho de fármacos (Berlinck et al., 2012; Shimokawa et al., 2005).

Na busca de novas alternativas para o tratamento de doenças negligenciadas causadas por parasitos tais como leishmaniose e doença de Chagas, avaliou-se a atividade antiprotozoária e citotoxicidade em células de mamífero de 14 compostos sintéticos guanidínicos originalmente isolados de invertebrados marinhos, visando o estudo do mecanismo de ação de compostos mais seletivos contra *Leishmania (L.) infantum*. Entre os 14 compostos testados contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, onze mostraram atividade; os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30, GB-118 e PMH-6 apresentaram valores de CE₅₀ inferior a 10 µM. Os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30 mostraram baixa citotoxicidade e índices de selectividade (SI) entre 12 e 28. O composto BA-22 foi aproximadamente 122 vezes mais ativo do que o fármaco padrão benznidazol no modelo testado.

No presente estudo, dentre os 14 compostos testados contra tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, onze mostraram atividade, sendo o composto BA-22 o mais ativo e apresentando uma CE_{50} no valor de 3 μM . Dentre os menos ativos destaca-se o composto BA-1, com valor de 88 μM . Os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30, GB-118 e PMH-6 apresentaram valores de CE_{50} inferiores a 10 μM . O índice de seletividade é um importante critério em *Drug Discovery* para se selecionar compostos mais promissores contra os parasitos, avaliando os efeitos tóxicos em células de mamíferos. Essa determinação é feita através da razão entre a CC_{50} em células de mamíferos e a CE_{50} nos parasitos. O ideal para que um composto contra *Trypanosoma cruzi* possa ser considerado “hit” ou protótipo, é que seu índice de seletividade (IS) maior do que 10 (Don & Ioset, 2015). Os valores de IS obtidos mostraram que os compostos BA-13, BA-18, BA-22, BA-30 apresentam baixa citotoxicidade com índices de seletividade (IS) entre 12 e 28. O composto BA-18, que apresentou um IS de 28, foi aproximadamente 110 vezes mais ativo do que o fármaco padrão benznidazol. O composto BA-22 também apresentou um alto IS, no valor de 18, e demonstrou ser 122 vezes mais ativo do que o fármaco padrão benznidazol. Santos et al., (2015) demonstraram a ação de compostos guaninínicos contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Barrosa e colaboradores (2014), demonstraram que quando comparado a droga padrão (benznidazol), um composto guaninínicos apresentou atividade 3 vezes maior e menor citotoxicidade, indicando ação seletiva do composto, o que não alterou a morfologia das células hospedeiras. Com base no teste colorimétrico do MTT, o que se avalia a capacidade oxidativa mitocondrial (Tada et al., 1986), pode-se sugerir uma atividade tripanomicida dos compostos guanidínicos estudados.

Estudos na literatura também vêm demonstrando a atividade anti-*Leishmania* de compostos guaninínicos (Ahmed et al., 2013; Hua et al., 2004; Stephens et al., 2003). No presente estudo, dentre os 14 compostos testados, 9 (64%) demonstraram atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania (L.) infantum* e 6 (42%) contra as formas amastigotas, sendo

a forma clinicamente relevante; destes, 4 (28,5%) resultaram em valores de CE_{50} abaixo de $< 10 \mu\text{M}$. O composto BA-30 foi o mais ativo contra as formas promastigotas mostrando um valor de CE_{50} de $6 \mu\text{M}$ enquanto que o composto BA-11 foi o menos ativo, com valor de CE_{50} de $109 \mu\text{M}$.

As formas amastigotas intracelulares são mais relevantes do ponto de vista clínico e principalmente mais importantes para teste de novos fármacos, por ser a encontrada no hospedeiro vertebrado; portanto, nossos estudos contemplaram ensaios em macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania (L.) infantum*. Dentre os compostos ativos, o GB-118 foi o composto mais ativo com uma CE_{50} de $2 \mu\text{M}$, mostrando atividade 7 vezes maior do que o fármaco padrão miltefosina. O composto ZA-1 mostrou ser o menos ativo, com valor de CE_{50} de $18 \mu\text{M}$, porém, comparado a miltefosina, esse valor pode ser considerado interessante nas formas intracelulares.

O sucesso de um composto com atividade anti-Leishmania depende de vários fatores, incluindo aqueles relacionados ao parasita no meio intracelular. Após a sua ligação à superfície de macrófagos, promastigotas são englobadas em um fagossomo conhecido como vacúolo parasitóforo, que sofre uma série de eventos de fusão para formar o fagolisossomo. Moléculas do complexo lipofosfoglicano (LPG) protegem as formas promastigotas das duras condições encontradas no vacúolo parasitóforo. A diferenciação das promastigotas em formas amastigotas e sua conseqüente proliferação ocorrem no ambiente ácido e rico em hidrolases do fagolisossomo. No entanto, o nível de expressão de LPG na superfície de amastigotas é baixo, então outros glicoconjugados também podem proteger as formas amastigotas. Uma vez dentro dos macrófagos, as leishmanias empregam uma variedade de mecanismos adaptativos para sobreviver às condições adversas encontradas neste novo ambiente (Descoteaux & Turco 1999; Cunningham 2002). Elas manipulam o ambiente hostil através da inibição de enzimas hidrolíticas, produtos metabólicos tóxicos como o NO, vias de sinalização celular, produção de citocinas, e outros eventos. Estas estratégias determinam o sucesso do parasito em evadir da resposta imune do hospedeiro e promover a sua sobrevivência (Bogdan & Röllinghoff 1998).

Desta forma, poucos compostos antiparasitários conseguem resistir as diversas barreiras celulares num ambiente hostil e ácido, desempenhando uma atividade letal no parasita e preservando a célula hospedeira e assim, justificando as dificuldades enfrentadas na área de descoberta de novos fármacos contra *Leishmania*.

Considerando-se que a seletividade é o atributo mais importante na busca de um novo candidato a fármaco, os compostos **GB-118** e **EB-3** demonstraram os maiores índices de seletividade, com valores de 20 e 25, respectivamente, e foram selecionados para a investigação de seus possíveis mecanismos de ação em *Leishmania (L.) infantum*. Entre esses compostos com atividade contra amastigota intracelulares. Os **EB-3**, o **GB-118** e o PMH-6 demonstraram um efeito particular: apresentaram uma maior atividade contra as formas amastigotas do que quando comparado as formas promastigotas extracelulares. Dentre vários fatores a serem considerados, este fato poderia estar relacionado a um potencial efeito imunomodulatório destes compostos. Para investigar se a atividade contra amastigota intracelular estaria relacionada a uma possível atividade imunomodulatória dos compostos, avaliou-se a produção de citocinas em macrófagos infectados ou não na presença dos compostos **EB-3** e **GB-118**.

Os compostos **EB-3** e **GB-118** não induziram produção de NO em macrófagos, sugerindo que não há ativação deste mediador pelas células hospedeiras para que os compostos exerçam um efeito letal no parasita. Além disso, a análise em citometria de fluxo demonstrou que os compostos **EB-3** e **GB-118** suprimiram significativamente a produção de citocinas TNF, IFN- γ e MCP-1 no macrófago, não alterando significativamente os níveis de IL-6 e IL-10. As citocinas desempenham papéis diferentes durante a infecção por *Leishmania* em macrófagos. Brandonísio e colaboradores (2002) demonstraram que, no tratamento com a citocina MCP-1 em macrófagos infectados com *L. (L.) infantum*, induz um aumento na produção de óxido nítrico e assim da atividade leishmanicida. A proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) são ativadores de leucócitos para a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbidas, e também

desempenham uma função de liberação de NO, favorecendo assim, a morte dos parasitos em macrófagos infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Além disso, a regulação positiva da citocina IL-6 tem sido associado a um desfecho letal da doença, que precede a morte em pacientes com leishmaniose visceral. Também tem sido demonstrado o aumento nos níveis de IFN- γ , IL-10 e IL-6 durante LV humana e a associação com a persistência da doença (Ansari et al., 2006; Verma et al., 2010). A literatura vem reportando que citocinas Th1 e TNF- α pró-inflamatórias, desencadeiam um sinal na produção de NO em ratos infectados com *L. major* (Green et al., 1990), aumentando o efeito antiparasitário. Apesar da ação anti-inflamatória dos compostos **EB-3** e **GB-118** em macrófagos infectados por *Leishmania* co-cultivada com esplenócitos, nossos ensaios demonstraram claramente a seletividade destes compostos nas formas amastigotas, sugerindo um possível alvo dirigido contra os parasitos na fase intracelular. Além disso, a atenuação da resposta imune por imunomoduladores como pentoxifilina associada com antimônio pentavalente, tem demonstrado a diminuição da inflamação dos tecidos em pacientes, levando a uma terapia curativa por meio da redução de TNF e IFN- γ (Brito et al., 2014).

O estudo do mecanismo de ação de fármacos pode fornecer informações importantes sobre novos alvos bioquímicos, sendo assim, utilizamos diferentes sondas fluorescentes e avaliou-se os possíveis danos da membrana plasmática e das mitocôndrias. *Leishmania (L.) infantum* possui apenas uma mitocôndria, tornando-a uma maquinaria importante para sobrevivência dos parasitos e assim um potencial alvo para drogas (Fidalgo et al., 2011; Jhingran et al., 2009; Croft et al., 2006; Joshi e Bakowaska, 2001).

Alterações da permeabilidade da membrana plasmática de *Leishmania (L.) infantum* foram observada através de uma sonda chamada SYTOX®Green, que possui afinidade por ácidos nucleicos. Havendo comprometimento na membrana dos parasitos, o corante penetra na célula, liga-se ao DNA e emite fluorescência (Mangoni et al., 2005). Observou-se que os compostos **EB-3** e **GB-118** foram capazes de permeabilizar as

membranas dos parasitos, na concentração testada, aumentando os níveis de fluorescência. O composto **EB-3** induziu de forma muito significativa essa permeabilização da membrana, resultando em 160% de permeabilização aos 60 min, quando comparados com os parasitos não tratados. O composto **GB-118** teve um aumento de 64% em relação ao controle não tratado. Efeitos semelhantes a esses com compostos guaninínicos não foram reportados na literatura até o momento. Porém, candidatos a fármacos têm sido mostrados na literatura alterando a permeabilidade da membrana plasmática de parasitos de *Leishmania*. Mesquita e co-autores, 2014 demonstraram que o fármaco econazol, através da sonda SYTOX®Green, induziu uma elevada permeabilização da membrana plasmática do parasitos *Leishmania (L.) infantum* bem como clotrimazole bifonazol, confirmando que esses compostos agem na membrana do parasita.

O potencial de membrana mitocondrial é essencial para manter a função fisiológica da cadeia respiratória gerando ATP e, na ausência de propriedades funcionais da mitocôndria, as células podem cessar a síntese de ATP levando à morte celular (Monteiro et al., 2003; Joshi e Bakowaska, 2011). Mamíferos possuem inúmeras mitocôndrias, assim garantem a sua funcionalidade daquelas com deficiência; já os tripanossomatídeos apresentam uma única mitocôndria, sendo vital para sua sobrevivência (Fidalgo et al., 2011), tornando-a um alvo potencial para fármacos. Em nosso estudo, investigamos o efeito dos compostos guaninínicos, **EB-3** e **GB-118**, sobre o potencial de membrana mitocondrial, determinada pela acumulação diferencial da sonda fluorescente rodamina 123, que inibe a função mitocondrial, assim marcando somente as mitocôndrias ativas ou viáveis. O fluorocromo rodamina 123 liga-se às membranas mitocondriais e inibe o transporte de elétrons, retardando a respiração celular. A intensidade de despolarização (70%) causada por ambos os compostos foi semelhante aos níveis observados no controle, azida sódica.

Já existem relatos na literatura de compostos guanidínicos causando despolarização da membrana mitocondrial. A metformina, um fármaco comumente prescrito para a diabetes de Tipo II, diminui a glicose no sangue

através da ativação de proteínas quinases e por inibição direta de glicerofosfato mitocondrial desidrogenase (Shaw et al., 2005). Fenformina e buformina, compostos guanidínicos com propriedades anti-diabéticas são conhecidos por inibir o complexo I mitocondrial (Natrass et al., 1978). O derivado guanidínico proguanil, age no potencial de membrana mitocondrial dos parasitos *Plasmodium* sp, agente etiológico da malária (Bridges et al., 2014). Outros medicamentos usados na clínica, como a anfotericina B, também tem efeito de despolarização de membrana mitocondrial (Lee et al., 2002). Paromomicina diminui significativamente o potencial de membrana mitocondrial da *Leishmania* (*L.*) *infantum*, indicando que esta organela pode ser um destino do fármaco (Croft et al., 2006; Jhingran et al., 2009).

O potencial de membrana mitocondrial revela a transferência de íons hidrogênio pela membrana interna durante o processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa. Sob condições fisiológicas, a fosforilação oxidativa libera entre 3 a 5% de espécies reativas de oxigênio (ROS) sobre o total de oxigênio consumido (Boonstra e Post, 2004). *Leishmania* (*L.*) *infantum* adota mecanismos de defesa para lidar com o estresse oxidativo, incluindo a expressão de enzimas antioxidantes como tripanotiona (T (SH)₂) (Olin-Sandoval et al., 2010), superóxido dismutase (Mehlotra, 1996), peroxidases (Krauth-Siegel et al., 2007), tripanotiona S-transferase (Vickers & Fairlamb, 2004), 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH) (Dardonville et al., 2003). Alguns desses mecanismos estão localizados nas mitocôndrias como FeSODA e peroxiredoxina (Castro et al., 2011). Espécies reativas de oxigênio (ROS), formados por um radical superóxido (O₂^{•-}) e seus derivados como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila (HO[•]), hipoclorito (OCl⁻) e peroxinitrito (ONOO⁻) são derivados importantes na sinalização de que algo vai errado com a célula e a sua acumulação conduz ao estresse oxidativo causado por uma disfunção da cadeia respiratória mitocondrial da *Leishmania* (Mesquita et al., 2013).

Para determinar se os compostos guaninínicos elevam esses níveis de ROS, utilizamos sonda 2',7'- diacetato de dicloro hidro fluoresceína (H2DCF-DA) que é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína

utilizada como um indicador de ROS. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, a sonda H2DCF-DA, que não é fluorescente, é convertida para a forma altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína 47(DCF). Sendo assim, o composto **EB-3** foi o composto mais eficaz e teve um aumento de 360% dos níveis de ROS em *Leishmania (L.) infantum*, em relação ao maior que o controle não tratado; o composto **GB-118** mostrou um efeito semelhante, mas de menor extensão (60%) quando em comparação com o controle.

Considerando que os compostos **EB-3** e **GB-118** induziram uma alta alteração dos níveis de ROS em *Leishmania* e causaram à despolarização do potencial de membrana mitocondrial, isso sugere que esses compostos guaninínicos podem exercer a ação anti-*Leishmania* por duas maneiras: i) a possível inibição de enzimas antioxidantes, causando a acumulação de ROS dentro da célula ou, ii) danos para a fosforilação oxidativa em mitocôndrias, levando a um aumento da produção de ROS.

Levando em consideração os efeitos nas mitocôndrias, é bastante provável que os compostos guaninínicos aqui investigados afetam o sistema respiratório da *Leishmania*, conduzindo os parasitos a morte. Este resultado pode ser uma estratégia útil para matar os protozoários, uma vez que estes microorganismos apresentam uma única mitocôndria. A capacidade destes compostos de induzir a morte dos parasitos na forma intracelular sem necessidade de ativação imunológica da célula hospedeira poderia ser útil no caso de pacientes com imunodeficiência.

Considerando o potencial destes compostos como protótipos para dar continuidade dos estudos em Leishmaniose visceral, foi realizada uma análise *in silico* para se verificar a possibilidade destes compostos agirem como agentes de interferência ou "PAINS" (*pan-assay interference compounds*). Em *Drug Discovery*, principalmente em estudos *in vitro*, muitos compostos vêm demonstrando uma "promissora" atividade biológica, porém, esta pode estar associada a um efeito indireto ou "promíscuo", isto é, o composto, apesar de ativo, tem a capacidade de se ligar não somente a uma proteína-alvo do parasita, mas a qualquer proteína de célula, causando

danos celulares e conseqüentemente, resultando em atividades falso-positivas (Baell, 2016). Para se evitar tais erros e uma continuidade dos estudos em projetos subsequentes, nosso grupo vem se preocupando em verificar estes parâmetros já em fases iniciais de testes. Desta forma, todos os compostos foram submetidos a um filtro computacional, a fim de identificar estruturas *PAINS* conhecidas. Esta análise tem valor substancial durante a triagem de compostos, porque a atividade aparente de *PAINS* é geralmente causada por sua reatividade, ao invés de ligações não-covalentes, e por interações não específicas com proteínas presentes no meio de cultura. Do estudo computacional, nenhum dos compostos foi previsto como interferente (*PAINS*). Além disso, é amplamente aceito que a agregação conduz a artefatos nos bioensaios pela ligação a proteínas solúveis. No entanto, Owen e colaboradores (Owen, et al., 2012) sugerem que a agregação também reduz ou elimina a atividade biológica de fármacos, conduzindo a resultados falso-negativos em bioensaios de cultura celular. Por conseguinte, os compostos foram também submetidas a um filtro computacional para a identificação de agregantes. Todos os compostos deste estudo mostraram baixa similaridade química (coeficientes Tanimoto <0,25) a qualquer composto dentre um conjunto de dados de 12.600 agregantes prováveis com $clogP < 3.00$. Conseqüentemente, a probabilidade de atuarem como agregantes foi muito reduzida.

Considerando os índices de seletividade, atividade <10 μ M, atividade nas formas intracelulares de *Leishmania infantum* e segurança estrutural devido a não similaridade a compostos de interferência (*PAINS*) agregantes, os compostos **GB-118** e **EB-3** mostraram-se promissores neste estudo e serão futuramente conduzidos para estudos em modelos experimentais animais em leishmaniose visceral.

6) Conclusões

1. Considerando os 14 compostos testados, 9 demonstraram atividade para ambos os parasitas, *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanosoma cruzi*.
2. Os compostos **EB-3** e **GB-118** demonstraram maior seletividade para forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum*.
3. Os compostos **EB-3** e **GB-118** induziram despolarização do potencial de membrana mitocondrial promovendo uma forte alteração dos níveis de ROS em *Leishmania (L.) infantum* contribuindo para um estresse oxidativo e levando à eliminação dos parasitos.
4. O composto **EB-3** apresentou um efeito anti-inflamatório no macrófago diminuindo a produção de citocinas (MCP-1 e INF- γ) em macrófagos não-infectados e infectados com *Leishmania (L.) infantum*, na tanto na presença ou ausência de esplenócitos.
5. Todos os compostos em estudo, incluindo o **EB-3 e GB-118** foram descartados na análise *in silico* de compostos de interferência (PAINS), como também como agregantes, demonstrando potencial como protótipos para futuros estudos.
6. Considerando a atividade *in vitro* dos compostos **EB-3 e GB-118** (<10 μ M) e o índice de seletividade (> 10), não afetando as células hospedeiras, nos permite selecionar estes compostos como candidatos para futuros estudos.

7) Referências

Abrahamsen MS, Templeton TJ, Enomoto S, Abrahante JE, Zhu G, Lancto CA, Deng M, Liu C, Widmer G, Tzipori S, Buck GA, Xu P, Bankier AT, Dear PH, Konfortov BA, Spriggs HF, Iyer L, Anantharaman V, Aravind L, Kapur V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. Science. 2004; 304:441-5.

Ahmed N, Brahmbhatt KG, Khan SI, Jacob M, Tekwani BL, Sabde S, Mitra D, Singh IP, Khan IA, Bhutani KK, Synthesis and biological evaluation of tricyclic guanidine analogues of batzelladine K for antimalarial, antileishmanial, antibacterial, antifungal, and anti-HIV activities. Chem Biol Drug Des 2013; 81: 491-98.

Akhavan D. Cost-effectiveness analysis of the project for controlling Chagas Disease in Brazil-final report. Pan American Health Organization. 2000; Brasília.

Alexander J and Bryson K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. Immunol Lett. 2005; 99:17-23.

Allingham MT, Howard-Jones A, Murphy PJ, Thomas DA, Caulkett PWR. Synthesis and applications of C2 symmetric guanidine bases. Tetra. Lett. 2003; 44: 8677-80.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends Parasitol. 2006; 22: 552-7.

Ansari NA, Saluja S, Salotra P. Elevated levels of interferon-gamma, interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. Clin Immunol. 2006, 119: 339-345.

Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases Int J Parasitol. Drugs Drug Resist. 2014; 244:95-111.

Apt W, Zulantay I. Update on the treatment of Chagas disease. Rev Med Chil. 2011; 139: 247-57.

Arendse B, Van Snick J, Brombacher F. IL-9 is a susceptibility factor in *Leishmania major* infection by promoting detrimental Th2/type 2 responses. J Immunol. 2005; 174:2205-11.

Baell JB. Feeling Nature's PAINS: Natural Products, Natural Product Drugs, and Pan Assay Interference Compounds (PAINS). J Nat Prod. 2016, 79:616-28.

Barreto ML, Carmo EH, Santos CS, Ferreira L. Emergentes, re-emergentes e permanentes: tendências recentes das doenças infecciosas e parasitárias no Brasil. Inf. Epidemiol Sus. 1996; 3: 7-17

Barrosa KH, Pinto EG, Tempone AG, Martins EG, Lago JH. Alchornedine, a new anti-trypanosomal guanidine alkaloid from *Alchornea glandulosa*. Planta Med. 2014; 80:1310-4.

Beach DH, Holz GGJ, Anekwe GE. Lipids of *Leishmania* promastigotes. J. Parasitol. 1979; 65: 201-17.

Bergmann W & Feeney RJ. Contributions to the study of marine products. J Org Chem. 1951; 16: 98198-7.

Berlinck RGS, Trindade-Silva AE, Santos MFC. The chemistry and biology of organic guanidine derivatives. Nal Prod Repor. 2012; 29: 1382-1406.

Bern C. Chagas Disease. *N Engl J Med.* 2015; 373: 456-66.

Black GP, Coles SJ, Hizi A, Howard-Jones AG, Hursthouse MB, McGown AT, Loya S, Moore CG, Murphy PJ, Smith NK, Walshe ND. A. Synthesis and biological activity of analogues of ptilomycalin. *Tetra. Lett.* 2001; 42: 3377.

Black GP, Murphy PJ, Walshe NDA, Hibbs DE, Hursthouse MB, Malik KMA. A short synthetic route to the tricyclic guanidinium core of the batzelladine alkaloids. *Tetra Lett.* 1996; 37: 6943.

Black GP, Murphy PJ, Walshe NDA. A short Synthetic Route to the Tricyclic Guanidinium Core of the Batzelladine Alkaloids. *Tetra.* 1998; 54: 9481.

Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2012; 29: 144-222.

Blunt JW, Copp BR, Keyzers RA, Munro MH, Prinsep MR. Marine natural products. *Nat Prod Rep.* 2015; 32: 116-211.

Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunology Review.* 2000; 173: 17-26.

Boletim epidemiológico, Doença de Chagas aguda no Brasil. Volume 46 N° 21 -2015.

Boonstra J, Post JA. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. *Gene* 2004; 4;337:1-13.

Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance

parasite killing in leishmania infantum-infected human macrophages. *Clinical Experimental Medicine*. 2002; 2: 125-129.

Brasil. Secretaria de Vigilância e Saúde. Distribuição dos casos confirmados de leishmaniose visceral de 1980 a 2005. Acesso em: 20 nov. 2006.

Bridges HR, Jones AJ, Pollak MN, Hirst J. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem. J.* 2014; 15: 475-87.

Bogdan C, Rölinghoff M 1998. The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. *International Journal for Parasitology*. 1998; 28: 121-134.

Brito G, Dourado M, Polari L, Celestino D, Carvalho LP, Queiroz A, Carvalho EM, Machado PR, Passos S. Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. *Am J Trop Med Hyg.* 2014, 90, 617-620.

Burle-Caldas GA, Grazielle-Silva V, Laibida LA, da Rocha WD, Teixeira SM. Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2015; S0166-6851(15)30035-9.

Buss AD, Cox B, Waigh RD. Burger's medicinal chemistry and drug discovery. In: *Drug discovery*. Hoboken: Wiley. 2003; 847-900.

Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod.* 2004; 67: 2141-53.

Carmo EH, Barreto ML, da Silva Jr JB. Mudanças nos padrões de morbimortalidade da população brasileira: os desafios para um novo século. *Epidemiol. E Serv. Saúde.* 2003; 12: 63-75.

Carroll AR & Avery VM. Leptoclinidamines A-C, indole alkaloids from the Australian ascidian *Leptoclinides durus*. *J Nat Prod*. 2009; 72: 696-99.

Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD Jr. Antigen-specific accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. *J Exp Med*. 2007; 204: 805-17.

Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 1984; 152: 5949-56.

Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *J Clin Invest*. 1989; 83:860-4.

Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaró R, Rocha H, Johnson WD Jr. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. *J Infect Dis*. 1992; 165:535-40

Carvalho L, Luque-Ortega JR, Lopez-Martin C, Castanys S, Rivas L, F, Gamarro F. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55: 4204-10.

Castro H, Teixeira F, Romao S, Santos M, Cruz T, Flórido M, Appelberg R, Oliveira P, Ferreira-da-Silva F, Tomás AM. *Leishmania* mitochondrial peroxiredoxin plays a crucial peroxidase-unrelated role during infection: insight into its novel chaperone activity. *PLoS Pathog*. 2011; 7: e1002325.

Caukett P, Howard-Jones A, Murphy PJ, Thomas D. Synthesis of a novel C2 symmetric guanidine base. *J Org Chem.* 1999; 64: 1039.

Chakraborty B, Biswas S, Mondal S, Bera T. Stage specific developmental changes in the mitochondrial and surface membrane associated redox systems of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote. *Biochem.* 2010; 75: 494-504.

Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010; 2010:719361.

Chen M, Bennedsen M, Zhai L, Kharazmi A. Purification and enzymatic activity of an NADH-fumarate reductase and other mitochondrial activities of *Leishmania* parasites. *APMIS.* 2001; 109: 801-8.

Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003; 278:36027-36031.

Chevalier B, Carmoi T, Sagui E, Carrette P, Petit D, de Mauleon P, Pourriere M, Martinie C, Didier C. Report of the first cases of cutaneous Leishmaniasis in East Timor. *Clin Infect Dis.* 2000; 30: 840.

Costa CH. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008; 24: 2959-63.

Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente SA, Miles MA. Emerging Chagas disease in amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 171-6.

Cragg GM, Newman DJ. A tale of two tumor targets: topoisomerase I and tubulin. The Wall and Wani contribution to cancer chemotherapy. *J Nat Prod.* 2004; 67: 232-44.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis - chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitol.* 2003; 19: 502-8.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. *Clin Microbiol and Infec.* 2011; 17: 1478-83.

Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother.* 1996; 38:1041-7

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH, Drug resistance in leishmaniasis (Reviews). *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19: 111-26.

Croft, SL Sundar, S Fairlamb, AH. Drug resistance in leishmaniasis *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19:111–26.

Cunningham ML & Fairlamb AH. Trypanothionereductase from *Leishmania donovani*. Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem.* 1995; 1: 460-68.

Cunningham AC 2002. Parasitic adaptative mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72: 132-141.

Dardonville C, Rinaldi E, Hanau S, Barrett MP, Brun R, Gilbert IH. Synthesis and biological evaluation of substrate-based inhibitors of 6-phosphogluconate dehydrogenase as potential drugs against African trypanosomiasis. *Bioorg. Med. Chem.* 2003; 11: 3205-14.

de Lana M, Martins-Filho OA. Revisiting the posttherapeutic cure criterion in Chagas Disease: time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 652985.

De Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Intern J of Bioch & Cell Biol.* 2009; 41: 2069-80.

De Souza W, Brasil RP. An electron microscopic and cytochemical detection of concanavalin A receptors on the cell membrane of *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Z Parasitenk.* 1976; 50: 1-9.

Descoteaux A, Turco SJ. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta.* 199; 1455: 341-352.

Dey R, Meneses C, Salotra P, Kamhawi S, Nakhasi HL, Duncan R. Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. *Mol Microbiol.* 2010; 77: 399-414.

Dias JC. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2007; Suppl 1: S13-22.

DNDi, Drug for Neglected Diseases initiative. Visceral Leishmaniasis: estratégia da DNDi para na America Latina. [acesso em 19 de agosto de 2015]. Disponível em <http://www.dndi.org.br/pt/doencasnegligenciadas/leishmaniose-visceral/estrategia-da-dndi.html>.

Donia M & Hamann MT. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 338-48.

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 2014 Jan;141(1):140-6. doi: 10.1017/S003118201300142X. Epub 2013 Aug 28. Review. Erratum in: *Parasitology*. 2014;141:147.

Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Chemother* 2012; 11: 2576-97.

Dutra WO, Menezes CA, Magalhães LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol* 2014; 36: 377-87.

Ebada SS & Proksch P. Chemical and pharmacological significance of natural guanidines from marine invertebrates. *Mini Rev Med Chem*. 2011; 11: 225-46.

Ekins S, Ecker GF, Chiba P, Swaan PW. Future directions for drug transporter modelling. *Xeno*. 2007; 37: 1152-70.

Elmahallawy EK and Agil A. Treatment of leishmaniasis: a review and assessment of recent research. *Curr Pharm Des*. 2015; 21: 2259-75.

Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res*. 2011; 28: 2758-70.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim H, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Intern J for Parasitol: Drugs and Drug Resistance*. 2012; 2: 11-19.

Frézard F, Demichelli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molec*. 2009; 14: 2317-36.

Fries DS & Fairlamb AH. Chemotherapeutic agents. Burger's medicinal chemistry and drug discovery (ABRAHAM DJ. Ed). Sixth Edition. John Wiley & Sons, Inc. 5: 1033-1088; 2003.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010; 115 (1-2): 22-7.

Gehrke SS, Pinto EG, Steverding D, Pleban K, Tempone AG, Hider RC, Wagner GK. Conjugation to 4-aminoquinoline improves the anti-trypanosomal activity of Deferiprone-type iron chelators. *Bioorg Med Chem.* 2013; 21: 805-13.

Gille L & Nohl H. The ubiquinol/bc1 redox couple regulates mitochondrial oxygen radical formation. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 388: 34-38.

Goto H & Lindoso JA. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37: 615-23.

Gruenheid S, Finlay BB. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature.* 200; 422: 775-81.

Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug Discov Today.* 2008; 13: 894-901.

Heinsbroek SE, Gordon S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 14;11:e14.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature.* 1966; 212: 1385-6.

Hua HM, Peng J, Fronczek FR, Kelly M, Hamann MT. Crystallographic and NMR studies of antiinfective tricyclic guanidine alkaloids from the sponge *Monanchora unguifera*. *Bioorg. Med Chem.* 2004; 12: 6461–64.

Huyck TK, Gradishar W, Manuguid F, Kirkpatrick P. Eribulin mesylate. *Nat Rev Drug Discov.* 2011; 10:173-174.

Ireland BK, Acquavella JF, Kier LD. Acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 1993; 85: 920-921.

Irwin JJ, Duan D, Torosyan H, Doak AK, Ziebart KT, Sterling T, Tumanian G, Shoichet BK. An Aggregation Advisor for Ligand Discovery. *J. Med. Chem.* 2015, 58: 7076–7087.

Jain K, Jain NK. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. *J Immunol Methods.* 2015 Apr 7. pii: S0022-1759(15)00093-9.

Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 164: 111–7.

Joshi DC, Bakowska JC. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. *J Vis Exp.* 2011: 23, 51.

Kirchhoff LV. American trypanosomiasis (Chagas' disease). *Gastroenterol Clin North Am.* 1996; 25: 517-33.

Kongkaew W, Siriarayaporn P, Leelayoova S, Supparatpinyo K, Areechokchai D, Duang-ngern P, Chanachai K, Sukmee T, Samung Y, Sridurongkathum P. Auto chthonous visceral leishmaniasis: a report of a

second case in Thailand. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2007; 38: 8-12.

Korolkovas A. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982.

Kossuga MH, Nascimento AM, Reimão JQ, Tempone AG, Taniwaki NN, Veloso K, Ferreira AG, Cavalcanti BC, Pessoa C, Moraes MO, Mayer AM, Hajdu E, Berlinck RG. Antiparasitic, antineuroinflammatory, and cytotoxic polyketides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus* collected in Brazil J Nat Prod. 2008; 71: 334-9.

Krauth-Siegel LR, Comini MA, Schlecker T. The trypanothione system. Subcell Biochem. 2007; 44: 231-51.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, Mcgwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. J of Biol Chem. 2009; 284:15496-504.

Kulkarni MM, Reddy N, Gude T, McGwire BS, Voriconazole suppresses the growth of *Leishmania* species in vitro. Parasitol. Res 2013; 5: 2095-99.

Lainson R & Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: Academic Press; 1987; 291-364.

Lázaro-Diéguez F, Aguado C, Mato E, Sánchez-Ruíz Y, Esteban I, Alberch J, Knecht E, Egea G. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. J Cell Sci. 2008;121: 1415-25.

Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 2002, 9: 53-64.

Le Pape P. Development of new antileishmanial drugs – current knowledge and future prospects. *J of Enz Inh and Med Chem.* 2008; 3: 708-18.

Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J, Hoppel CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2001; 33: 1065-89

Lezama-Davila CM, Isaac-Marquez AP, Barbi J, Cummings HE, Lu B, Satoskar AR. *Immunol. Cell. Biol.* 2008; 86: 539–43.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 12: 2-83.

Lombardino JG, Lowe JA. The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. *Nat Rev Drug Discov.* 2004; 3: 853-62.

Luque-Ortega JR, Rivero-Lezcano OM, Croft SL, Rivas L. In Vivo Monitoring of Intracellular ATP Levels in *Leishmania donovani* Promastigotes as a Rapid Method to Screen Drugs Targeting Bioenergetic Metabolism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 1121-25

Macedo-Silva ST, Visbal G, Urbina JA, de Souza W and Rodrigues JC. Potent in vitro ant iproliferative synergism of combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 3: 1150-215.

Mangoni ML, Saugar JM, Dellisanti M, Barra D, Simmaco M, Rivas L. Temporins, small antimicrobial peptides with leishmanicidal activity. *J Biol Chem.* 2005; 280: 984-90.

Marin-Neto JA, Rassi Júnior RA, Avezum Júnior A, Rassi A. The benefit trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 319-324.

Martins A, Vieira H, Gaspar H, Santos S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: tips for success. *Mar Drugs.* 2014; 12: 1066-1101.

Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN Jr, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(2): e1508. A.

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality due to Chagas disease in Brazil from 1979 to 2009: trends and regional differences. *J Infect Dev Ctries.* 2012 Nov 26; 6: 817-24. B

Martins-Melo FR, Ramos AN Jr, Alencar CH, Lange W, Heukelbach J. Mortality of Chagas' disease in Brazil: spatial patterns and definition of high-risk areas. *Trop Med Int Health.* 2012 Sep; 17: 1066-75. D

Mather MW, Henry KW, Vaidya AB. Mitochondrial drug targets in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets.* 2007; 8: 49–60.

Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol.* 2006; 1-20.

Mayer AM, Glaser KB, Cuevas C, Jacobs RS, Kem W, Little RD, McIntosh JM, Newman DJ, Potts BC, Shuster DE. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends Pharmacol Sci.* 2010 Jun; 3: 255-65.

McIntosh M, Cruz LJ, Hunkapiller MW, Gray WR and Olivera BM. Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch Biochem Biophys.* 1982; 218: 329-34.

Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Rijal S, Faiz MA, Boelaert M. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *Plos Neg Trop Dis.* 2010; 4 e818.

Mehlotra RK. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Crit. Rev. Microbiol.* 1996; 22: 295-314.

Menna-Barreto RF, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 614014.

Mesquita JT, da Costa-Silva TA, Borborema SE, Tempone AG. Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi*: reactive oxygen species induced by econazole. *Mol Cell Biochem.* 2014; 389:293-300.

Mesquita JT, Pinto EG, Taniwaki NN, Galisteo Jr, AJ Tempone AG. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Act Trop.* 2013; 128: 666-73.

Mesquita-Rodrigues C, Menna-Barreto RF, Sabóia-Vahia L, Da-Silva SA, de Souza EM, Waghbi MC, Cuervo P, De Jesus JB. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis*

promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl. PLoS Negl Trop Dis. 2013; 17:7(10): e248.

Mishra J, Singh S. Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. Exp Parasitol. 2013; 135: 397-406.

Monteiro P, Oliveira PJ, Gonçalves L, Providencia LA. Mitocôndrias: que papel na isquemia, reperfusão e mortecelular. Ver Port Cardiol 2003; 22: 233-54.

Morgan HL. The Generation of a Unique Machine Description for Chemical Structures-A Technique Developed at Chemical Abstracts Service. J. Chem. Doc. 1965, 5, 107–113.

Morel CM & Lazdins J. News and Analysis Nature Reviews Microbiology. 2003; 1: 14-5.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015; 373 :1295-306

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. Nat Rev Immunol. 2008; 8: 958-69.

MS. Ministério da Saúde. Brasil. Secretária de Estado da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica. 7. ed. 2009.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento Leishmaniose Visceral. Brasília; 2006.

MS. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a Coinfecção de *Leishmania*- HIV. Brasília; 2011.

Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M: Diagnóstico y tratamiento de La enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31 (Suppl.1): 26-34.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lan.* 2005; 366: 1561-1577.

Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *J Clin Invest.* 1983; 72:1506-10.

Natrass M, Alberti KGMM. Biguanides. *Diabetol.* 1978; 14: 71-4.

Neumann A, Baginski, Czub J. How do sterols determine the antifungal activity of amphotericin B? Free energy of binding between the drug and its membrane targets. *J Am Chem Soc.* 2010; 29: 18266-72.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* 2012; 75:311-335.

Nogrody TWDF. *Medicinal Chemistry: A Molecular and Biochemical Approach*, USA: Oxford University Press; 2005.

Nylén S, Maurya R, Eidsmo L, Manandhar KD, Sundar S, Sacks D. Splenic Okwor I & Uzonna J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. *Human vaccines*. 2009; 5: 291–301.

Olin-Sandoval V, Moreno-Sánchez R, Saavedra E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr. Drug. Targets*. 2010; 11: 1614-30.

Oliveira JS & Freitas JC. Produtos naturais marinhos: características dos envenenamentos alimentares e substâncias de interesse farmacológico. *Hig Aliment*. 2001; 15: 22-33.

Oliveira MF, Dias ATN, Pontes VMO, Souza Júnior AS, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da Doença de Chagas no Brasil. *Rev Patol Trop*. 2008; 37: 209-28.

Olliaro PL. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infec Dis* 2010; 23: 595-602.

Organização Mundial da Saúde. Control of the leishmaniasis. Thirteenth. Geneve: 2010.

Organização Mundial da Saúde . Chagas' disease (American trypanosomiasis) fact sheet (revised in March 2013).

Owen SC, Doak AK, Wassam P, Shoichet MS, Shoichet BK. Colloidal Aggregation Affects the Efficacy of Anticancer Drugs in Cell Culture. *ACS Chem. Biol*. 2012, 7:1429–1435

Passero LF; Laurenti MD; Santos-Gomes G. Modelos roedores utilizados no estudo de Leishmaniose tegumentar americana. IN: Barral A; Costa J. *Leishmania e a leishmaniose tegumentar na Américas*. 2011. 8: 75-79.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi ME, Hotez PJ. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? PLoS Negl Trop Dis. 2016; 25;10(2):e0004343.d

Pedersen PL. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview. J Bioenerg Biomem br. 1999; 4: 291-304.

Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis. 2013; 19: 19-34.

Pettit GR, Kamano Y, Herald CL, Tuinman AA, Boettner FE, Kizu H, Schmidt JM, Baczynskyj L, Tomer KB, Bontems RJ. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent-Dolastatin 10. J Am Chem Soc. 1987; 109: 6883-85.

Pommier Y, Kohlhagen G, Bailly C, Waring M, Mazumder A, Kohn KW. DNA sequence-and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. Biochem. 1996; 15: 13303-13309.

Queiroz MJA, Alves JGB, Correia JB. Leishmaniose visceral: características clínico-epidemiológicas em crianças de área endêmica. J de Ped. 2004; 80: 141-46.

Ramos Jr AN, Martins-Melo FR, Barbosa JC, Heukelbach J. The role of operational research and the challenges for integration of care and control of Chagas disease in the Brazilian Unified Health System. Rev Soc Bras Med. Trop. 2010; 43: 12-17.

Rangel M & Falkenberg M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the Market. *J of Coas Life Med.* 2015; 3: 421-28.

Reimão JQ, Migotto AE, Kossuga MH, Berlinck RG, Tempone AG. Antiprotozoan activity of Brazilian marine cnidarian extracts and of a modified steroid from the octocoral *Carijoa riisei*. *Parasitol Res.* 2008; 103:1445-50.

Rey L. Parasitologia. Parasitos e doenças parasitárias do homem nostrópicos ocidentais. 4ª edição. RJ. Guanabara Koogan; 2008.

Riniker S, Landrum GA. Open-Source Platform to Benchmark Fingerprints for Ligand-Based Virtual Screening. *J. Cheminform.* 2013, 5, 26.

Rogers D, Hahn M. Extended-Connectivity Fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.* 2010, 50: 742–754.

Rose K, Curtis J, Baldwin T, Mathis A, Kumar B, Sakthianandeswaren A. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos: isolation and characterisation of the causative organisms. *Int J Parasitol.* 2004; 34: 655–64.

Roy A, Ganguly A, Bosedasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria-Dependent Reactive Oxygen Species-Mediated Programmed Cell Death Induced by 3,3'-Diindolylmethane through Inhibition of F₀F₁-ATP Synthase in Unicellular Protozoan Parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharm.* 2008; 74: 1292-1307.

Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 453-83.

Santhamma KR, Bhaduri A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 1995; 75: 43-53.

Santos MF, Harper PM, Williams DE, Mesquita JT, Pinto ÉG, da Costa-Silva TA, Hajdu E, Ferreira AG, Santos RA, Murphy PJ, Andersen RJ, Tempone AG, Berlinck RG. Anti-parasitic Guanidine and Pyrimidine Alkaloids from the Marine Sponge *Monanchora arbuscula*. *J Nat Prod*. 2015; 78:1101-12.

Berlinck RG. Anti-parasitic Guanidine and Pyrimidine Alkaloids from the Marine Sponge *Monanchora arbuscula*. *J Nat Prod*. 2015; 78:1101-12.

Saubern S, Guha R, Baell J B. KNIME Workflow to Assess PAINS Filters in SMARTS Format. Comparison of RDKit and Indigo Cheminformatics Libraries. *Mol. Inform.* 2011, 30, 847–850.

Sathler-Avelar R, Vitelli-Avelar DM, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA: Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009, 104(Suppl 1): 246-51.

Scala F, Fattorusso E, Menna M, Taglialatela-Scafati O, Tierney M, Kaiser M and Tasdemir D. Bromopyrrole alkaloids as lead compounds against protozoan parasites. *Mar Drugs*. 2010; 14: 2162-74.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010; 115 (1-2): 14-21.

Seiferd K and Croft L. In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2006; 50: 73-9.

Sen N, Majumder HK. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. *Current pharmaceutical design*. 2008; 14: 839-46.

Shaw RJ, Lamia KA, Vasquez D, Koo SH, Bardeesy N, de Pinho RA, Montminy M, Cantley LC. The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin. *Scien.* 2005; 310: 1642-46.

Shimokawa J, Ishiwata T, Shirai K, Koshino H, Tanatani A, Nakata T, Hashimoto Y, agasawa K Total synthesis of (+)-batzelladine A and (-)-batzelladine D, and identification of their target protein. *Chem.* 2005; 1811:6878-88.

Simpson L. "The kinetoplast of the harnoflagellates," *Inter Rev of Cytol.* 1972; 32: 139-207.

Silva MT. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol.* 2010; 87: 805-13.

Sindermann H, Croft L, Engel KR, Bommer W, Eibl J, Unger C, Engel J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2004; 193: 173-180.

Sneader W and Wiley J. Drug prototypes and their exploitation. 1996; 1:103-104.

Skov MJ, Beck JC, de Kater AW, Shopp GM. Nonclinical safety of ziconotide: an intrathecal analgesic of a new pharmaceutical class. *Int J Toxicol.* 2007; 26: 411-21.

Soares Sobrinho JL, Medeiros FPM, de La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Rolim Neto JR. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas Ver *Patol Trop.* 2007; 36: 103-8.

Soares Sobrinho JL, Medeiros FPM, de La Roca MF, Silva KER, Lima LNA, Rolim Neto JR. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da Doença de Chagas Ver Patol Trop. 2007; 36: 103-8.

Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. Mem Inst Osw Cruz. 2009; 104(Suppl.I): 167-80.

Stephens CE, Brun R, Salem MM, Werbovetz KA, Tanious F, Wilson WD, Boykin DW. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2,5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. Bioorg Med Chem Lett. 2003; 16: 2065-6.

Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. Expert Opin Pharmacother. 2013; 14: 53-63.

Sundar S, Chatterjee M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. Indian J Med Res. 2006; 123: 345-52.

Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Ailliant M, Olliaro P and Murray HW. New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. Clinical Infectious Diseases. 2008; 47: 1000-06.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. Trop Med and Intern Health. 2001; 6: 849-54.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto KJ. Methods Immunol. 1986; 93: 157-65.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. PLoS Pathog. 2013; 9(10).

Tempone AG, Borborema SE, De Andrade HF Jr, De Amorim Gualda NC, Yogi A, Carvalho CS, *et al* Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families Phytomedicine. 2005; 12:382-90.

Tempone AG, Oliveira CM, Berlinck RGS. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. Planta Med. 2011; 77: 572-85.

Tielens AG, van Hellemond JJ. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. Trends Parasitol. 2009; 2: 482-90.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. Inter J of Infect Dis. 2011; 15: e525–e532.

Turrens JF. Possible role of the NADH-fumarate reductase in superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol. 1987; 25: 55–60.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001; 3: 472-8.

Tziveleka LA, Vagias C, Roussis V. Natural products with anti-HIV activity from marine organisms. Curr Top Med Chem. 2003; 3: 1512-35.

Urbina JA. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. Curr Opin Infect Dis. 2001; 14: 733-41.

Van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 2012; 26: 309-22.

Van Hellemond JJ, Tielens AGM. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol and biochem Parasitol.* 1997; 85: 135-8.

Van Hellemond JJ, Van der Meer P, Tielens AGM. *Leishmania infantum* promastigotes have a poor capacity for anaerobic functioning and depend mainly on respiration for their energy generation. *Parasitology.* 1997; 114: 351-60.

Verma S, Kumar R, Katara GK, Singh LC, Negi NS, Ramesh V, Salotra P. Quantification of parasite load in clinical samples of leishmaniasis patients: IL-10 level correlates with parasite load in visceral leishmaniasis. *PLoS One.* 2010, 9, e10107.

Vickers TJ & Fairlamb AH. Trypanothione S-transferase activity in a trypanosomatid ribosomal elongation factor 1B. *J Biol Chem.* 2004; 279: 27246-56.

Wall ME. *Em Chronicles of Drug Discovery.* Washington: ACS Professional Reference Book; 1993; 328-48.

Wassef MK, Fioretti TB, Dwyer DM. Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes. *Lipids;* 1985; 20: 108-114.

Wermuth CG. *The practice of medicinal chemistry.* 2^o ed. London: Academic Press: 2008.

Wilson ME, Recker TJ, Rodriguez NE, Young BM, Burnell KK, Streit JA, Kline JN. The TGF-beta response to *Leishmania chagasi* in the absence of IL-12. *Eur J Immunol.* 2002; 32: 3556-65.

Yardley V, Croft SL. A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis *J Antimicrob Agents.* 2000; 4:243-8.

Yoneyama KAG, Tanaka AK, Silveira TGV, Takahashi HK, Straus AH. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *J of Lipid Research.* 2006; 47: 2171-78.

Zewail-Foote M & Hurley LH. Ecteinascidin 743: a minor groove alkylator that bends DNA toward the major groove. *J Med Chem.* 1999; 15: 2493-97.

Zhang K, Beverley SM. Phospholipid and sphingolipid metabolism in *Leishmania*. *Mol & Bioch Parasitol,* 2010; 170: 55–64.

8) Anexo



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 24 de fevereiro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur n° 02/2011

Prezado Senhor,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa "**Investigação *in vitro* do Potencial Anti-Leishmania e Anti-Trypanosoma cruzi de Metabólitos Isolados de Organismos Marinhos**", sob sua coordenação, foi considerado **APROVADO**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e encaminhar ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Adriano Abbud
Coordenador da CEUA-IAL/Pasteur

Ilmo. Sr.
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso
Pesquisador Científico
Centro de Parasitologia e Micologia
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, n° 355
10° Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César
São Paulo – SP – CEP: 01246-902
Tel: (11) 3068-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

