

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**PATRÍCIA FERREIRA ESPURI**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
CONTENDO PRATA EM SUA ESTRUTURA**

Alfenas/MG

2017

**PATRÍCIA FERREIRA ESPURI**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE COMPOSTOS ORGÂNICOS  
CONTENDO PRATA EM SUA ESTRUTURA**

Dissertação como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, na Universidade Federal de Alfenas de Minas Gerais. Área de concentração: Interação Patógeno-hospedeiro.

Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Colaborador: Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Espuri, Patrícia Ferreira

Avaliação da atividade leishmanicida de compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura / Patrícia Ferreira Espuri. -- Alfenas/MG, 2017.  
83 f.

Orientador: Marcos José Marques

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Leishmania. 2. Compostos de Prata. 3. Mecanismo de ação (Bioquímica). I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD-616.96



**Patrícia Ferreira Espuri**

**“Avaliação da Atividade Leishmanicida de Compostos Orgânicos Contendo Prata em sua Estrutura”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Interação Patógeno Hospedeiro

Aprovado em: 25 de julho de 2017.

Prof. Dr. Marcos José Marques  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

Profa. Dra. Letícia de Almeida  
Instituição: UNESP

Assinatura:

Prof. Dr. Ivo Santana Caldas  
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura:

*Dedico este trabalho:*  
*Ao meu pai, Antônio, por ser meu exemplo de vida e por todo amor e amizade.*  
*À minha irmã, Priscilla, por ser meu espelho e principalmente pelo incentivo.*  
*Ao meu marido, Tobias, pelo constante apoio, paciência, carinho e amor.*  
*À minha avó, Veneranda, por me ensinar a “lutar e vencer”.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por se revelar a mim, ainda que, por vezes, eu caminhe de olhos vendados, e principalmente por ser a força que conduz minha vida.

Ao meu pai, Antônio, minha eterna gratidão, pela sua dedicação, presença constante, amizade, compreensão, por me apoiar em todas minhas escolhas, e principalmente por ter exercido e exercer tão bem o papel de Mãe.

À minha mãe, Irmantina, que mesmo estando ao lado Dele, sinto como se estivesse aqui, sempre me proporcionando calma, me protegendo e sendo meu anjo, estrela-guia e minha fonte inspiradora em todos momentos.

À minha irmã, Priscilla, pelo carinho, irmandade, companheirismo, apoio para enfrentar todas as dificuldades encontradas durante todo esse tempo, e por me presentear com um pequeno príncipe, trazendo mais amor pro meu peito.

À minha avó-mãe, Veneranda, pelo cuidado, lições e orações, e por sempre apostarem na minha capacidade de vencer cada obstáculo proposto pela vida.

À Anicler, pelo exemplo de vida, cuidado e amizade.

Ao meu marido, Tobias, por todo incentivo, apoio, amizade, carinho e principalmente pelo abraço acolhedor a cada manhã, tornando os meus dias mais fáceis.

Às minhas madrinhas, Kelcya e Zita, pelo apoio e carinho.

À minha sogra, Eugênia, por toda amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Marcos, pelo acolhimento, orientação, oportunidade, confiança, ensinamentos, apoio e por toda atenção concedida, minha sincera gratidão.

Às amigas construídas no Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos, Laboratório de Patologia/Parasitologia. Em especial, Joana, Juliana, Isabella, Josimary e Fábio, pelos momentos de distração, companhia e pela parceria na realização dos experimentos.

Aos grandes amigos que passaram pelo Laboratório, mas que deixaram suas marcas. Em especial, Larissa, Fran e Luana.

À Vanessa Gontijo, por sempre estar disposta a me ajudar, tanto na realização de experimentos quanto no esclarecimento de dúvidas.

Às amigas construídas a partir de outros laboratórios e outros projetos. Em especial, Flávia e Laís.

À Prof. Dr. Márcia do Laboratório de Patologia de Moléstias Infecciosas (LIM-50) - Faculdade de Medicina da USP, pela recepção, acolhimento, ensinamentos e disposição da realização dos experimentos.

Ao Prof. Dr. Adelino da UNESP-Araraquara, pela disponibilidade em ceder os compostos para realização deste trabalho, juntamente com seus alunos, os quais fizeram a síntese.

Ao Prof. Dr. Cosme e Prof. Dr. Camps, pelos ensinamentos e disposição em ajudar na realização de experimento.

Aos amigos de infância, de Nepomuceno, agradeço pela amizade sincera, distração, amor, confiança. A distância nunca irá atrapalhar o que construímos há anos. E aos queridos amigos da graduação, em especial Aline.

Ao Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas – Unifal-MG, pela oportunidade em executar tal projeto e por todo aprendizado diante as disciplinas oferecidas.

À todos aqueles que me apoiaram, de forma direta e/ou indiretamente durante esse trabalho árduo e diante todos os obstáculos encontrados.

A Universidade Federal de Alfenas, pela acolhida.

A CNPq pelo fomento a pesquisa, permitindo maior empenho a este trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(CALCUTÁ, M. T , 1985)

## RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças cuja maioria tem caráter zoonótico e são causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, além de ameaçarem cerca de 350 milhões de indivíduos em 98 países. O tratamento é feito à base de antimoniais pentavalentes desde a década de 40, anfotericina B e pentamidina, porém a toxicidade destes, a persistência dos efeitos colaterais e a duração do tratamento são as principais dificuldades na terapia dos pacientes que apresentam tal doença. Neste contexto, a busca de novos fármacos menos tóxicos e mais eficazes é de extrema importância. Como há relatos na literatura de que a associação compostos de prata e ligantes diimínicos apresenta atividade leishmanicida, o presente estudo avaliou a atividade anti-*Leishmania in vitro* e *in vivo* de compostos orgânicos contendo este metal em sua estrutura (JB3, JB4, JB5, JB5SF e JB6), além dos ligantes 2-tionaimidazolina e fenantrolina e os prováveis mecanismos de ação. Para tanto, foram feitas análises das atividades leishmanicidas em promastigotas e amastigotas, no contexto *in vitro*, para a determinação do IC<sub>50</sub>, além da citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos para determinação do CC<sub>50</sub>. Para avaliar os possíveis mecanismos de ação destes compostos, foram feitos ensaios de inibição enzimática, utilizando isoforma r-CPB2.8; eletroforese para avaliar degradação do DNA; microscopia de força atômica e dosagem de óxido nítrico. Para análise *in vivo* foi utilizado PCR em tempo real para quantificar a carga parasitária de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* após tratamento experimental. O composto que apresentou melhores resultados sobre atividade anti-promastigota e anti-amastigota de *L. (L.) amazonensis* (8,06 µg/mL, 1,30 µg/mL, respectivamente) e *L. (L.) infantum chagasi* (1,46 µg/mL, 8,21 µg/mL, respectivamente) foi o JB5, e o que apresentou menor toxicidade foi o 2-tionaimidazolina. Como alguns compostos apresentaram uma toxicidade considerável, avaliou-se este parâmetro no ligante fenantrolina e obteve-se CC<sub>50</sub> = 30,80 µg/mL, concluindo que este contribui consideravelmente para a toxicidade dos compostos. Com isso, avaliou-se a atividade leishmanicida contra as formas do parasito do JB5SF (sem o grupamento fenantrolina) e obteve-se IC<sub>50</sub> de 1,80 e 8,91 µg/mL. Apesar do 2-tionaimidazolina ter sido o de menor toxicidade não foi tão eficiente para reduzir a carga parasitária das amastigotas teciduais quanto o Glucantime. Contudo, o composto JB5SF que apresentou o maior índice de seletividade (40,34) foi capaz de reduzir a carga parasitária das amastigotas teciduais, apresentando estatística semelhante, no fígado comparado com o fármaco de referência. Os

compostos não apresentaram atividade inibitória significativa frente à cisteíno proteases (rCPB2.8) e nem degradação do DNA do parasito. Especificamente o JB5SF na concentração de 5,0 µg/mL não produziu modificações na membrana do protozoário e não alterou significativamente a área da superfície do macrófago infectado. Todavia, o JB5SF na concentração de 10,0 µg/mL e associado ao LPS levou o macrófago infectado a uma maior produção de NO quando comparado ao não tratado. Embora não tenha sido definido o mecanismo de ação do composto sobre o parasito pode-se inferir que o mesmo pode contribuir com a resposta imune estimulando as células macrofágicas no processo de fagocitose.

Palavras-chave: *Leishmania*. Compostos de Prata. Mecanismo de Ação.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases most of which are zoonotic and are promoted by protozoan parasites of *Leishmania* genus, threatening around 350 million individuals in 98 countries. Since 1940s, treatment is based on pentavalent antimonials, amphotericin B and pentamidines, however the toxicity of these, the persistence of side effects and the duration of treatment are the main difficulties in the therapy of patients with such disease. In this context, the research for new, less toxic and more effective drugs is of utmost importance. As reported on literature, the association of silver compounds and diimine binders has leishmanicidal activity, the present study evaluated the anti-*Leishmania* activity *in vitro* and *in vivo* of organic compounds containing this metal in its structure (JB3, JB4, JB5, JB5SF And JB6), in addition to the 2-thionaimidazoline and phenanthroline binders and these probable activity mechanisms. With this aim, analyzes of leishmanicidal activities in promastigotes and amastigotes, *in vitro* context, were performed for IC<sub>50</sub> determination, in addition to cytotoxicity in murine peritoneal macrophages using MTT methodology to CC<sub>50</sub> determination. Evaluating possible mechanisms of these compounds action, enzymatic inhibition assays were performed using r-CPB2.8 isoform; electrophoresis to evaluate DNA degradation; atomic force microscopy and nitric oxide dosage to evaluate the interaction of these with the parasite and/or macrophage. For *in vivo* analysis, real-time PCR was performed to quantify the parasite bulk of hamsters infected with *L. (L.) infantum chagasi* after experimental treatment. The compound that presented the best results on *L. (L.) amazonensis* (8.06 µg/mL, 1.30 µg/mL, respectively) and *L. (L.) infantum chagasi* (1.46 µg/mL, 8.21 µg/mL, respectively) activity was JB5, and that showed the lowest toxicity was 2-thionamidazoline. As some compounds presented considerable toxicity, this trait was evaluated on the phenanthroline binder and CC<sub>50</sub> was equal 30.80 µg/mL, concluding that this contributes considerably to compounds toxicity. Therefore, the leishmanicidal activity against JB5SF parasite forms (without the phenanthroline group) was evaluated and IC<sub>50</sub> ranging from 1.80 and 8.91 µg/mL. Although 2-thionaimidazoline showed the lowest toxicity, it was not as efficient to reduce the amastigotes tissue parasitic bulk as Glucantime. However, the compound JB5SF that had the highest selectivity index (40,34) was able to reduce the parasitic load of the tissue amastigotes, presenting similar statistics, in the liver compared to the reference drug. The evaluated compounds showed no significant inhibitory activity against cysteine proteases (rCPB2.8) and no degradation of parasite DNA. Specifically, 5.0

$\mu\text{g/mL}$  of JB5SF did not produce protozoal membrane modifications and did not alter the significantly surface area of the infected macrophage. However, 10.0  $\mu\text{g/mL}$  JB5SF concentration associated with LPS increased NO production in infected macrophage when compared to untreated. Although the compound action mechanism on the parasite has not been defined, it is possible inferred that the same could contribute to immune response by stimulating macrophages in phagocytosis process .

Keywords: *Leishmania*. Silver Compounds. Mechanism of Action.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Principais formas evolutivas de <i>Leishmania</i> .....	24
Figura 2-	Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero <i>Leishmania</i> .....	25
Figura 3-	Estrutura química do composto JB3.....	37
Figura 4-	Estrutura química do composto JB4.....	38
Figura 5-	Estrutura química do composto JB5.....	38
Figura 6-	Grupamento fenantrolina (phen).....	38
Figura 7-	Grupamento 2-tionaimidazolina.....	38
Figura 8-	Esquema de delineamento do experimento.....	39
Figura 9-	Curva padrão do nitrito de sódio.....	44
Figura 10-	Atividade residual de proteases na presença de várias concentrações.....	56
Figura 11-	Dosagem de NO avaliada pela concentração de nitritos ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos sobrenadantes de culturas de células tratadas com JB5SF em duas concentrações, 10 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$ . Foi utilizado LPS à 1 $\mu\text{g/mL}$ .....	57
Figura 12-	Imagens de <i>Leishmania</i> obtidas do microscópio de força atômica (Park, NX10).....	58
Figura 13-	Imagens de macrófagos obtidas do microscópio de força atômica (Park, NX10).....	59
Figura 14-	Gel de Agarose 0.8% corado com Brometo de Etídeo representando a inibição das promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> em decorrência da exposição ao composto JB5SF.....	60
Figura 15-	Números de amastigotas vivas de <i>L. (L.) infantum chagasi</i> presentes nos fragmentos retirados de baço e fígado dos hamsters infectados, por grama de órgão, e quantificados pela PCR em tempo real ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney) e tratados com 2-tionaimidazolina (2-tiona) e Glucantime (GLU), comparados com o grupo não tratado(GNT).....	61
Figura 16-	Carga parasitária de fragmentos de baço e fígado de hamsters infectados com <i>L. (L.) infantum chagasi</i> e tratados com 25 mg/Kg/dia de JB5SF ou com 50 mg/Kg/dia de Glucantime (GLU), comparados com o grupo infectado e não tratado (GNT).....	61

## LISTA DE TABELAS

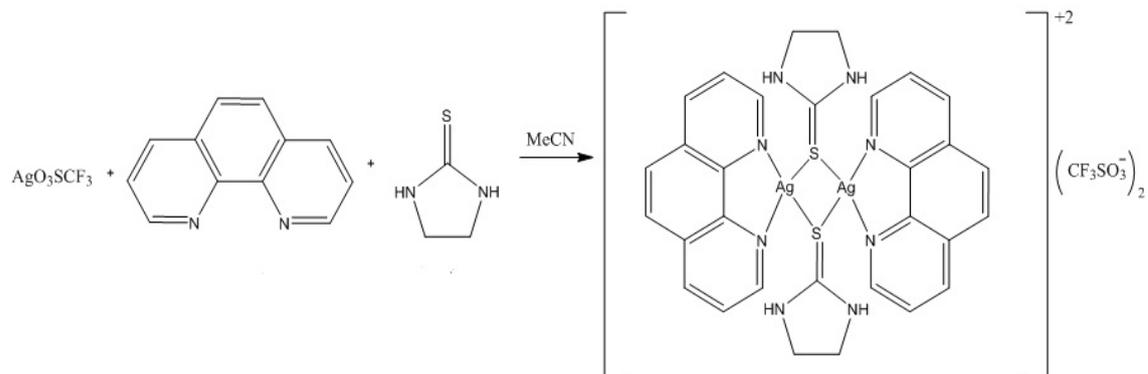
Tabela 1-	Atividade de compostos contendo prata em sua estrutura contra formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .....	51
Tabela 2-	Atividade de compostos contendo prata em sua estrutura contra formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .....	52
Tabela 3-	Compostos contendo prata em sua estrutura e atividade citotóxica (CC <sub>50</sub> ) à macrófagos peritoneais murinos.....	53
Tabela 4-	Atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i> , do composto JB5SF.....	54
Tabela 5-	Índice de Seletividade de acordo com <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) chagasi</i> .....	54
Tabela 6-	Avaliação antiproteolítica em cisteíno-protease r-CPB 2.8 de <i>L. (L.) mexicana</i> dos compostos organometálicos comparados ao padrão E64.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

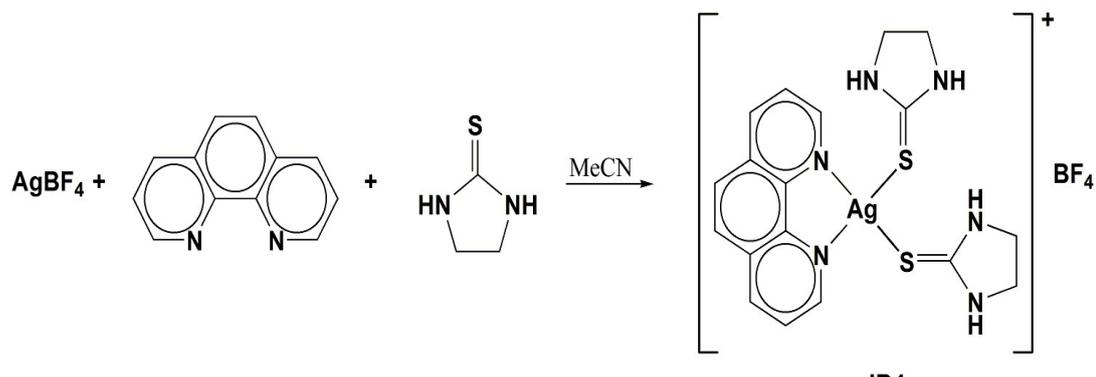
Ag-	Prata
AgNO <sub>3</sub> -	Nitrato de Prata
AmpB-	Anfotecicina B
CC <sub>50</sub> -	Concentração citotóxica para 50% das células
cDNA-	DNA complementar
CEUA-UNIFAL-	Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas
IC <sub>50</sub> -	Concentração inibitória que causa 50% do efeito
IC <sub>50</sub> -PRO-	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular de formas promastigotas
IC <sub>50</sub> -AMA-	Concentração Inibitória de 50% do crescimento celular de formas amastigotas
CONCEA-	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CPB-	Cisteína protease B
CPs-	Cisteína proteases
DTNs-	Doenças Tropicais Negligenciadas
DMSO-	Dimetilsulfóxido
DNA-	Ácido Desoxirribonucléico
DNTPs-	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT-	Ditiotreitól
Fase log-	Fase logarítmica
HIV-	Vírus imunodeficiência humana
JB5SF-	Composto JB5 sem fenantrolina
LIT-	Meio de cultura Liver Infusion Triptose
LTA-	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV-	Leishmaniose Visceral
mRNA-	RNA mensageiro
MTT-	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difenil tetrazólio
Nm-	Nanômetro
NO-	Óxido nítrico

Kg-	Quilogramas
PCR-	Reação em cadeia de polimerase
Phen-	Fenantrolina
RNA-	Ácido ribonucléico
RPMI-	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute médium
IS-	Índice de seletividade
SFB-	Soro Fetal Bovino
µg/mL-	Concentração em microgramas por mililitros
mg-	Miligramas
µL-	Microlitros
µM-	Concentração em micromolar
Via i.p.-	Via intraperitoneal
V <sub>máx</sub>	Velocidade máxima
WHO-	Organização Mundial de Saúde
Z-Phe-Arg-MCA-	Carbobenzoxicarbonil-Phe-Arg-7-amino-4-metilcumarina
λ	Comprimento de onda
Ø	Macrófago

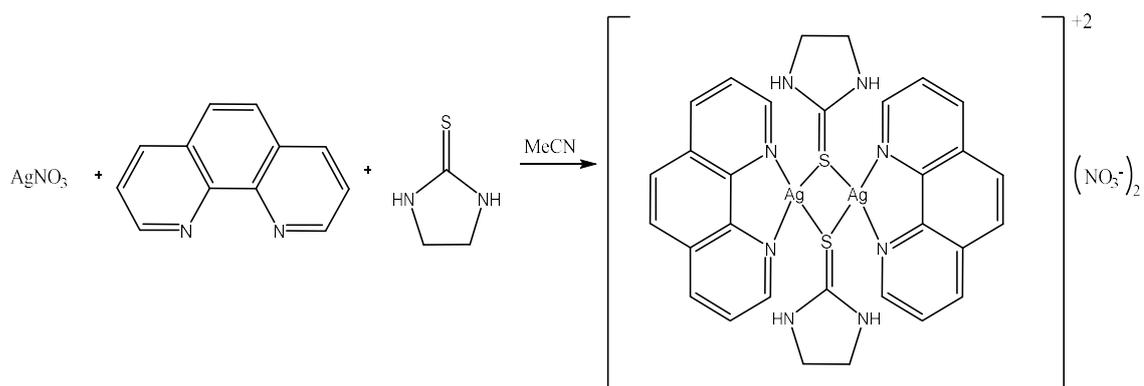
## LISTA DE ESTRUTURA DOS COMPOSTOS



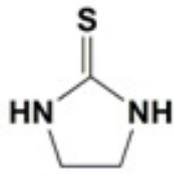
Estrutura química do composto JB3



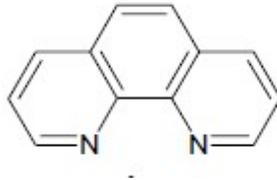
Estrutura química do composto JB4



Estrutura química do composto JB5



Grupamento 2-tionaimidazolina



Grupamento fenantrolina (phen)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
2.1	Leishmaniose.....	21
<b>2.1.1</b>	<b>Parasito: ciclo, transmissão e reservatório.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.2</b>	<b>Tratamento.....</b>	<b>26</b>
2.2	COMPOSTOS DE PRATA.....	29
2.3	POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPOSTOS NA <i>Leishmania</i>	31
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	36
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
5.1	COMPOSTOS QUÍMICOS.....	37
<b>5.1.1</b>	<b>Complexos metálicos e seus respectivos ligantes.....</b>	<b>37</b>
5.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	39
5.3	PARASITOS.....	39
5.4	ENSAIOS <i>in vitro</i> .....	40
<b>5.4.1</b>	<b>Avaliação da atividade anti-promastigota.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Avaliação da atividade anti-amastigota.....</b>	<b>40</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Avaliação da citotoxicidade.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Índice de seletividade.....</b>	<b>41</b>
<b>5.4.5</b>	<b>Análise Estatística <i>in vitro</i>.....</b>	<b>42</b>
5.5	ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA.....	42
<b>5.5.1</b>	<b>Atividade inibitória contra a isoforma r-CPB2.8 <i>L. (L.) mexicana</i>.....</b>	<b>42</b>
<b>5.5.2</b>	<b>Análise estatística enzimática.....</b>	<b>43</b>
5.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	43
5.7	ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM A MEMBRANA..	45
<b>5.7.1</b>	<b>Análise da atividade do composto pela microscopia de força atômica.....</b>	<b>45</b>
5.7.1.1	Avaliação da ação do composto nas formas promastigotas de <i>L.(L.) amazonensis</i> .....	45

5.7.1.2	Avaliação do composto nas formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	45
5.7.1.3	Captura das imagens.....	45
5.8	ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM O DNA.....	46
<b>5.8.1</b>	<b>Avaliação Molecular da Degradação do DNA pelo Composto.....</b>	<b>46</b>
5.9	ENSAIOS <i>in vivo</i> .....	46
<b>5.9.1</b>	<b>Animais de experimentação.....</b>	<b>47</b>
<b>5.9.2</b>	<b>Manutenção de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>5.9.3</b>	<b>Extração de DNA controle para confecção de curva padrão.....</b>	<b>47</b>
<b>5.9.4</b>	<b>Extração de RNA de <i>L. (L.) chagasi</i> e síntese de cDNA.....</b>	<b>48</b>
<b>5.9.5</b>	<b>Escolha do marcador molecular da PCR em tempo real <i>single</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>5.9.6</b>	<b>Quantificação da carga parasitária <i>in vivo</i> por PCR em tempo real.....</b>	<b>49</b>
<b>5.9.7</b>	<b>Análise estatística <i>in vivo</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
6.1	ENSAIOS <i>in vitro</i> .....	50
<b>6.1.1</b>	<b>Atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>6.1.2</b>	<b>Atividade leishmanicida contra formas amastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) infantum chagasi</i>.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1.3</b>	<b>Citotoxicidade.....</b>	<b>52</b>
<b>6.1.4</b>	<b>Atividade antipromastigota e antiamastigota do composto JB5SF.....</b>	<b>53</b>
6.2	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	54
6.3	ENZIMÁTICO.....	54
6.4	DOSAGEM DE NO.....	56
6.5	MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	57
6.6	AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DNA PELO COMPOSTO.....	59
6.7	<i>In vivo</i> .....	60
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>9</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por várias espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania*, que mantêm o seu ciclo de vida através de transmissão entre um inseto flebotômico e um hospedeiro mamífero (WHO, 2013; KAYE; SCOTT, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose é considerada a segunda protozoose mais importante do mundo, pois estima-se que ela provoca cerca de setenta mil mortes por ano, a qual é uma taxa superada apenas pela malária entre outras doenças parasitárias (STUART et al., 2008). De acordo com Assche 2011, a doença é endêmica em noventa e oito países de cinco continentes (África, Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul), dos quais dezesseis são países desenvolvidos, setenta e dois estão em desenvolvimento, e dez deles estão entre os menos desenvolvidos.

A leishmaniose, conhecida pelo seu amplo aspecto clínico, podendo se reunir em quatro grupos: Leishmaniose Cutânea caracterizada pela produção de lesões cutâneas limitadas, geralmente nos braços, pernas e rosto; a Leishmaniose Mucocutânea, quando aparecem lesões nas mucosas da face, como fossas nasais e palato; a Leishmaniose Cutânea Difusa, compostas de lesões nodulares no corpo todo; a Leishmaniose Visceral ou Calazar, caracterizada pelo aumento do fígado e baço, sendo esta a forma mais preocupante, podendo, se não tratada a tempo, levar a morte (BRASIL, 2014; LUQUE-ORTEGA, 2010).

A *Leishmania* é um protozoário com duas formas principais, a flagelada ou promastigota e a forma sem flagelo visível em microscópio óptico, denominada amastigota (BRASIL, 2014). A forma promastigota é encontrada no trato digestivo de hospedeiros invertebrados pertencentes à família *Psychodidae* de insetos hematófagos e a forma amastigota é observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. Além das dificuldades no controle e prevenção que a doença apresenta, devido fatores biológicos e sócio-econômicos, existe também uma diversidade de formas clínicas e além de fármacos de alto custo e grande toxicidade (SILVA-LÓPEZ, 2010).

Um dos maiores desafios para o tratamento das leishmanioses é o desenvolvimento de novos fármacos eficazes para a quimioterapia. Atualmente os medicamentos leishmanicidas incluem antimoniais pentavalentes, pentamidina e anfotericina B, descrito por Van Griensven e colaboradores (2010), porém eles causam vários efeitos colaterais, além da alta toxicidade. Portanto, a necessidade de novas fármacos para tratamento é de extrema importância no atual contexto do desenvolvimento de estratégia contra a doença. Apesar de não ser um elemento

biológico essencial, a prata metálica e seus derivados (ex.  $\text{AgNO}_3$  e complexos) têm apresentado várias aplicações medicinais como na purificação da água, tratamento de ferimentos, recobrimentos anti-infecção de instrumentos médicos, no tratamento de queimaduras pois possuem propriedades anti-microbianas potentes com baixa toxicidade em seres humanos (FARRELL, 2004; GUO; SADLER, 1999).

O mecanismo celular de ação dos íons prata ainda não é completamente entendido, sendo sua ação atribuída por interferir no crescimento da célula por três formas diferentes: inibição das funções de transporte na parede celular (respiração); interrupção do metabolismo da célula (mudança na estrutura das enzimas) e inibição da divisão celular (interação com DNA). Essa ação diversificada, que ocorre em baixas concentrações, é única para os íons de prata e tendem a reduzir o desenvolvimento de organismos resistentes (McDONNELL; RUSSELL, 1999; PERCIVAL et al., 2005).

Os complexos de prata têm tido atividade antimicrobiana e outras propriedades desejáveis podem ser manipuladas variando-se o número e o tipo de ligantes coordenados ao íon metálico, sendo essa uma das principais estratégias empregadas no planejamento de novos metalo-fármacos. A associação entre compostos de prata e ligantes diimínicos pode conduzir a formação de compostos inéditos com potencial capacidade de interagir com grupos tióis existentes nos alvos farmacológicos (ex. cisteína proteases) e, conseqüentemente, com atividade promissora frente ao protozoário do gênero *Leishmania* (SEGURA et al., 2014).

A descoberta da atividade leishmanicida de compostos orgânicos contendo prata na sua estrutura, desenvolvido inicialmente como um agente antimicrobiano, apresenta-se com baixa toxicidade, conseqüentemente poderá constituir um grande avanço na quimioterapia leishmanicida. Sendo assim, a busca por novos compostos que apresentam prata em sua estrutura com modificações nos ligantes diimínicos que tenham atividade *in vivo* podem ser atrativos ao desenvolvimento de novos fármacos com menor toxicidade e poucos efeitos colaterais aos pacientes.

Visto que o atual arsenal terapêutico utilizado para o tratamento e controle das leishmanioses é restrito e conta com muitas limitações, o presente estudo foi planejado para avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura. A detecção e quantificação da carga parasitária de hamsters com *L.(L.) infantum chagasi* e tratados com os compostos em estudo foi realizado utilizando técnicas moleculares.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

A seguir será descrito a Leishmaniose, ciclo biológico da doença, transmissão, reservatório, tratamento e detalhadamente sobre os compostos de prata e seus possíveis mecanismos de ação na *Leishmania*.

### 2.1 LEISHMANIOSE

O termo Leishmaniose determina um conjunto de doenças em sua maioria zoonóticas, amplamente distribuídas em todo o mundo, caracterizadas pela infecção intracelular do protozoário flagelado do gênero *Leishmania* e transmitidas pela picada do vetor flebotomíneo, como descrito por Hotez e colaboradores (2007), pertencente a família *Phlebotomidae*, gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (OSTAD et al., 2016). A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial de Saúde como a segunda protozoose mais importante, sendo indicada como uma das doenças mais preocupantes para a saúde pública mundial. No Brasil, as doenças tropicais negligenciadas (DTNs) com alto nível de prevalência e ocorrência são malária, doença de Chagas, leishmanioses, esquistossomose, dengue e filariose linfática (LINDOSO; LINDOSO, 2009).

Mais de um bilhão de pessoas no mundo tem uma ou mais DTNs, causando aproximadamente 534 mil mortes anualmente. Estima-se que a incidência global de tais doenças possa subvalorizar a importância das DTNs para a saúde pública, particularmente em áreas onde há coinfeção com HIV e malária (KAPPAGODA; IOANNIDIS, 2012). Dentre as DTNs destaca-se a leishmaniose, a qual estima-se que seja responsável por cerca de doze milhões de pessoas infectadas em 98 países, sendo o Brasil ao lado de Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão os mais afetados. Cerca de 90% dos casos de leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral (LV) na América Latina ocorrem no Brasil (SOUZA, 2010). A incidência anual é de 1,5 a 2,0 milhões de casos, e 350 milhões de pessoas sob o risco de infecção (ANTINARELLI; SCIO; COIMBRA, 2015; WHO, 2013).

De uma maneira geral, as leishmanioses consistem em um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica (BRASIL, 2007). A leishmaniose pode se apresentar na forma tegumentar (classicamente dividida em cutânea, cutânea difusa e mucocutânea) ou na forma visceral e vem sendo reconhecida como doença oportunista associada a AIDS, o que favorece manifestações clínicas graves e falência terapêutica. Estas

manifestações podem variar de simples lesões cutâneas de autorresolução à doenças visceral fatal (CROFT, OLLIARO, 2011).

Clinicamente a forma cutânea se caracteriza por lesões únicas ou múltiplas na pele, onde algumas formas cutâneas podem levar a grandes deformações (SOUZA, 2010). Enquanto que, a forma cutânea difusa se caracteriza por lesões nodulares persistentes; e a forma mucocutânea afeta de maneira preponderante as mucosas da face, como fossas nasais e o palato. Por outro lado, a forma visceral se caracteriza pelo aumento no volume do fígado e baço, com anemia, perda de peso e febre, e que, se não tratada a tempo, pode ser fatal, segundo Hepburn (2000), além de dor de cabeça, calafrios, sudorese, tosse, diarreia, tonturas, vômitos, sangramento das gengivas, dores nos membros, perda de peso, anemia com leucopenia e linfadenopatia (McGWIRE et al., 2013; KHADEM; UZONNA, 2014).

Em relação às formas cutâneas, o Brasil possui alta prevalência sendo as espécies *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis* são as principais causadoras, afetando quase 30 mil pessoas anualmente (BRASIL, 2007).

A LV representa um importante problema de saúde pública em diferentes partes do mundo, exigindo que se coloque em prática medidas para controlar a propagação da doença (COLOMBO et al., 2015). Foram registrados mais de 34 mil casos de LV, no Brasil, entre o ano de 2003 a 2009. Na maioria dos casos, em 2009, foi registrada na região Nordeste (47,5%), seguido pela Norte (19,2%), Sudeste (17,4%), Centro Oeste (7,4%) e Sul (0,2%). Aumento progressivo foi registrado em 21 Estados, atingindo as cinco regiões do país (BRASIL, 2011; EVANS et al., 1992; MONTEIRO, 2002). Dados recentes mostram que a maioria dos infectados é do sexo masculino (63,9%) e crianças menores de 10 anos, apresentando índice de 48,9% (BRASIL, 2011). A incidência mundial de LV é estimada como sendo de 400.000 a 600.000 novos casos por ano (STUART et al., 2008; WHO, 2013). No Brasil, a infecção é causada por *L. (L.) infantum chagasi* (FREITAS et al., 2015).

A LV era considerada uma zoonose de caráter eminentemente rural. Mais recentemente, vem se expandindo para áreas urbanas o que se tornou crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano, sendo uma endemia em franca expansão geográfica (BRASIL, 2014).

A doença apresenta dificuldades no controle e na prevenção devido à diversidade biológica dos parasitos; à epidemiologia ser extremamente diversa, com 20 espécies de parasitas protozoários do gênero *Leishmania* conhecidas por serem patogênicas para humanos, segundo Group (2004), à existência de muitas espécies de vetores e de mamíferos

que podem atuar como fontes de infecção; aos fatores sócio-econômicos das populações afetadas; às diferentes formas clínicas da doença; medicamentos de alto custo e com grande toxicidade para o hospedeiro e, ainda, à inexistência de uma vacina eficaz (SILVA-LÓPEZ, 2010). Existem duas principais entidades epidemiológicas: (1) zoonótica, que inclui reservatórios animais hospedeiros no ciclo de transmissão e (2) antropótica, em que o homem é a única fonte de infecção para o vetor. Os seres humanos e os cães podem assim representar não somente a população afetada preliminar em muitas áreas, mas podem também ser o reservatório principal para parasitas de *Leishmania* (ESPARTA et al., 2000).

Formas zoonóticas da doença são influenciadas pelas atividades humanas, principalmente, a migração das zonas rurais para as zonas urbanas, desmatamento, mudanças ambientais e mudanças na ecologia de vetores e reservatórios. No Brasil, na Colômbia e na Venezuela, a migração e desmatamento têm contribuído em grande medida para o aumento da LV ( AAGAARD-HANSEN; NOMBELA; ALVAR, 2010; WHO, 2002). Outra tendência importante verificada na leishmaniose é a urbanização da infecção, com um número crescente de casos notificados de áreas peri-urbanas e urbanas de São Paulo (COLOMBO et al., 2015; RANGEL et al., 2013). Além disso, a imunossupressão e desnutrição implicam na maior suscetibilidade do hospedeiro (SOUZA, 2010).

### **2.1.1 Parasito: ciclo, transmissão e reservatório**

O protozoário *Leishmania* apresenta-se duas formas principais em seu ciclo de vida, a forma flagelada ou promastigota e a forma sem flagelo visível por microscopia óptica denominada amastigota (BRASIL, 2014), as quais são apresentadas na Figura 1. A forma extracelular promastigota se desenvolve no tubo digestivo de flebotomíneos, que são hospedeiros invertebrados pertencentes à família *Psychodidae* de insetos hematófagos, ou em meio de cultura. A forma amastigota é intracelular em tecidos no hospedeiro vertebrado, invadindo especialmente a pele e o sistema fagocítico mononuclear de vísceras como o baço, fígado, medula óssea e órgãos linfoides, ou seja, reside e multiplica-se dentro de vacúolos fagolisossomais de fagócitos de mamíferos (MOUGNEAU; BIHL; GLAICHENHAUS, 2011).

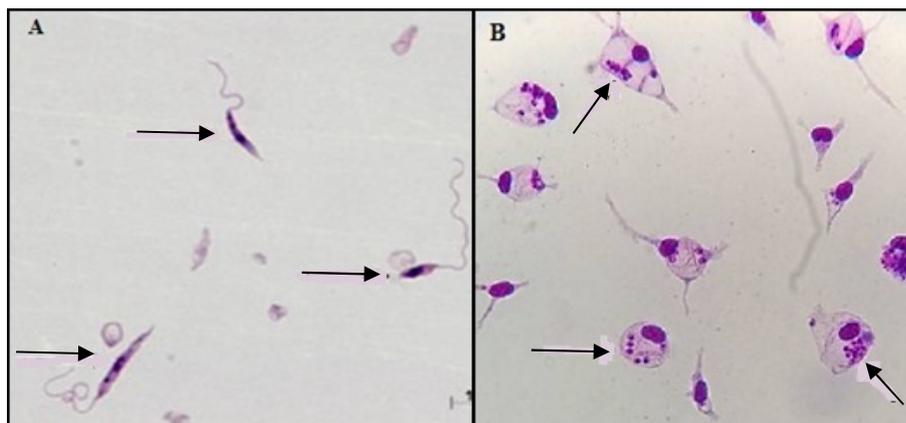


Figura 1- Principais formas evolutivas de *Leishmania*.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Formas promastigotas em meio de cultura, aumento de 100X (A) e formas amastigotas intracelulares, presente dentro dos macrófagos e coradas com Giemsa, aumento de 40X (B).

A infecção em hospedeiros vertebrados é iniciada e transmitida através do repasto sanguíneo realizado pelas fêmeas de flebotomíneos infectados com as formas promastigotas metacíclicas, de modo que apenas as fêmeas estão adaptadas com o respectivo aparelho bucal para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue, e estas necessitam de sangue para o desenvolvimento dos ovos. Além disso, algumas espécies costumam picar a partir do pôr do sol até a madrugada (GONTIJO; GONTIJO, 2011). Durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, ocorre a inoculação da saliva, que irá modular a resposta imune local, bem como das formas promastigotas na pele do hospedeiro, que serão fagocitadas inicialmente por neutrófilos. Estas células serão capazes de eliminar grande parte dos parasitos por uma série de mecanismos leishmanicidas, contudo alguns parasitos são adaptados a tais mecanismos segundo Paul e colaboradores (2014), levando a persistência parasitária no interior das células hospedeiras finais, os macrófagos (MUKHERJEE et al., 2015).

Quando estas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos, macrófagos ou células dendríticas, elas se diferenciam rapidamente em formas amastigotas, com formato arredondado e o flagelo se torna restrito à bolsa flagelar. Além disso, uma série de alterações fisiológicas ocorre para que os parasitos possam se adaptar ao novo microambiente fagolisossomal (NADERER; McCONVILLE, 2008). Quando os parasitos são fagocitados pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) pode ocorrer sua eliminação ou sobrevivência e multiplicação com posterior disseminação para os órgãos linfoides regionais, onde será iniciada a resposta adaptativa. Dependendo desta resposta, o hospedeiro vertebrado pode apresentar resistência à infecção ou suscetibilidade, e nos suscetíveis o curso clínico da

doença progredirá culminando no desenvolvimento da leishmaniose visceral ou cutânea. Quando o parasito se estabelece no hospedeiro vertebrado, e um inseto vetor saudável realizar o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, o flebotomíneo poderá se infectar com *Leishmania* reiniciando ciclo biológico (JESUS, 2015), representado pela Figura 2.

Uma vez que os parasitas invadem os macrófagos, segundo Engwerda e colaboradores (2004), que constituem uma parte importante dos mecanismos de defesa imune do hospedeiro, os pacientes com LV são invariavelmente imunológicos suprimidos e, portanto, podem ser vítimas de infecções oportunistas secundárias (TOQEER et al., 2012). O surgimento de complicações heterogêneas associados com imunossupressão incluindo transplante, reumatologia, hematoma e distúrbios oncológicos contribuem para imunopatologia da LV (KHADEM; UZONNA, 2014; VAN et al., 2014).

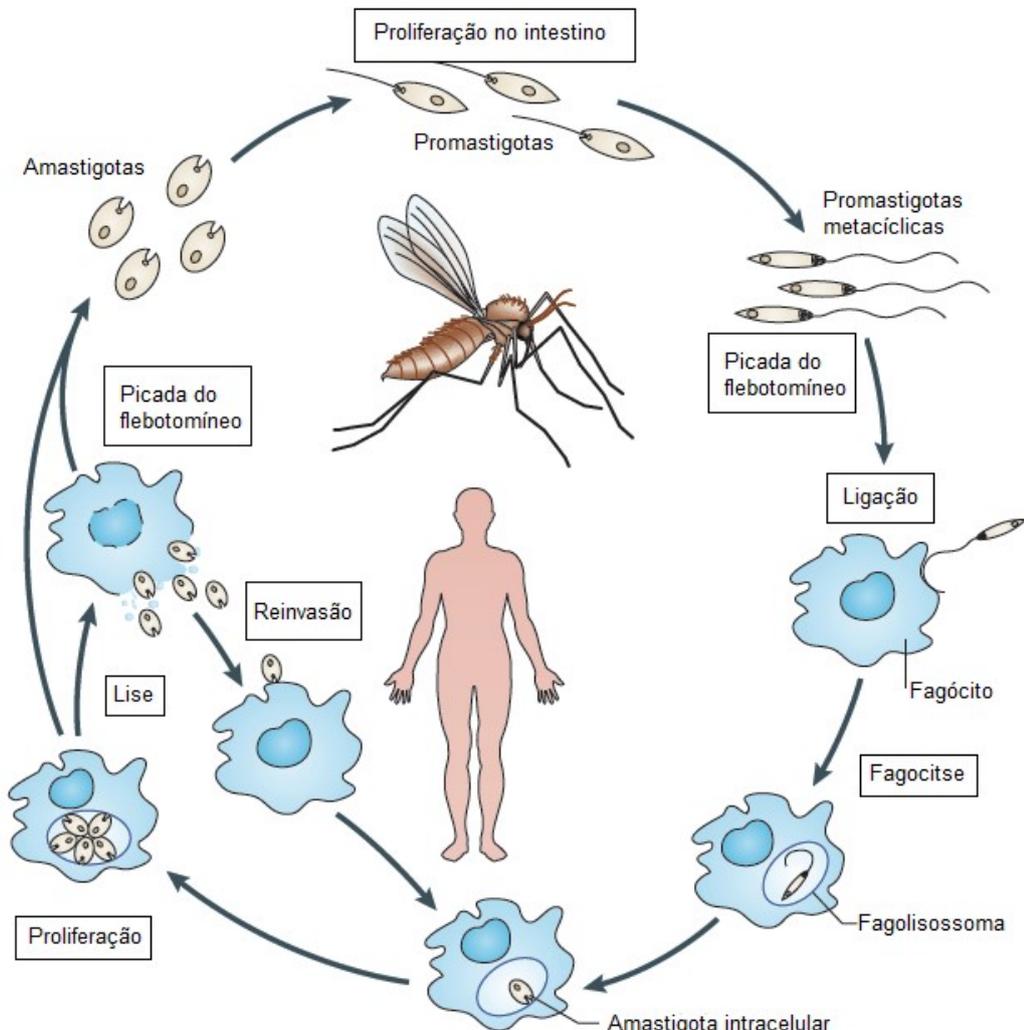


Figura 2- Ciclo de vida dos parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania*.  
Fonte: Adaptado de KAYE; SCOOT, 2011.

Os reservatórios naturais são necessários à manutenção da Leishmaniose nos ambientes rural e urbano. Com isso, o cão doméstico (*Canis familiaris*) é considerado o principal reservatório urbano de *Leishmania* spp, pois apresenta intenso parasitismo cutâneo, estreito contato com o homem e principalmente pode servir de fonte de alimento (CAMARGO – NEVES, et al., 2006). Outros reservatórios como as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) contribuem para a permanência da LV no meio silvestre, como descrito pelo Manual de Vigilância (2006), sendo o último grupo um elo entre o ambiente silvestre e domiciliar (DIAS et al., 2003).

As altas prevalências de infecção em reservatórios caninos foram relatadas em áreas de ocupação recente, caracterizadas por habitações com condições sanitárias precárias e adjacentes à floresta, onde há geralmente uma abundância de vetores e reservatórios que podem contribuir para a manutenção e disseminação da LV. A pele de cães infectados é um reservatório de parasitos, sendo que cães assintomáticos podem apresentar formas amastigotas na pele, o que pode representar um importante papel na transmissão para os flebotomíneos e conseqüentemente foco para outros cães e humanos (BARBOSA et al., 2014).

### 2.1.2 Tratamento

A Organização Mundial de Saúde e o Ministério de Saúde do Brasil recomendam os antimoniais pentavalente, Pentostan e Glucantime, como fármacos de primeira escolha contra todas as formas de leishmaniose. Entre os fármacos considerados de segunda escolha estão anfotericina B, pentamidina e miltefosina (BOER et al., 2011).

A variabilidade da eficácia dos fármacos para o tratamento da leishmaniose está relacionada às diferenças na sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos fármacos existentes, às diferentes manifestações clínicas, ao estado imunológico do paciente e às propriedades farmacocinéticas dos fármacos (FIDALGO, GILLE, 2011).

No começo do século XX, os agentes quimioterápicos usados era a base de antimoniais trivalentes, que foi substituído posteriormente pelos antimoniais pentavalentes, devido sua menor toxicidade. Estes fármacos são usados desde a década de 40, porém possuem baixa absorção oral, sendo administrado via intramuscular ou intravenoso, além de sua toxicidade, persistência dos efeitos colaterais e duração do tratamento, os quais são outras dificuldades encontradas no tratamento (WHO, 2010). Outro grande problema na quimioterapia com antimonial é o surgimento de resistência clínica aos antimoniais

pentavalentes (DA LUZ et al., 2015). Segundo Almeida (2012), o antimonial pentavalente atualmente em uso é o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®, Aventis). Estes fármacos, além de limitações já mencionadas, ainda apresentam custo elevado e necessidade de internação para sua administração parenteral diária (ANTINARELLI; SCIO; COIMBRA, 2015; SINGH; SUNDAR, 2012).

O mecanismo de ação dos antimoniais não é muito claro. Estudos acreditam que este atue como pró-fármaco e utilize os tióis da superfície do parasita e da célula hospedeira, sendo reduzido à forma trivalente dentro do macrófago e agindo assim sobre as formas amastigotas do parasita (SINGH, 2006). Fatores como a diminuição da absorção do fármaco devido ao aumento do mecanismo de efluxo, redução da concentração no parasita, inibição da ativação do fármaco e amplificação gênica são alguns dos principais mecanismos responsáveis pelo desenvolvimento da resistência neste grupo. O metabolismo de tiol também desempenha um papel importante no desenvolvimento da resistência. A molécula de tiol protege contra o estresse oxidativo dentro do macrófago, assim como a tripanotona atua como o principal tiol da *Leishmania*. Portanto, há relatos que os antimoniais interfiram no metabolismo de tióis através da inibição de TryR. No entanto, o seu papel no campo isolados ainda não está claro (HALDAR et al., 2011).

Baseando-se nos diversos efeitos colaterais dos antimoniais citados verifica-se a necessidade de novos tratamentos alternativos, como descrito por Sundar e colaboradores (2001), os quais são necessários para os programas de controle. Nos últimos 10 anos, um progresso significativo tem sido feito com a aprovação de formulações lipídicas de anfotericina B e miltefosina (DEN BOER et al., 2011).

A anfotericina B (AmpB) é um agente antifúngico poliênico extraído da bactéria filamentosa *Streptomyces nodosus*. É utilizada como fármaco de segunda linha em pacientes com leishmaniose e está disponível em duas formas, AmpB simples e AmpB lipossomal. Esta última é melhor tolerada e menos tóxica (SUNDAR et al, 2000). O mecanismo de ação da AmpB é multifacetado, uma vez que apresenta alta afinidade pelo ergosterol e forma poros na membrana do parasito causando vazamento de conteúdo celular seguido de morte celular. Também ajuda na geração de radicais livres de oxigênio reativo. Estes radicais subsequentemente causam danos à célula levando à morte celular. Embora, a AmpB tenha sido provado como um agente quimioterapêutico bem sucedido nos pacientes com leishmaniose, existem poucos relatos indicando sua resistência (PURKAIT et al., 2012). Observaram também neste mesmo estudo, que os esteróis na parede celular das formas

amastigotas das estirpes resistentes foram substituídos por um precursor devido à transmetilação defeituosa. Esta alteração na composição da membrana conduz à diminuição da ligação reduzida de AmpB para a célula. O efeito cumulativo de todos os mecanismos conduz à diminuição da concentração de AmpB dentro da célula conferindo a sua resistência.

Mais recentemente, o fármaco miltefosina foi apresentado como o primeiro e ainda a única opção terapêutica oral para o tratamento da LV na Índia (DORLO et al., 2012; SUNDAR et al., 2002). Miltefosina é uma droga originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer, sendo aprovada em 2005 para o tratamento da leishmaniose cutânea em adultos e crianças na Colômbia (FERNÁNDEZ et al., 2014). Tendo em contra-indicações ou que não respondem aos medicamentos antimoniais, a miltefosina demonstrou eficácia comparável ao antimônio pentavalente contra a infecção causada por *Leishmania (V.) panamensis* na Colômbia, segundo Soto e colaboradores (2004) e Velez e colaboradores (2010), *Leishmania (V.) guyanensis*, segundo Chusciak-Talhari e colaboradores (2011) e *Leishmania (V.) braziliensis*, no Brasil, segundo Machado e colaboradores (2010) e na Bolívia (SOTO et al., 2008). O mecanismo de ação deste fármaco não está claro, mas segundo Maltezou (2010), o fármaco se liga à membrana celular, se mantém internalizado com a ajuda de duas proteínas de membrana e destrói o metabolismo de alquil-lípido do parasita e causa a morte celular. No entanto, devido à transmissão antropótica no subcontinente indiano, o uso indevido deste fármaco e sua meia-vida mais longa são os dois fatores de alarme na obtenção de resistência rápida a este fármaco. Além disso, recentemente há relatos de casos resistentes à miltefosina do Nepal (PANDEY et al., 2012).

A disponibilidade gratuita de fármacos anti-*Leishmania* na Índia aumenta as chances de uso indevido e assim, aumenta a emergência da resistência aos fármacos (CROFT et al., 2006). A utilização irregular e incompleta de fármacos leva à tolerância progressiva e contribui significativamente para o desenvolvimento da resistência aos medicamentos. O custo do tratamento é também um dos principais fatores que contribuem para o desenvolvimento da resistência, uma vez que a maioria dos pacientes são incapazes de completar o curso completo da terapêutica, levando ao desenvolvimento de resistência.

O aumento da incidência de co-infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), migração humana e reassentamento (especialmente áreas onde a leishmaniose é zoonótica) nos últimos anos pode provocar o ressurgimento do número de casos. Uma vez que não existe uma vacina eficaz disponível, o controle da leishmaniose depende principalmente da quimioterapia (SUNDAR et al., 2002).

Tendo em foco os problemas ressaltados, existem dificuldades que ainda devem ser consideradas para o desenvolvimento de novos fármacos, por exemplo a localização do parasito em fagolisossomas de macrófagos, sendo assim as novas moléculas devem ter baixa toxicidade. Além disso, novas estratégias como a escolha dos alvos e novas vias de administração, devem ser consideradas (ALMEIDA, 2012).

Recentemente, vários produtos naturais com atividade leishmanicida foram relatados, incluindo naftoquinonas, lignanas, neolignanas, alcalóides, flavonóides, e terpenóides (FOURNET et al., 2002; INACIO et al., 2013), mas nenhum chegou a uso clínico. Nota-se uma carência de investimento financeiro para investigação e pesquisa de fármacos para o tratamento da leishmaniose. Os fármacos utilizados apresentam diversos problemas, incluindo: tratamentos prolongados, elevada toxicidade, baixa eficácia, limitada disponibilidade de diagnóstico e resistência parasitária. Estima-se que 50% dos pacientes não têm acesso adequado a diagnóstico e tratamento. Tais fatos ressaltam a necessidade de desenvolvimento de terapias inovadoras e alternativas para o controle e terapêutica da leishmaniose (NAGILL et al., 2012).

## 2.2 COMPOSTOS DE PRATA

A essência da Química Inorgânica Medicinal envolve a introdução acidental ou intencional de um íon metálico em um sistema biológico. A introdução acidental visa à busca de métodos de quelar o metal para retirá-lo do sistema biológico com o intuito de evitar os efeitos de um excesso de metal essencial ou de um envenenamento por um excesso de metal tóxico. Já a introdução intencional de um metal em um sistema biológico visa fins terapêuticos ou de diagnóstico (SEGURA et al., 2014).

A utilização da prata como agente antimicrobiano nos remete ao início da história humana, sendo muito utilizado na preservação de água potável durante anos, recurso primordial em conflitos militares (ALEXANDER, 2009; SEGURA et al., 2014), e também como agente antimicrobiano em curativos e em cuidados preventivos, como no tratamento de úlceras crônicas, queimaduras e ferimentos (KLASEN, 2000). Os íons de prata ( $\text{Ag}^+$ ) são normalmente o componente ativo da ação antimicrobiana, sendo muito eficaz contra bactérias gram positivas e gram negativas, descrito por Jung e colaboradores (2008), além de possuir ação antiproliferativa contra fungos e vírus (THURMANN; GERBA, 1989; RUSSEL; HUGO, 1994).

O nitrato de prata tem sido utilizado para prevenção neonatal, como agente cáustico, anti-séptico e adstringente, ainda no tratamento de feridas pós-cirúrgicas e supurantes (KLASEN et al., 2000). Seu poder germicida deve-se à combinação do íon prata, grupamentos sulfidríla, amido, fosfato e carboxila no nível de proteínas do micro-organismo, resultando em desnaturação que é a base dos efeitos adstringentes e cáusticos. Tais ações causam a ruptura da membrana da célula microbiana e consequente morte do micro-organismo (PAGLIUCA et al., 1997).

A sulfadiazina de prata, introduzido no final dos anos 1960, é usada clinicamente como agente antimicrobiano e antifúngico, descrito por Guo e Sadler (1999) e ainda é utilizada no tratamento mais eficaz de queimaduras (SEGURA et al., 2014). A prata é conhecida por impor efeitos múltiplos nas bactérias como, por exemplo, ao reagir com os grupos tióis nas proteínas, ao interagir com DNA e a parede celular, e interferir nos processos de transporte de elétrons (RUSSELL; HUGO, 1994). Particularmente, os complexos de prata despertam interesse uma vez que a atividade antimicrobiana e outras propriedades desejáveis podem ser manipuladas variando-se o número e o tipo de ligantes coordenados ao íon metálico, sendo essa uma das principais estratégias empregadas no planejamento de novos metalo-fármacos (SEGURA et al., 2014). Além disso, se os ligantes apresentam-se as atividades antimicrobianas, estas propriedades biológicas podem ser reforçadas com a coordenação do centro do metal (RONCONI, 2007). Entre os ligantes adequados para proporcionar novos compostos ativos que contém prata, os complexos de fenantrolina (phen) e seus derivados representam uma boa escolha, pois possuem a capacidade de atuar sobre uma grande variedade de funções biológicas (McCANN et al., 2000). Em particular, complexos de prata que incorporam este ligante quelante foram encontrados para ser extremamente ativos *in vitro* contra diversos patógenos, como por exemplo *Leishmania* (SEGURA et al., 2014). Complexos de prata do tipo  $[Ag(L)_2]NO_3^-$  (L = ligandos polipiridilpaládio) também demonstraram ser biologicamente ativos contra *Leishmania mexicana*, através da interação com DNA (NAVARRO et al., 2006). Estudos mostram que a prata e os complexos levam a uma redução da quantidade de ergosterol na membrana da célula e a um posterior aumento na sua permeabilidade (COYLE, 2004; SEGURA et al., 2014).

A prata exhibe uma baixa toxicidade em humanos, sendo considerado mínimo o risco de intoxicação por inalação, ingestão, absorção pela pele e ferimentos ou mesmo por aplicação intravenosa. Este metal é absorvido no corpo humano, entra no sistema circulatório

complexado com proteínas, sendo eliminada principalmente pelos rins e pelo fígado (LANSDOWN, 2006; HADRUP, LAM, 2014; SEGURA et al., 2014).

### 2.3 POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO DE COMPOSTOS DE PRATA NA *Leishmania*

O mecanismo de ação da prata está relacionado com sua interação com compostos que contém grupos sulfurados presentes em enzimas responsáveis pela respiração celular (SEGURA, 2014). A prata se liga à parede celular e às membranas celulares inibindo o processo de respiração. Indo além de suas características antimicrobianas, os complexos de prata podem interagir diretamente com o DNA, possuindo atividade citotóxica para mais de uma linhagem de células cancerígenas e baixa toxicidade para células normais (BARREIRO et al., 2014; YILMAZ et al., 2014).

O fenômeno de amplificação gênica é um mecanismo de auto-preservação celular observado com frequência no parasito *Leishmania* quando submetido a estímulos negativos como, por exemplo, na presença de fármacos ou compostos ativos (CROFT et al., 2006). As alterações na permeabilidade da membrana, inativação ou sequestro do fármaco pelo metabolismo tem sido relatado como os mecanismos utilizados pela *Leishmania* para sobreviver quando em contato com compostos leishmanicidas. De acordo com a literatura, o aumento do número de cópias do gene não só aumenta diretamente o nível de expressão, mas também aumenta a probabilidade de aparecerem mutações pontuais, o que pode conferir vantagem para o parasito quando em contato com fármacos leishmanicidas (CROFT et al., 2006).

A perpetuação de parasitos dentro de seus hospedeiros está intrinsecamente relacionadas à produção de moléculas, que ativam mecanismos de sobrevivência. Portanto, tais moléculas podem ser os potenciais alvos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças parasitárias (MICHELS; AVILÁN, 2011). Dentre as várias moléculas há as proteases, as quais são essenciais no ciclo de vida e patogenia dos agentes causadores de leishmanioses e doença de Chagas, por exemplo (GAZANION, 2011; SADIJ; McKERROW, 2002).

Proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de ligações peptídicas, resultando na liberação de peptídeos de tamanhos variáveis ou aminoácidos livres. Os substratos das proteases ligam-se em um sulco ou fenda, onde a hidrólise da ligação peptídica ocorre (SANTOS, 2011). Cisteína proteases (CPs) são visivelmente presentes em protozoários do

gênero *Leishmania* (ALVAREZ et al., 2012). Além disso, a viabilidade de parasitas pode ser reduzida por inibidores de CPs (SELZER et al., 1999; ALMEIDA et al., 2012). Estas são também encontradas em plantas, como a papaína, que é uma CPs isolada a partir de *Carica papaya* (RAWLINGS et al., 2006; UYGUN et al., 2012).

Alguns exemplos de CPs são a papaína, a cruzaina, as catepsinas e as calpains. As principais funções fisiológicas destas enzimas estão relacionadas ao metabolismo de proteínas, estando notoriamente presentes em protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Portanto, as cisteíno proteases podem ser exploradas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos (ASSIS, 2012).

A maior parte das pesquisas que envolvem estudos em CPs do protozoário *Leishmania* englobam algumas enzimas, denominadas CPA, CPB e CPC, todas as quais são similares à papaína e pertencem ao mesmo grupo de CPs (PEREIRA, 2011). As CPs designadas CPA e CPB são ambas catepsinas tipo L, enquanto que CPC é uma catepsina tipo B (GONTIJO, 2011). A CPA é codificada por um gene cópia única e tem sido descrita em *L. (L.) major*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) infantum chagasi*. A CPC é citada em *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major*, *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum chagasi*, a qual é também codificada por um gene cópia única. Já a CPB, a qual é codificada por genes que ocorrem em multicópias e arranjo em *tandem*, é descrita em *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*. Além disso, uma extensão C-terminal não usual de 100 aminoácidos, que é frequentemente glicosilada, é uma característica da CPB que pode distingui-la da demais CPs na superfamília papaína (REBELLO, 2009). Espécies de *Leishmania* expressam altos níveis de CPs que são encontrados em grandes quantidades em organelas lisossômicas (McKERROW ET AL., 2006).

A cisteína protease melhor caracterizado em *Trypanosoma cruzi* é cruzaina, que está envolvida na replicação e diferenciação intracelular, e é essencial em todas as fases do ciclo de vida do parasita, sendo particularmente importante em diversas funções da forma amastigota presente nos mamíferos constituindo assim novos alvos terapêuticos a fim de se contornar os problemas encontrados com os antimoniais pentavalentes, segundo Assis e colaboradores (2012), drogas utilizadas no tratamento da doença, que entre outras coisas apresentam alto custo, elevada toxicidade e eficácia nem sempre completa. Estas enzimas existem como múltiplas isoformas, as quais podemos destacar a rCPB2.8, rCPB3.0 e rH84Y (DIAS et al, 2009).

As CPs têm sido identificadas em diferentes espécies de *Leishmania*, e por isso acredita-se que seja crucial para a sobrevivência e infectividade do parasita no hospedeiro humano (SILVA et al., 2015). Estas enzimas estão envolvidas na invasão bem sucedida de macrófagos por promastigotas, subsequente transformação das formas parasitárias, e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (JULIANO et al., 2000). Estas enzimas estão envolvidas em diversos mecanismos de adaptação para a sobrevivência do parasito no hospedeiro, incluindo a modulação do sistema imune do hospedeiro, invasão e destruição de tecidos, disseminação do parasito e aquisição de nutrientes essenciais que assegurem a sobrevivência e proliferação para manter a infecção (APARICIO, 2004). Devido à importância de cisteína proteases no ciclo de vida de sobrevivência e de *Leishmania*, que têm sido os alvos para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas (CRAFFRER et al., 2000).

No começo do século XX, estudos mostraram que o óxido nítrico (NO) produzido por macrófagos é um dos principais mediadores responsáveis pela atividade citotóxica contra vírus, bactérias, fungos, protozoários, helmintos e células tumorais (MACMICKING et al., 1997). O NO não é apenas citotóxico, mas pode também atuar como mensageiro intercelular. Por ser uma molécula pequena e neutra, este pode facilmente atravessar membranas, agindo como destruidor celular ou como mensageiro intercelular. A sua alta reatividade contribui para sua labilidade sendo seus efeitos restritos ao local de sua liberação, além disso são rapidamente neutralizados, principalmente pelo oxigênio, cuja reação dá origem a dois produtos não-reativos: nitrito e nitrato (SIQUEIRA, 2000).

A produção de NO é um importante parâmetro que nos permite avaliar se os compostos auxiliam para desencadear uma resposta imune com perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatório mais acentuado (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004).

### 3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose são uma das doenças mais negligenciadas do mundo. De acordo com dados estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, cerca de 350 milhões pessoas estão em áreas onde há risco de contrair leishmaniose. Estima-se cerca de 12 milhões de humanos infectados, com uma incidência anual de 0,5 milhões de casos da forma visceral da doença e este número vem crescendo devido à migração humana e de animais domésticos contribuindo para a dispersão da infecção em áreas não endêmicas ou de baixa endemicidade (AAGAARD-HANSEN et al., 2010; STUART et al., 2008; WHO, 2011).

Mesmo que a quimioterapia seja atualmente a única forma de tratar as diferentes formas de leishmaniose, uma vez que nenhuma vacina ainda esta disponível, o arsenal de medicamentos contra a doença ainda é limitado (CALOGEROPOULOU et al., 2008). Os antimoniais, que foram utilizados pela primeira vez em 1913 na forma trivalente e em 1940 na forma pentavalente, necessitam de alternativas devido à toxicidade e efeitos colaterais.

Os antimoniais pentavalentes, como o Glucantime, foram introduzidos como quimioterápicos na década de 40, sendo atualmente o principal fármaco utilizado no tratamento das leishmanioses. Porém sua toxicidade, efeitos colaterais, a duração do tratamento e a resistência ao fármaco são as principais dificuldades enfrentadas pelo paciente (WHO, 2007; MOORE e LOCKWOOD, 2010). Com isso, a busca de novos fármacos é necessária para o tratamento das leishmanioses, que sejam mais eficazes e que apresentem menos efeitos colaterais.

Novos fármacos leishmanicidas com menor toxicidade e efeitos adversos estão sendo desenvolvidas, mas ainda não há estudos suficientes para determinar a dose adequada. Por esta razão existe uma necessidade de implementar novos métodos de controle e tratamento da doença especialmente a descoberta de novos fármacos que sejam seguros, mais efetivas e com custo acessível para que sejam largamente usados (AMATO et al., 2007).

Diante dos problemas citados anteriormente e impulsionados pela descoberta da atividade leishmanicida de compostos orgânicos contendo prata na sua estrutura e sua baixa toxicidade segundo Navarro e colaboradores (2006), os complexos de prata podem constituir um grande avanço na quimioterapia leishmanicida.

Sendo assim, este trabalho teve como proposta contribuir para o maior conhecimento de compostos orgânicos que contém prata em sua estrutura em atividades leishmanicidas,

inibição enzimática, interação com DNA e com a membrana, os quais são possíveis métodos no qual sua ação atribui-se com o uso de métodos de análise *in vitro* e *in vivo*.

## 4 OBJETIVO

Abaixo serão descritos os objetivos gerais e específicos.

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo avaliar a atividade antiparasitária de novos compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura no contexto *in vitro* e *in vivo* em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* dos compostos derivados de complexo de prata, através dos testes: avaliação da atividade anti-promastigota, avaliação da citotoxicidade e avaliação da atividade anti-amastigota;

b) Avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* de dois compostos, em *L. (L.) infantum chagasi*, com maior estabilidade e menor toxicidade;

c) Analisar a atividade inibitória da cisteíno-protease B (CPB) de *L. (L.) mexicana*, calculando IC<sub>50</sub>;

d) Quantificar os níveis de óxido nítrico produzidos em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* e em contato com o composto testado;

e) Analisar a ação do composto na membrana de *L.(L.) amazonensis*, por microscopia de força atômica;

f) Realizar a avaliação molecular da degradação do DNA do parasito pelo composto.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo serão descritos todos os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho.

### 5.1 COMPOSTOS QUÍMICOS

A seguir será descrito sobre os complexos metálicos e seus respectivos ligantes utilizados na síntese dos compostos.

#### 5.1.1 Complexos metálicos e seus respectivos ligantes

Os compostos testados nesse projeto foram compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura, caracterizados pelas siglas: JB3, JB4, JB5, JB5SF e JB6. Estes foram sintetizados pela aluna Jéssica B. no Departamento de Química Geral e Inorgânica do Instituto de Química de Araraquara - UNESP e cedidos para a realização dos testes. Todos estes compostos apresentam o grupamento fenantrolina (phen) em sua estrutura, apresentada pela Figura 6, e o grupamento 2-tionaimidazolina, representado na figura 7, em conjunto com a prata (Ag), onde apenas os contra íons das moléculas se modificam, diferenciando assim os compostos. Três compostos não seguem essa “regra”, os quais compreendem o 2-tionaimidazolina e a fenantrolina, e o composto JB5SF, o qual apresenta o grupamento 2-tionaimidazolina, porém não apresenta o grupamento fenantrolina. As estruturas dos compostos estão representadas abaixo, com exceção dos compostos JB5SF e JB6 que estão em processo de caracterização (Figuras 3-7).

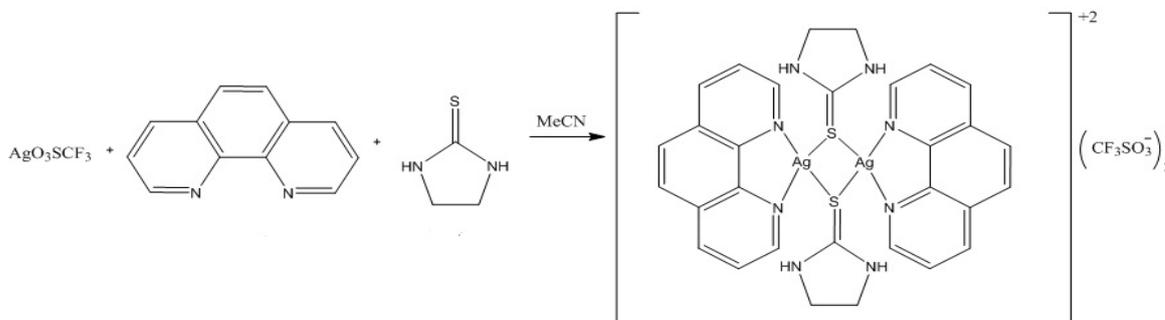


Figura 3- Estrutura química do composto JB3.

Fonte: Elaborado pela autora.

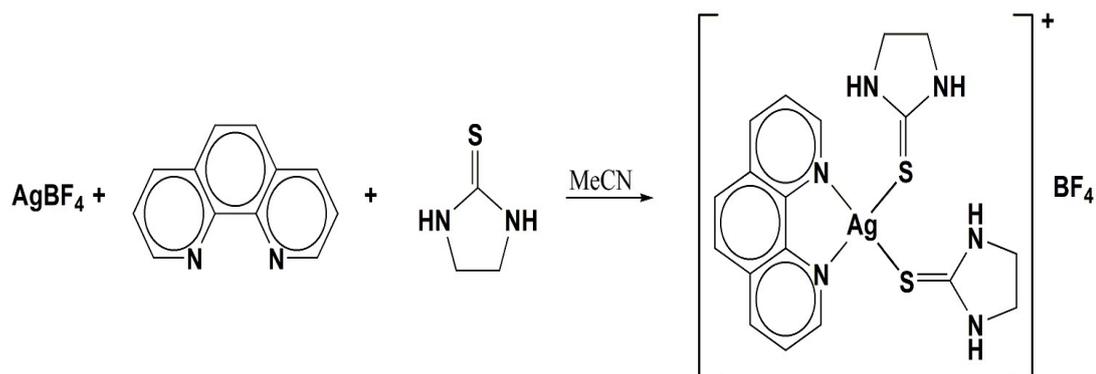


Figura 4- Estrutura química do composto JB4  
Fonte: Elaborado pela autora.

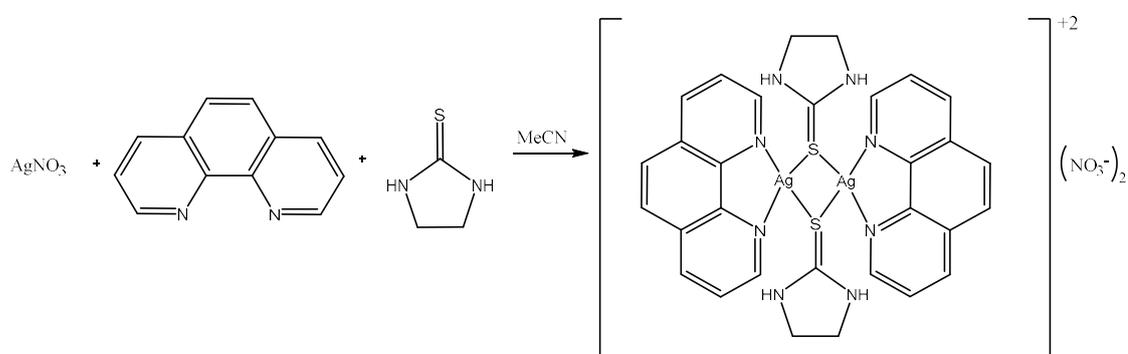


Figura 5- Estrutura química do composto JB5  
Fonte: Elaborado pela autora.

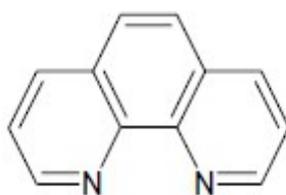


Figura 6- Grupamento fenantrolina (phen)  
Fonte: Elaborado pela autora.

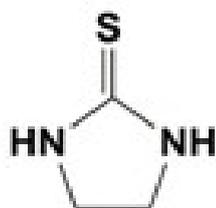


Figura 7: Grupamento 2-tionaimidazolina  
Fonte: Elaborado pela autora.

## 5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Camundongos SWISS, com nove semanas de idade, foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, e Hamsters (*Mesocricetus auratus*), com oito semanas de idade, foram obtidos no Biotério da Universidade Federal de Ouro Preto-MG. Os experimentos foram realizados em conformidade com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL), sob o número de protocolo 08/2016. Os animais foram mantidos no Biotério Experimental da Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL-MG) em ambiente com ventilação, ração e água *ad libitum*.

Para realização de todos os experimentos foram utilizados no total 81 animais, sendo 45 camundongos e 36 hamsters (Figura 8).

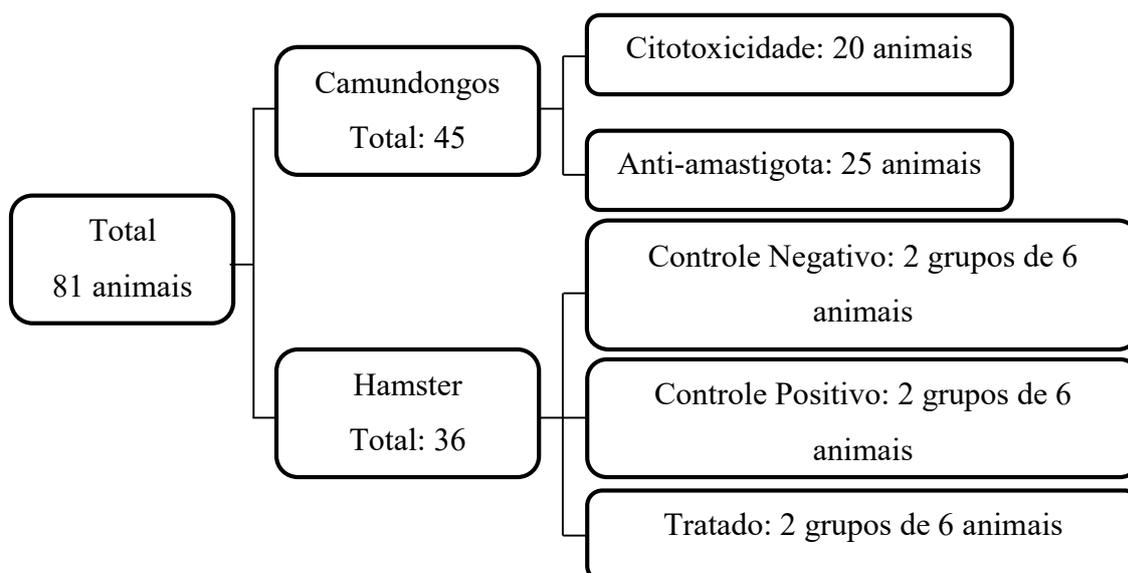


Figura 8- Esquema de delineamento do experimento.

Fonte: Elaborada pela autora.

Nota: Controle negativo compreendem os animais sem tratamento, e o controle positivo compreendem os animais infectados e tratados com fármaco de referência, Glucantime.

## 5.3 PARASITOS

Para o presente estudo foi utilizada a espécie *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/71973/M2269) e *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/72/cepa46). Os parasitos da espécie *L.(L.) amazonensis* foram inoculados na pata de camundongo SWISS. Já os

parasitos da espécie *L. (L.) infantum chagasi* foram inoculados na cavidade peritoneal de hamsters (*Mesocricetus auratus*). Após cerca de 60 dias de infecção, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, sendo feito o maceramento da lesão da pata do camundongo e do baço de hamsters, para isolamento e expansão dos parasitos. A manutenção foi realizada a 25°C em meio LIT e meio 199 (Sigma), respectivamente, suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 50000UI/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 2% de urina humana.

#### 5.4 ENSAIOS *in vitro*

A seguir será descrito como foram realizados os ensaios *in vitro*.

##### 5.4.1 Avaliação da atividade anti-promastigota

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* foram mantidas em meio LIT e meio 199, respectivamente, suplementado com 10% de SFB em estufa a 25°C. Para a realização dos testes foram transferidas à razão de  $1,00 \times 10^6$  células/mL para placas de 48 poços, onde então foram adicionadas as substâncias a serem avaliadas nas concentrações 40; 10; 5 e 0,1 µg/mL. Após 72 horas de incubação a 25°C, foram adicionados 50 µL de resazurina de sódio em cada poço. Após 6 horas de incubação, as células foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm e 600nm para a determinação do IC<sub>50-PRO</sub>, tendo como controle protozoário em meio de cultura sem a adição de compostos ou fármacos. Este IC<sub>50-PRO</sub> foi então comparado ao IC<sub>50-PRO</sub> do fármaco padrão anfotericina B (PEREIRA et al., 2011). Os ensaios foram realizados em triplicatas e em três ocasiões diferentes.

##### 5.4.2 Avaliação da atividade anti-amastigota

Para avaliação da atividade leishmanicida em amastigotas, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, mantidos em meio RPMI-1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de 24 poços. Após 24 horas, estas células foram infectadas com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L.(L.) infantum chagasi* na fase estacionária de crescimento na razão de 10:1. No dia seguinte à infecção, a cada poço foram adicionados os compostos em várias

concentrações: 40, 10, 5 e 0,1 µg/mL e incubados por 72 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, quando então foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa (MERCK®) a 10% para posterior análise por microscopia óptica. Para avaliar o efeito dos compostos sobre as formas intracelulares de *Leishmania* foram usados parâmetros, como número de amastigotas/macrófago e número de macrófagos infectados. A porcentagem de células infectadas foi levada em consideração para a ilustração dos resultados, uma vez que estes expressos como a concentração inibitória de 50% da taxa de infecção (IC<sub>50-AMA</sub>). O fármaco de referência utilizado neste ensaio foi Anfotericina B (PEREIRA, 2010). Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

### 5.4.3 Avaliação da citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade, foram utilizados macrófagos peritoneais murinos mantidos em meio RPMI 1640 a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, dispostos em placas de 96 poços na razão de 8,00 x 10<sup>6</sup> por poço, aos quais foram adicionadas os compostos a serem avaliados nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,625; 7,8125; 3,90 µg/mL e incubados por 48 horas. Após o período de incubação foram adicionados 10 µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium brometo) a cada poço, com nova incubação por 4 horas. As células lisadas com DMSO foram avaliadas em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu, duplo-feixe, modelo 2550 à 570 nm para determinação do CC<sub>50</sub> por comparação ao controle sem adição de compostos ou fármacos (PEREIRA et al., 2011). A densidade óptica obtida foi então convertida à porcentagem de inibição usando a equação (1), para que então por análise de regressão dos dados pudesse ser determinada a concentração citotóxica a 50% dos macrófagos (CC<sub>50</sub>) (PEREIRA, 2010).

Equação (1):

$$\% \text{Inibição} = [(DO_{\text{controle}} - DO_{\text{composto}}) / DO_{\text{controle}}] \times 100$$

DMSO foi usado como controle e a Anfotericina B foi utilizada como medicamento de referência. Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

### 5.4.4 Índice de seletividade

O Índice de segurança (SI) é a razão entre  $CC_{50}$  e  $IC_{50-AMA}$ . Portanto, a determinação do mesmo é calculada pela razão entre a concentração citotóxica para 50% das células avaliadas no teste de citotoxicidade ( $CC_{50}$ ) e a concentração inibitória para 50% das células avaliadas no teste de atividade dos compostos, em formas amastigotas ( $IC_{50-AMA}$ ), considerando-se a mesma substância, segundo Pereira (2010), representado pela equação 2 a seguir.

Equação (2):

$$SI = CC_{50}/IC_{50-AMA}$$

#### 5.4.5 Análise Estatística *in vitro*

A análise estatística foi realizada usando regressão não linear para a obtenção dos valores de  $IC_{50-PRO}$ ,  $IC_{50-AMA}$  e  $CC_{50}$ , seguida pela análise do teste de Tukey, em que os valores obtidos para os compostos testados foram comparados ao fármaco de referência. Diferenças foram significativas quando o *p*-valor foi menor que 0,05.

### 5.5 ENSAIOS DE INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A seguir será descrito como foi realizado os ensaios de inibição enzimática e análise estatística.

#### 5.5.1 Atividade inibitória contra a isoforma r-CPB2.8 *L. (L.) mexicana*

A enzima r-CPB2.8 de *L. (L.) mexicana* foi expressa, purificada e ativada como descrito previamente (SANDERSON et al, 2000; ALVES et al, 2001). A concentração da solução enzimática foi determinada por titulação com cistatina C humana, que foi uma generosa doação de M. Abrahamson (Universidade de Lund, Suécia), utilizando Z-Phe-Arg-MCA como substrato. A hidrólise do substrato peptídeo fluorogênico pela enzima foi realizada em acetato de sódio 0,1 mol/L, pH 5,5, a 37°C, contendo 5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de DTT para ativação enzimática por 10 minutos. A hidrólise do substrato foi monitorada através das medidas da fluorescência a  $\lambda_{em} = 460$  nm com excitação de  $\lambda_{ex} = 380$  nm usando um F-2500

espectrofluorímetro Hitachi. Os valores dos IC<sub>50</sub> foram determinados usando o software Grafit 5,0 (Erithacus Software Ltda).

Os resultados coletados foram tratados no programa Grafit software (Erithacus Software, Horley, Surrey, U.K.) versão 5.0. Adotou-se o modelo de obtenção dos valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL), que pode ser definido como a concentração de inibidor necessária para inibir 50% da atividade enzimática no ensaio, conforme demonstrado na equação (3), onde se assume que o valor de y (atividade enzimática remanescente) diminua gradativamente conforme aumenta o valor de x (concentração de inibidor).

Equação (3):

$$Y=100\%/[1+(x/IC_{50})^5]$$

O experimento foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Wagner Alves de Souza Júdice, na Universidade de Mogi das Cruzes, no Centro Interdisciplinar de Investigação Bioquímica.

### 5.5.2 Análise estatística enzimática

Os resultados foram representados pela média e o desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas. As diferenças das amostras serão avaliadas por meio dos valores de *p* (Mann-Whitney unpaired two-tailed).

## 5.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Os sobrenadantes da cultura de macrófagos peritoniais de camundongos, infectados com *L. (L.) amazonensis* e em contato com o composto testado foram coletados em três situações diferentes. Primeiramente, foi coletado 24 horas após a aderência desses macrófagos. No segundo momento, após 24 horas de infecção destes com *L. (L.) amazonensis*. E no último momento, após 72 horas do tratamento destes macrófagos infectados e tratados com o composto. As amostras foram congeladas assim que coletadas e a produção de NO foi determinada pelo reagente de Griess, como descrito abaixo.

A avaliação das concentrações de óxido nítrico foi realizada pela medida de nitritos (NO<sup>-2</sup>) em sobrenadantes de cultura de células (BENJAMI; VALLACE, 1994; MOSHAGE,

1994; MOSHAGE, 1995). As amostras foram descongeladas e 100  $\mu\text{L}$  das amostras e 100  $\mu\text{L}$  do reagente de Griess foram pipetados em placas de 96 poços, em duplicata e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos. Logo foi determinada a absorbância a 540 nm em leitor de ELISA (GREEN et al., 1982). Os resultados expressos em mM foram determinados após a extrapolação de valores obtidos de uma curva padrão realizada com nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) nas concentrações de 100 mM a 0,78 mM para cada placa como mostrado na figura 9.

O reagente de Griess foi preparado na hora do uso, misturando partes iguais da solução A - sulfanilamida 1% em  $\text{H}_3\text{PO}_4$  2,5% (MERCK) e da solução B - naftilenodiamina 0,1% em água bidestilada (GREEN et al, 1982).

Nesse ensaio foi utilizado controle de macrófagos; macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*; macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com o composto JB5SF nas concentrações 10 e 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; com ou sem a adição de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de lipopolissacarídeo (LPS). Os ensaios foram realizados em triplicata e em três ocasiões diferentes.

O experimento foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Luiz Cosme Cotta Malaquias do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas-MG.

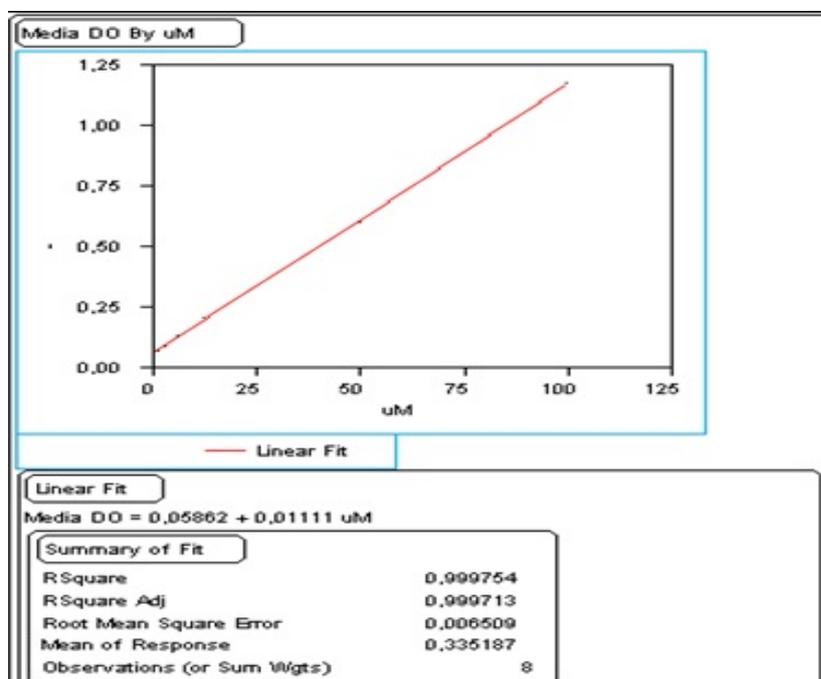


Figura 9: Curva padrão do nitrito de sódio.

Fonte: Elaborada pelo autor.

## 5.7 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM A MEMBRANA

A seguir será descrito como foi feita a análise da atividade do composto pela microscopia de força atômica.

### 5.7.1 Análise da atividade do composto pela microscopia de força atômica

A seguir serão descritos sobre a avaliação da ação do composto nas formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, por microscopia de força atômica.

#### 5.7.1.1 Avaliação da ação do composto nas formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*

Foi realizado o teste anti-promastigota conforme descrito no tópico 6.4.1. Após 72 horas da ação do composto contra as formas promastigotas, foram coletadas alíquotas do poço referente ao IC<sub>50</sub> deste e adicionados em lamínulas circulares, fixado com paraformoldeído 5% e deixado secar em temperatura ambiente, utilizando controle (apenas *Leishmania*) e teste (*Leishmania* com composto).

#### 5.7.1.2 Avaliação do composto nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Foi realizado o teste anti-amastigota como descrito no tópico 6.4.2. Após 72 horas da ação do composto contra as formas amastigotas, estas foram preparadas em lamínulas circulares, fixada com paraformoldeído 5% e deixado secar em temperatura ambiente (MARQUELE-OLIVEIRA et al.), utilizando controle puro (macrófago), controle positivo (macrófago com *Leishmania*) e teste (macrófago com *Leishmania* e composto).

#### 5.7.1.3 Captura das imagens

As imagens foram capturadas no Laboratório de Microscopia de Força Atômica da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG, em parceria com o Prof. Dr. Ihosvany Camps através do microscópio Park, modelo NX10. As imagens foram obtidas com uma resolução 512X512 pixels e analisadas pelo programa XEI.

## 5.8 ESTUDOS DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM O DNA

A seguir será descrito como foi feito o estudo da avaliação molecular da degradação do DNA pelo composto.

### 5.8.1 Avaliação Molecular da Degradação do DNA pelo Composto

A princípio foi realizado o teste anti-promastigota, como descrito no tópico 6.4.1, e foram realizadas coletas de 100 µL de cada poço de 12 em 12 horas após a adição do composto em diferentes concentrações, até completar 72 horas da ação deste. Todos os sobrenadantes referentes às coletas foram congelados assim que coletados.

Todas as amostras foram processadas conforme protocolo básico de extração de DNA (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As amostras foram dissolvidas em tampão de lise (Tris-HCl, 10 mg/mL, pH 8.0; EDTA 10 mM; SDS, 0,5%; N-laurilsarcozil, 0,01%; proteinase K, 100 mg/mL) e incubados em banho-maria a 56 °C de uma a quatro horas, até a lise completa do material. O DNA dos protozoários submetidos nos testes anti-promastigota foram extraídos pelo protocolo fenol/clorofórmio/isoamil e precipitado com isopropanol. O DNA precipitado foi lavado com etanol a 70% e centrifugado a 10.000g por 10 minutos. O sedimento foi dissolvido em água pura. Como controle de não degradação do DNA na corrida eletroforética foi usado o DNA do timo de vitelo (Sigma®).

Este DNA foi analisado em gel de agarose 0,8% corado com Brometo de Etídio e submetido à corrida eletroforética, a 80 V e 60 mA, de 80 minutos para posterior visualização em transiluminador de luz ultravioleta.

## 5.9 ENSAIOS *in vivo*

A avaliação da atividade anti-*Leishmania in vivo* dos compostos 2-tionaimidazolina e JB5SF foi realizada em hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) tratados por via oral (50 mg/Kg/dia e 25 mg/Kg/dia) e o Glucantime (50 mg/kg/dia) tratados por via intraperitoneal, foi utilizado como referência no tratamento. Ao final do tratamento de dez dias, os animais foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub>, sendo removidos fragmentos do fígado e do baço, os quais foram imediatamente pesados.

Os compostos selecionados para ensaio *in vivo* foi o composto 2-tionaimidazolina, porque foi o que apresentou menor toxicidade e índice de seletividade satisfatório, e o composto JB5SF, por ser o composto que apresentou melhor SI.

O experimento foi realizado em parceria com a doutoranda Juliana Barbosa Nunes e o Dr. Fábio Antônio Colombo do Laboratório de Biologia Molecular de Microorganismos da Universidade Federal de Alfenas - MG.

### **5.9.1 Animais de experimentação**

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos recém-desmamados foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Os animais foram infectados por via intraperitoneal com  $1 \times 10^8$  amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/cepa46) provenientes de um baço de outro animal infectado, utilizando-se um  $n=6$  para cada grupo. As amastigotas foram obtidas por meio de centrifugação diferencial do baço de hamsters previamente infectados e o número de parasitos foi determinado pelo método de Stauber (1958).

### **5.9.2 Manutenção de *Leishmania (L.) infantum chagasi***

Parasitos de *L. (L.) infantum chagasi* foram mantidos em cultura em meio M199 suplementado com 292 mg/L L-glutamina, 110 mg/L de piruvato de sódio, 2,2 g/L de bicarbonato de sódio, 0,02% de hemina, 10% de SFB previamente inativado pelo calor, e 200 µg/ml de gentamicina (ARMSTRONG; PATTERSON, 1994; GOMES et al., 2007). Na fase estacionária da cultura, os parasitos foram retirados, lavados por três vezes em solução salina tamponada (PBS; pH 7,2) e centrifugadas a 1000 g por 10 minutos. Os sedimentos contendo os parasitos foram utilizados para obtenção de DNA controle para as reações de PCR em tempo real e para a confecção da curva padrão.

### **5.9.3 Extração de DNA controle para confecção de curva padrão**

Para a construção da curva padrão de DNA foram utilizados promastigotas contadas em câmara de Neubauer e diluídas até a concentração de  $1 \times 10^8$  parasitos. Os parasitos foram diluídos em série para obter os pontos da curva padrão, variando a concentração de  $1 \times 10^8$  a

$1 \times 10^2$  parasitos/mL. O DNA foi extraído usando o kit de extração QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Os pontos da curva foram testados em triplicata e com no mínimo seis pontos.

#### 5.9.4 Extração de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* e síntese de cDNA

Os fragmentos de fígado e baço foram removidos e pesados (aproximadamente 200 mg) com auxílio de material cirúrgico estéril descartável e individual para cada animal. Os fragmentos foram acondicionados em tubos de microcentrifuga estéreis e congelados imediatamente a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior extração de RNA que ocorreu cerca de 24 horas após a retirada dos fragmentos. Amostras dos fragmentos foram processadas conforme protocolo básico de extração de RNA com colunas de afinidade do kit RNeasy. Os fragmentos foram macerados ainda congelados e lisados com tampão específico do kit (RNeasy Mini Kit). Após a lise, o RNA contido no sobrenadante foi extraído por colunas de afinidade e congelado a  $-80^\circ\text{C}$  imediatamente. A seguir, as amostras de RNA foram reversamente transcritas para cDNA. A uma quantidade de  $11,0 \mu\text{L}$  do RNA foi adicionado  $1,0 \mu\text{L}$  de uma mistura contendo os quatro “DNTP’s”,  $1,0 \mu\text{L}$  de primers. A seguir as reações foram levadas ao termociclador por aproximadamente 5 minutos a  $65^\circ\text{C}$ . Após este tempo foram retiradas e colocadas no banho de gelo por 20 segundos. Ao final deste tempo foi adicionado as misturas,  $2 \mu\text{L}$  DTT e  $4 \mu\text{L}$  de tampão (Tris-HCl,  $250 \cdot 10^3 \text{ mol/L}$ , pH 8,3 ; KCl,  $375 \cdot 10^3 \text{ mol/L}$ ;  $\text{MgCl}_2$   $15 \cdot 10^3 \text{ mol/L}$ ) e colocado novamente no termociclador por 20 segundos a  $37^\circ\text{C}$ . Após os 20 segundos, foi adicionado  $1,0 \mu\text{L}$  da enzima M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Vírus Reverse Transcriptase), a qual é responsável para a complementação do RNA para cDNA de fita dupla.

O grau de pureza das amostras foi analisado no Nanodrop ND2000 pela da medida da absorvância 260/280 (SAMBROOK et al.,1989). Após a verificação da integridade das amostras por eletroforese e PCR, as amostras foram congeladas a  $-20^\circ\text{C}$  para o posterior uso em PCR quantitativo em tempo real.

#### 5.9.5 Escolha do marcador molecular da PCR em tempo real *single*

Para a PCR em tempo real foram utilizados sondas de hidrólise do tipo TaqMan, duplamente marcadas. Na extremidade 5'-end foi ligado covalentemente um fluoróforo FAM

(6-carboxy-fluorescein). Na extremidade 3'-end, foi ligado um “quencher” NFQ (*non-fluorescent quencher*). O desenho das sequências dos digonucleotídeos foi: LINJ31F: 5'CCG CGT GCC TGT CG3'; LINJ31R 5'CCC ACA CAA GCG GGA ACT3'; e a sonda TaqMan 5'CCTCCTTGGACTTTGC3'. As reações foram realizadas em um ABI 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) em um volume final de 20 µL por reação. O volume de 3,0 µL de DNA ou cDNA (amostras ou controles) foram adicionadas a um reagente contendo 10,0 µL de 2X TaqMan Universal PCR Master Mix (NoAmpliErase UNG) e 1,0 µL de uma mistura que inclui os marcadores forward e o reverse na concentração de 18 µM, e a sonda TaqMan marcada com FAM e usando NFQ como *quencher* na concentração de 5 µM. Foram adicionados às reações dois controles negativos e um controle positivos, assim como realizados na PCR convencional. As amplificações ocorreram em um ciclo inicial de 50°C por 2 minutos para melhor atividade da AmpliErase UNG, uma enzima que remove qualquer produto amplificado anteriormente, evitando contaminação cruzada. A segunda etapa foi de um ciclo a 95°C por 10 minutos. Na próxima etapa foram realizados 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto. Este marcador já foi utilizado com sucesso na quantificação de RNA de *L. (L.) infantum chagasi* retiradas do interior de carrapatos e pulgas (COLOMBO et al, 2011).

### 5.9.6 Quantificação da carga parasitária *in vivo* por PCR em tempo real

Para a avaliação do tratamento pela PCR em tempo real foi utilizada a curva padrão para determinar o número absoluto de parasitos presentes por mg de amostra. O número do Ct (valor do correspondente ao ciclo em que a quantidade de cópias de DNA alvo ultrapassa um limite determinado pelo aparelho) obtido pela PCR em tempo real foi plotado na curva padrão para a obtenção do número de parasitos. O sinal foi gerado pelo acúmulo de sinal fluorescente correspondente ao acúmulo de DNA amplificado.

### 5.9.7 Análise estatística *in vivo*

Os resultados foram representados pela média e o desvio padrão dos ensaios realizados em duplicatas. As diferenças das amostras serão avaliadas por meio dos valores de *p* (*Mann-Whitney unpaired two-tailed*).

## 6 RESULTADOS

O trabalho em si teve como foco o potencial leishmanicida de alguns compostos orgânicos que contém prata em sua estrutura. A atividade anti-*Leishmania* dos compostos contendo prata JB3, JB4, JB5, e JB6 e o composto ligante quelante 2-tionaimidazolina foram analisadas contra ambas as formas do parasito e estimados pela concentração inibitória do crescimento em 50% (IC<sub>50</sub>) em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*. Além disto, os efeitos citotóxicos destes compostos foram avaliados contra macrófagos peritoneais murinos (CC<sub>50</sub>). Diante esses resultados, procurou-se deduzir, de acordo com a literatura, seu principal mecanismo de ação e também avaliar sua atividade leishmanicida, *in vivo*.

### 6.1 ENSAIOS *in vitro*

A princípio, os compostos foram avaliados contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pela facilidade de manutenção e manipulação destas culturas para a utilização destas nos experimentos e em um segundo momento contra as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Posteriormente foram testados contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e seus efeitos citotóxicos.

Os compostos JB5SF e phe terão seus resultados apresentados posteriormente.

#### 6.1.1 Atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*

Os resultados apresentados na Tabela 1 mostram os valores de IC<sub>50</sub> dos quatro compostos sintetizados que contém prata em sua estrutura (JB3, JB4, JB5 e JB6) além da 2-tionaimidazolina, o qual é apenas o ligante quelante utilizado para obtenção dos demais compostos, frente às formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

De uma maneira em geral, todos os compostos testados mostraram significativa atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, quando comparados ao fármaco de referência, Anfotericina B (IC<sub>50</sub> = 4,70 µg/mL).

Nos ensaios da atividade anti-promastigota de *L. (L.) infantum chagasi* observa-se, na Tabela 1, uma melhor atividade em relação à atividade contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Tabela 1- Atividade de compostos contendo prata em sua estrutura contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

Compostos	IC <sub>50</sub> <i>L.(L.) amazonensis</i> (µg/mL±Desvio Padrão) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <i>L.(L.) infantum chagasi</i> (µg/mL±Desvio Padrão)
JB3	33,00±1,98	2,96±0,12
JB4	28,43±1,52	2,85±0,09
JB5	8,06±1,22*	1,46±0,15
JB6	34,70±3,30	2,75±0,06
2-tionimidazolina	7,73±0,26*	24,88±2,45**
Anfotericina B	4,72±0,56	3,20±0,02

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: <sup>a</sup> Cada valor de IC<sub>50</sub> representa a média ± desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. \*Valores marcados com asterisco significam que os compostos são estatisticamente semelhantes à AmpB. \*\*Valor marcado com asterisco significa que o composto difere estatisticamente dos demais.

### 6.1.2. Atividade leishmanicida contra formas amastigotas *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*

Para a realização dos ensaios de amastigotas intracelulares foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, os quais são descritos como um dos modelos mais precisos, fornecendo resultados altamente reprodutíveis e elevada taxa de infecção (TEMPONE; OLIVEIRA; BERLINK, 2011), parâmetros necessários para uma análise apropriada da atividade leishmanicida.

Para atividade anti-amastigotas em *L. (L.) amazonensis*, os compostos mostraram excelente atividade, porém menos ativos que a Anfotericina B (IC<sub>50</sub> = 1,20 µg/mL) (Tabela 2). Vale ressaltar que o valor de IC<sub>50</sub> do composto JB5 foi estatisticamente igual ao mostrado pelo fármaco de referência, mostrando-se com um alto potencial na redução destas formas.

De uma maneira geral, a melhor atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L.(L.) infantum chagasi* foi mostrada pelo composto JB5 (IC<sub>50</sub> = 8,20 µg/mL), sendo um composto com melhor atividade quando comparado com os demais e não havendo diferença estatística em relação ao fármaco padrão (IC<sub>50</sub> = 3,72 µg/mL), mostrada abaixo, na tabela 2.

Tabela 2- Atividade de compostos contendo prata em sua estrutura contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

Compostos	IC <sub>50</sub> <i>L. (L.) amazonensis</i> ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{Desvio Padrão}$ ) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> <i>L. (L.) infantum chagasi</i> ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{Desvio Padrão}$ ) <sup>a</sup>
JB3	5,89 $\pm$ 2,11	20,40 $\pm$ 3,30
JB4	2,31 $\pm$ 0,35	19,25 $\pm$ 2,50
JB5	1,30 $\pm$ 0,20	8,21 $\pm$ 1,62**
JB6	3,01 $\pm$ 0,98	19,35 $\pm$ 3,92
2-tionaimidazolina	37,91 $\pm$ 1,35*	25,38 $\pm$ 2,10
Anfotericina B	1,20 $\pm$ 0,11	3,72 $\pm$ 0,60**

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: <sup>a</sup> Cada valor de IC<sub>50</sub> representa a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. \*Valor marcado com asterisco significa que o composto difere estatisticamente dos demais. \*\*Valores marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente semelhantes entre si.

### 6.1.3 Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade são importantes, pois as formas amastigotas apresentam-se dentro dos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. Sendo assim, a avaliação do potencial citotóxico a macrófagos peritoneais murinos procedeu-se através do tratamento destas células com os compostos orgânicos contendo em prata em sua estrutura e também com o composto 2-tionaimidazolina em diferentes concentrações, variando de 3,91 a 500,00  $\mu\text{g/mL}$  no poço. O fármaco utilizado como referência foi Anfotericina B ( $CC_{50} = 25,00 \mu\text{g/mL}$ ).

De acordo com os resultados obtidos nos testes apresentados abaixo na Tabela 3, todos os compostos exibiram valores de  $CC_{50}$  estatisticamente maiores quando comparados com o fármaco padrão, apresentando menor toxicidade.

Diante dos resultados apresentados, observou-se que os compostos que apresentam o ligante fenantrolina e prata mostraram-se mais tóxicos que o composto 2-tionaimidazolina. Com isso, foi avaliada a atividade do ligante fenantrolina separadamente para analisar sua toxicidade e obteve-se o  $CC_{50} = 30,80 \pm 5,37 \mu\text{g/mL}$ . Com isso, pode-se concluir que o grupamento fenantrolina contribuiu consideravelmente para a toxicidade dos compostos. Assim, despertou-se o interesse de testar um destes compostos que contém prata em sua estrutura sem o grupamento fenantrolina para avaliar sua atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* e sua

toxicidade. Como o JB5 foi o composto que apresentou as melhores atividades leishmanicida contra estas espécies, foi realizado uma modificação química em tal composto retirando-se o grupamento fenantrolina para tais análises. Este foi denominado JB5SF.

A partir da avaliação da toxicidade do composto JB5SF, obteve-se  $CC_{50} = 89,62 \pm 5,12$   $\mu\text{g/mL}$ . Portanto, pode-se concluir que este composto é interessante candidato para teste *in vivo*.

Tabela 3- Compostos contendo prata em sua estrutura e atividade citotóxica ( $CC_{50}$ ) à macrófagos peritoneais murinos.

Compostos	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL} \pm$ Desvio Padrão) <sup>a</sup>
JB3	91,80 $\pm$ 21,21
JB4	62,95 $\pm$ 6,01*
JB5	52,45 $\pm$ 0,07*
JB6	60,45 $\pm$ 12,23*
2-tionaimidazolina	166,50 $\pm$ 14,50
Anfotericina B	25,00 $\pm$ 1,04

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: <sup>a</sup> Cada valor de  $CC_{50}$  representa a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0. \*Valores marcados com asterisco significa que os compostos são estatisticamente semelhantes.

#### 6.1.4 Atividade antipromastigota e antiamastigota do composto JB5SF

Ao avaliar a atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (L.) infantum chagasi*, observaram-se ótimas atividades, mesmo sem a presença do grupamento fenantrolina (Tabela 4), confirmando que o grupamento em questão não contribuía de forma positiva na estrutura do composto, ou seja, além de ser grupamento responsável por aumentar a toxicidade, este também não interfere na melhora significativa da atividade leishmanicida.

Tabela 4- Atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, do composto JB5SF.

		JB5SF
<i>L. (L.) amazonensis</i> ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{Desvio Padrão}$ ) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> -PRO	4,45+1,29
	IC <sub>50</sub> -AMA	1,80±0,35
<i>L. (L.) infantum chagasi</i> ( $\mu\text{g/mL} \pm \text{Desvio Padrão}$ ) <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> -PRO	8,91+2,12
	IC <sub>50</sub> -AMA	7,67±2,69

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: <sup>a</sup> Cada valor de IC<sub>50</sub> representa a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata determinado pelo software Bioestat 5.0.

## 6.2 ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O IS é um importante parâmetro para garantir que os compostos possam atingir o alvo causando efeitos colaterais mínimos nas células hospedeiras. Valores maiores ou iguais a 1,00 são considerados satisfatórios (PEREIRA, 2010). Assim, o índice de seletividade é representado pela Tabela 5.

De acordo com os resultados, o composto que apresentou o melhor índice de seletividade, foi o JB5SF. Por outro lado, o composto 2-tionaimidazolina apresentou menor toxicidade para as células de mamíferos em relação ao composto JB5SF, por isso optou-se por realizar os testes *in vivo* com estes compostos.

Tabela 5- Índice de Seletividade de acordo com IC<sub>50</sub>-AMA em *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*.

Compostos	SI ( <i>L. (L.) amazonensis</i> )	SI ( <i>L. (L.) infantum chagasi</i> )
JB3	15,58	4,50
JB4	27,25	3,27
JB5	40,34	6,38
JB6	20,08	3,12
JB5SF	49,78	11,68
2-tionaimidazolina	4,39	6,56
Anfotericina B	20,83	6,90

## 6.3 ENZIMÁTICO

Para investigar um possível mecanismo pelo qual estes compostos poderiam estar exercendo sua atividade leishmanicida, foram realizados testes de inibição de atividade enzimática de proteases.

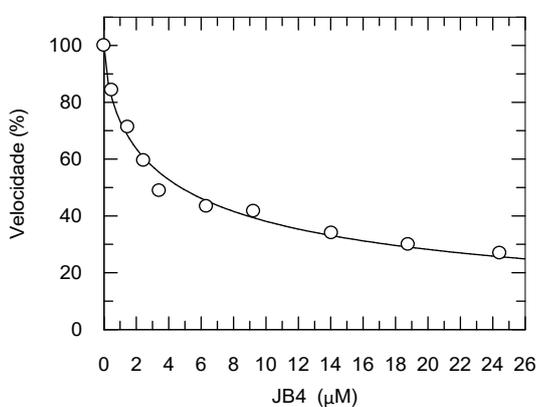
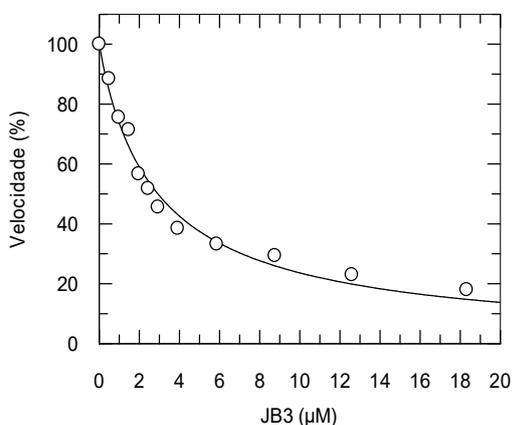
A atividade antiproteolítica dos compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura na cisteíno-protease r-CPB 2.8 de *L. (L.) mexicana* estão mostrados na Tabela 6 e na Figura 10. Os resultados dos ensaios de inibição enzimática mostram que o composto JB5 foi o inibidor mais potente com valor de  $IC_{50}$  de  $2,37 \pm 0,09 \mu M$ , porém não mais ativo que o padrão E64 ( $IC_{50} = 0,125 \pm 0,006 \mu M$ ) empregado. Este apresentou-se também como o mais ativo nas isoformas promastigotas e amastigotas o que leva a acreditar numa correlação direta entre atividade parasitária e antiproteolítica deste composto. Acreditando-se que o composto JB5 possa ser um potencial fármaco para o tratamento da leishmaniose.

Tabela 6- Avaliação antiproteolítica na isoforma r-CPB 2.8 de sesteiam protease de *L. (L.) mexicana* dos compostos organometálicos comparados ao inibidor padrão E64.

Compostos	r-CPB2.8 $IC_{50}$ ( $\mu M \pm$ Desvio Padrão) <sup>a</sup>
JB3	$2,92 \pm 0,16$
JB4	$4,74 \pm 0,34$
JB5	$2,37 \pm 0,09$
JB6	$3,13 \pm 0,11 \mu g/mL^*$
2-tionaimidazolina	$3,09 \pm 0,08$
E64	$0,125 \pm 0,006$

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: <sup>a</sup>Cada valor de  $IC_{50}$  representa a média  $\pm$  desvio padrão da triplicata determinado pelo software Grafit 5.0. <sup>b</sup>O composto E64 foi usado como inibidor de referência para a protease ensaiada. \*Não tem a massa molecular do composto para determinar a concentração em molaridade.



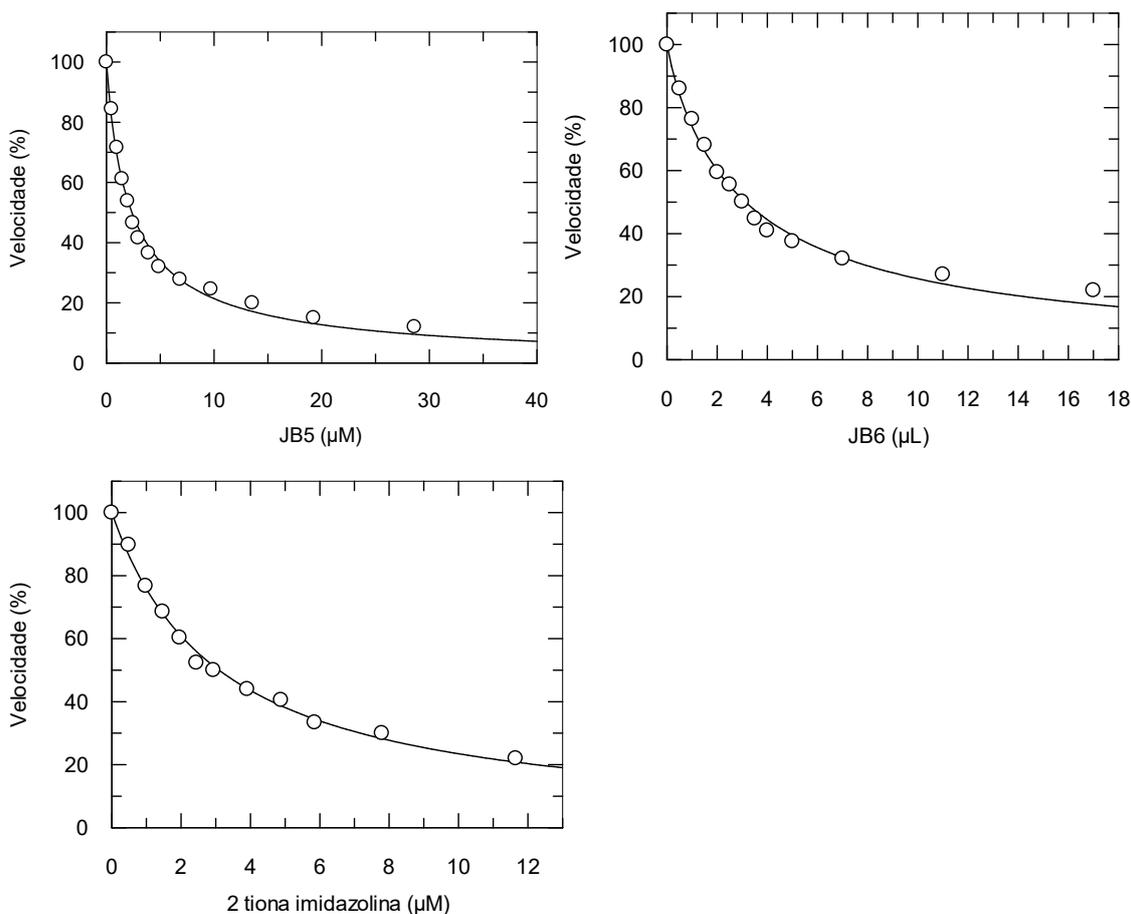


Figura 10- Atividade residual de proteases na presença de várias concentrações.  
Fonte: Elaborado pela autora.

#### 6.4 DOSAGEM DE NO

Visto que o JB5SF apresentou os maiores valores de IS, os quais atendem às recomendações do DNDI ( $IS > 1,00$ ), e também foi estudado quanto à sua eficácia *in vivo*, este composto prosseguiu pros estudos de mecanismos de ação, uma importante etapa no processo de descoberta de um novo hit.

A produção de NO é um importante parâmetro que nos permite avaliar se os compostos auxiliam para desencadear uma resposta imune com perfil anti-inflamatório ou pró-inflamatório mais acentuado.

O composto testado, JB5SF, foi comparado com os controles: macrófagos e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*, estimulados ou não com LPS, com o intuito de avaliar a produção de NO pelos mesmos.

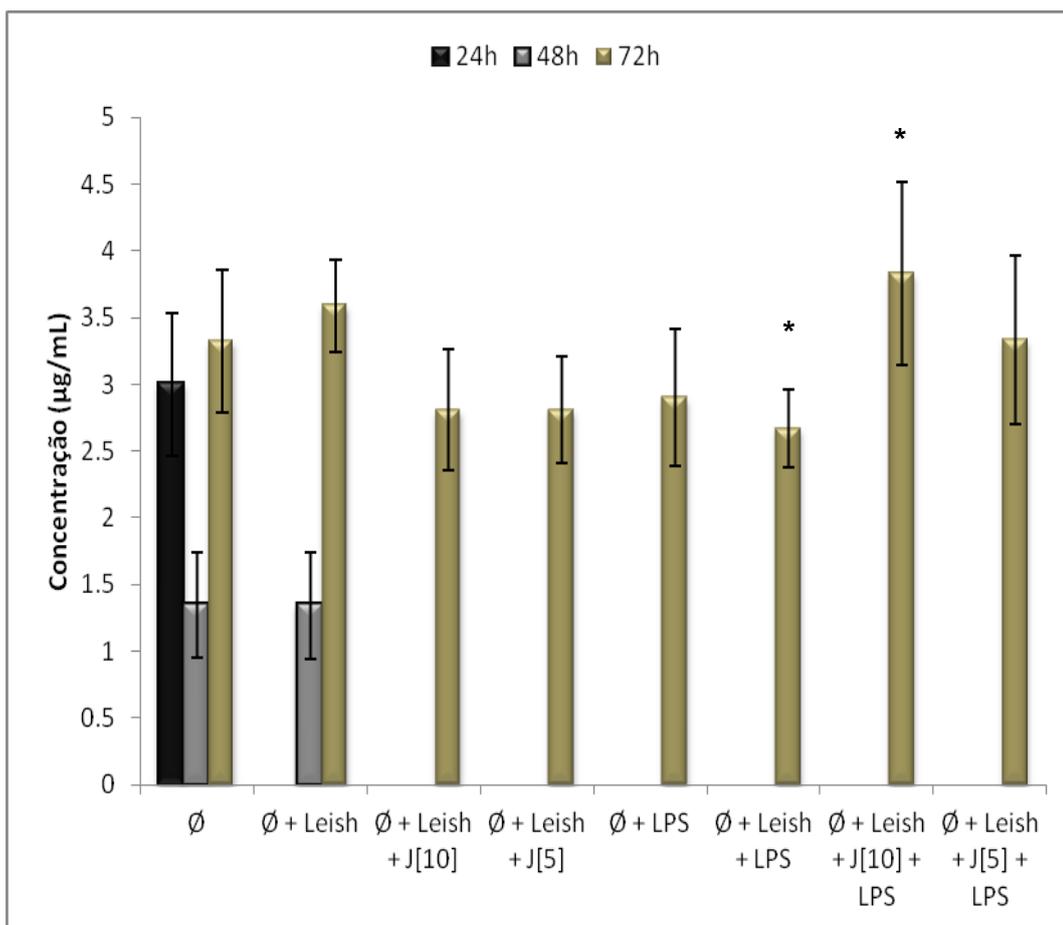


Figura 11: Dosagem de NO avaliada pela concentração de nitritos ( $\mu\text{g/mL}$ ) nos sobrenadantes de culturas de células tratadas com JB5SF em duas concentrações, 10  $\mu\text{g/mL}$  e 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Foi utilizado LPS à 1  $\mu\text{g/mL}$ . \*Apresentam diferenças estatísticas entre si.

A partir dos dados apresentados pela figura acima, verificou-se que o tratamento com o composto JB5SF na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$  promoveu um aumento na produção de NO pelos macrófagos infectados, quando estimulado com LPS, apresentando diferença estatística em relação à produção de NO pelos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* em associação com LPS.

## 6.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Para explorar outro possível mecanismo de ação desses compostos foi feito um estudo usando microscopia de força atômica, com o intuito de analisar as alterações de membrana. Nesta análise, procurou verificar se a *Leishmania* e o macrófago se comportariam de formas diferentes na presença do composto JB5SF.

Analisando a figura 12, não foi possível observar alterações na superfície da promastigota quando há o contato com o composto, onde as áreas de superfície da *Leishmania* nas duas situações permaneceram com valores iguais a 14,991 nm.

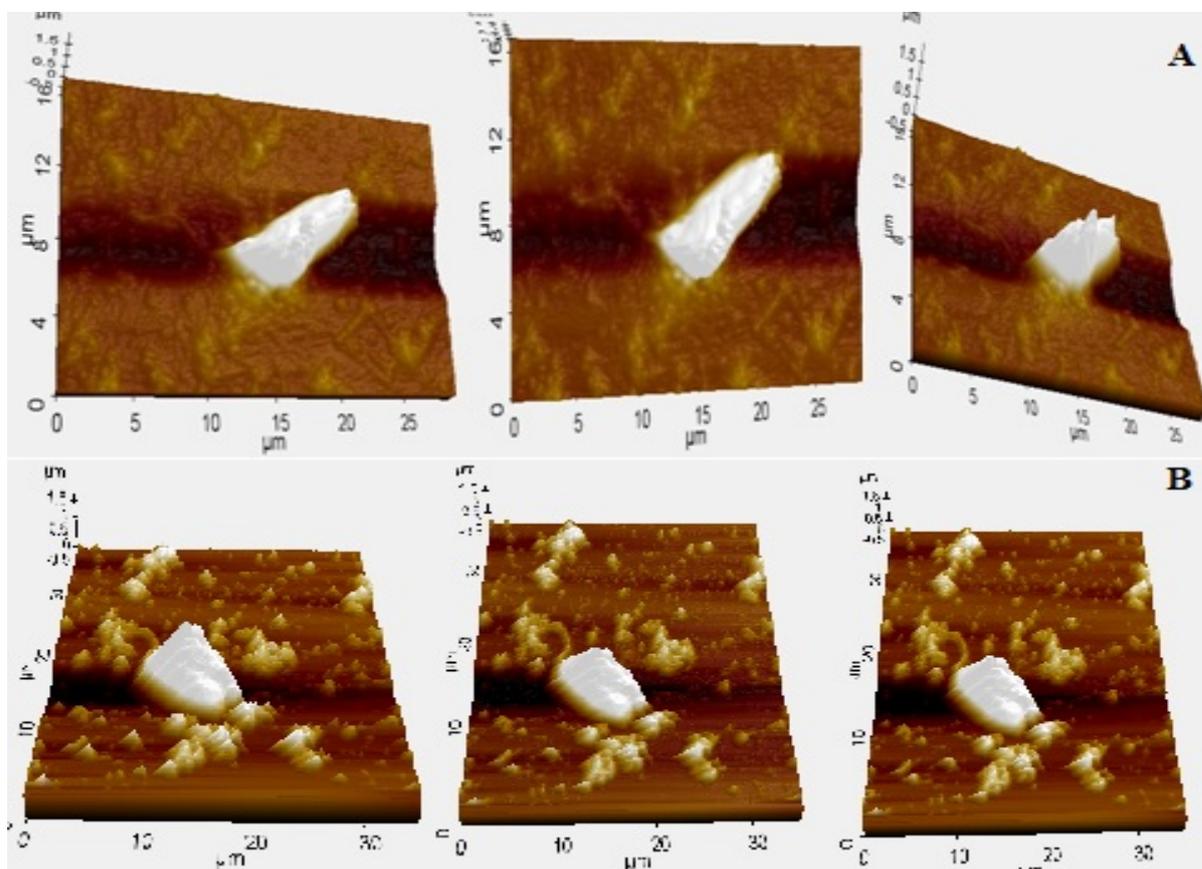


Figura 12- Imagens de *Leishmania* obtidas do microscópio de força atômica (Park, NX10).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: *L. (L.) amazonensis* (A); *L. (L.) amazonensis* tratados com JB5SF (B).

Em análise da figura 13, representada abaixo, pode-se observar alterações nas superfícies dos macrófagos quando em contato com o parasito e o composto, onde existem diferenças nas áreas de superfície dos macrófagos, nas diferentes situações. A situação (A) apresenta área de superfície igual a 1355,63 nm, na situação (B) igual a 1367,7903 nm e na situação (C) igual a 1377,3076 nm. Apesar de apresentarem diferenças, não foram estatisticamente diferentes.

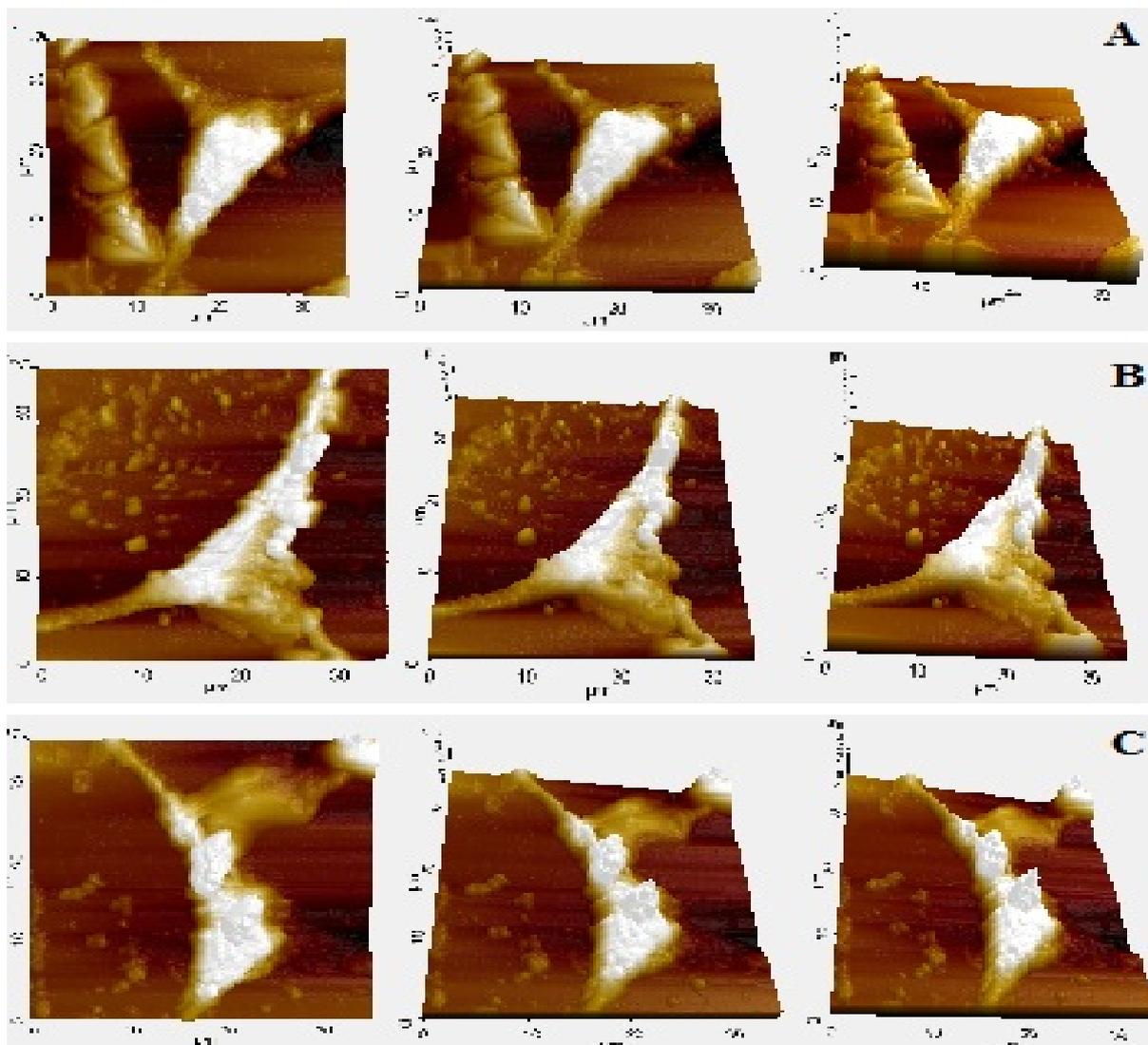


Figura 13- Imagens de macrófagos obtidas do microscópio de força atômica (Park, NX10).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Macrófagos (A), macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* (B) e macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com o composto JB5SF (C).

## 6.6 AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO DNA PELO COMPOSTO

Pela avaliação dos resultados através da análise do gel eletroforético obtido utilizando-se as amostras de DNA extraído após a coleta de alíquotas do parasito com o composto JB5SF, pode-se perceber que nas maiores concentrações (40 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) não foi possível ver as bandas, todavia em concentrações menores (5 e 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ) houve a presença de uma banda sem degradação, representada pela seta conforme mostra a figura 14.

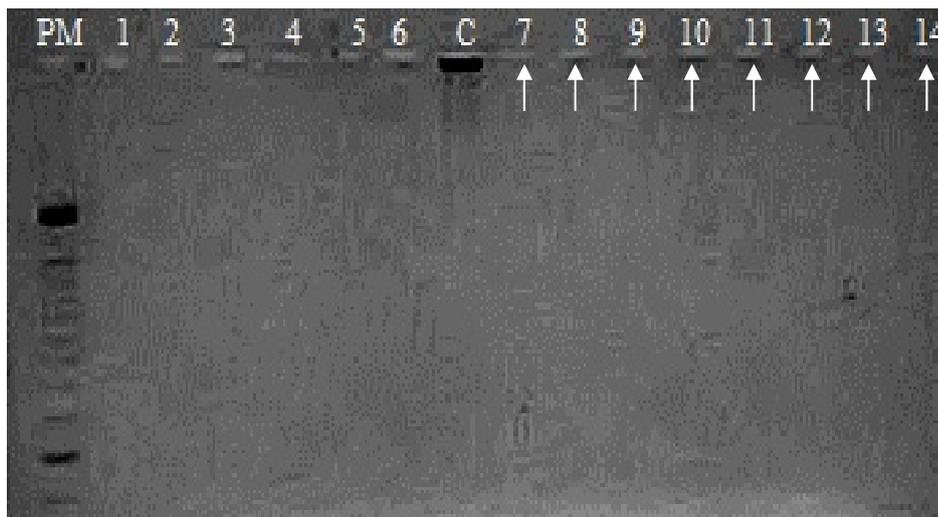


Figura 14- Gel de Agarose 0.8% corado com Brometo de Etídeo representando a inibição das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em decorrência da exposição ao composto JB5SF.

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: Peso molecular (PM); concentração de 40 µg/mL (1, 2 e 3); concentração de 10 µg/mL (4, 5 e 6); concentração de 5 µg/mL (7, 8 e 9); concentração de 0,1 µg/mL (10, 11 e 12) controle de *Leishmania* sem tratamento (13 e 14); controle positivo de timo de vitelo (C).

### 6.7 *In vivo*

No presente ensaio, a eficácia dos compostos 2-tionimidazolina e JB5SF foram avaliadas após dez dias de tratamento usando a dosagem de 50 mg/Kg/dia e 25 mg/Kg/dia, respectivamente, em suspensão utilizando o veículo carboximetilcelulose por via oral e comparados com o grupo controle, tratados com Glucantime (dosagem de 50 mg/Kg/dia). O tratamento iniciou sessenta dias após a inoculação, permitindo o estabelecimento da infecção. Os valores de Ct obtidos das amostras de baço e fígado e o número de parasitos foram normalizados por grama de órgão. Após o tratamento, diante os dados apresentados abaixo, pela Figura 15, observa-se que o fármaco utilizado como referência (Glucantime), apresentou um número menor de carga parasitária, tanto no fígado quanto no baço, comparado ao composto em questão, 2-tionimidazolina. Contudo, o composto em estudo não foi capaz de reduzir o número de amastigotas.

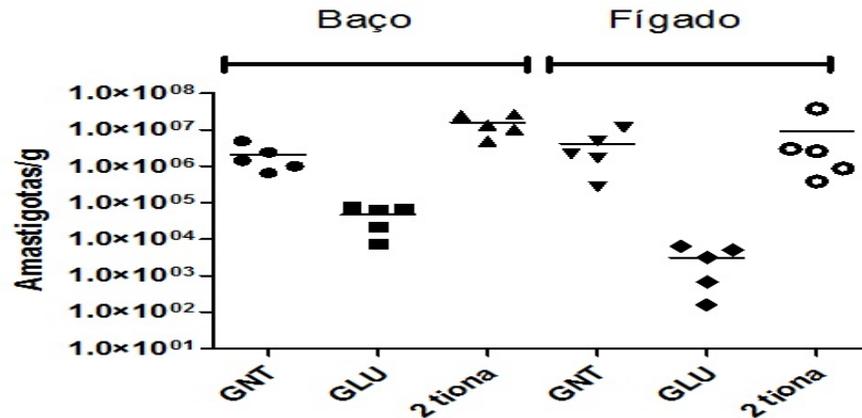


Figura 15- Carga parasitária de fragmentos de baço e fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e tratados com 50 mg/Kg/dia de 2-tionimidazolina (2-tiona) ou com 50 mg/Kg/dia de Glucantime (GLU), comparados com o grupo infectado e não tratado (GNT).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A quantificação de carga parasitária ocorreu por PCR em tempo real ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney).

Após o tratamento, diante os dados apresentados abaixo, pela Figura 16, observa-se que o fármaco JB5SF foi capaz de reduzir a carga parasitária, tanto no fígado quanto no baço, comparado com o grupo não tratado (GNT), além de apresentar estatísticas semelhantes entre si quando se comparara a redução de carga parasitária do composto em questão com o grupo Glucantime (GLU), no baço.

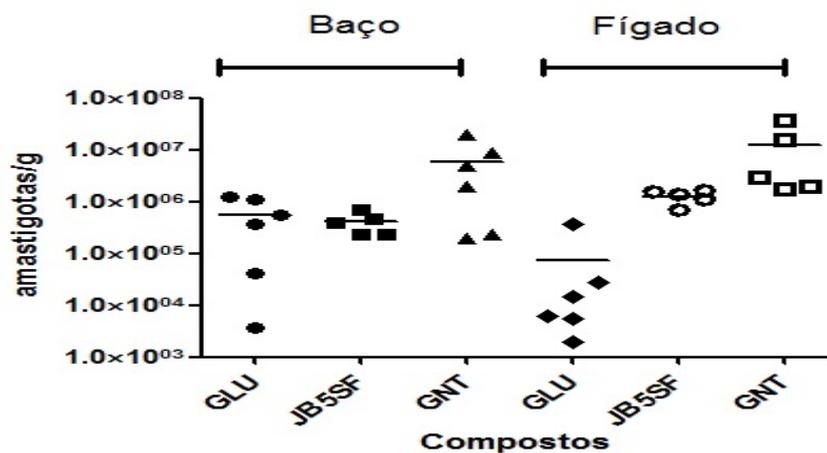


Figura 16- Carga parasitária de fragmentos de baço e fígado de hamsters infectados com *L. (L.) infantum chagasi* e tratados com 25 mg/Kg/dia de JB5SF ou com 50 mg/Kg/dia de Glucantime (GLU), comparados com o grupo infectado e não tratado (GNT).

Fonte: Elaborado pela autora.

Nota: A quantificação de carga parasitária ocorreu por PCR em tempo real ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney).

## 7 DISCUSSÃO

A pesquisa por novos agentes terapêuticos tem como princípio obter um composto que apresente alta seletividade de ligação com seu alvo farmacológico, seja tóxico para o parasita, porém não cause danos às células humanas hospedeiras. Uma estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade leishmanicida é através da identificação das diferenças metabólicas e bioquímicas entre hospedeiro e o parasito tornando-se um alvo para fármacos (SHUKLA et al, 2009).

Muitos micro-organismos, como a *Leishmania*, utilizam o interior das células como refúgio contra defesa celular do organismo, o que dificulta o acesso de agentes quimioterápicos (SOUZA, 2006). Dentre os vários compostos metálicos existentes, esta pesquisa teve como foco os compostos de prata, buscando novos candidatos a fármacos leishmanicidas.

Vale ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura utilizando compostos à base de prata como agente leishmanicida. No trabalho de Jebali e Kazemi (2013), nanopartículas de diversos metais foram estudadas a frente a *L. major* e as nanopartículas de prata foram mais ativas dentre os metais estudados. Baiocco e colaboradores (2011) estudaram nanopartículas de prata frente a *L. infantum* e indicaram a sua atividade frente à tripanotona redutase, enzima importante no metabolismo do parasita. A dedução de que associação entre prata e ligantes poderia conduzir a formação de compostos inéditos com potencial atividade promissora frente ao protozoário do gênero *Leishmania*, foi um ponto importante no planejamento desta pesquisa.

O entendimento dos mecanismos do parasito que permitem o estabelecimento da infecção bem como dos mecanismos imunes do hospedeiro desencadeados que são responsáveis pelo reconhecimento e morte do parasito é decisivo para que ocorra o controle da infecção, e conseqüentemente proporcionem uma contribuição ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas através de medicamentos e vacinas que tragam uma melhoria no prognóstico da doença (HANDMAN; BULLEN, 2002).

Como o modelo experimental murino mais amplamente utilizado para o estudo da leishmaniose cutânea é a infecção de camundongos, segundo Ameen (2010), inicialmente avaliou-se a atividade dos compostos orgânicos contendo prata em sua estrutura, no crescimento parasitário frente a *L. (L.) amazonensis*.

Foi avaliada a atividade leishmanicida de quatro compostos orgânicos que contêm prata em sua estrutura (JB3, JB4, JB5 e JB6) além da 2-tionaimidazolina, o qual é apenas o ligante quelante utilizado para obtenção dos demais compostos. A avaliação da ação direta dos compostos sobre a multiplicação das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mostrou que os compostos testados foram capazes de inibir a multiplicação dos parasitos. A princípio, os compostos 2-tionaimidazolina e JB5 ( $IC_{50} = 7,73 \mu\text{g/mL}$ ,  $IC_{50} = 8,06 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), apresentaram melhores atividades, sendo ambos cerca de 1,7 vezes menos ativo que o fármaco padrão de referência, Anfotericina B ( $IC_{50} = 4,70 \mu\text{g/mL}$ ). Ressalta-se que não foram constatadas diferenças estatísticas entre os compostos citados. Os compostos JB3 e JB6 ( $IC_{50} = 33,00 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} = 34,70 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente) foram os compostos que apresentaram menor atividade contra formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com uma atividade cerca de 7,02 e 7,38 vezes menos ativo que Anfotericina B. Consequentemente, em ordem da maior atividade para menor temos: 2-tionaimidazolina  $\geq$  JB5  $>$  JB4  $\geq$  JB3  $\geq$  JB6.

A partir dos resultados encontrados podemos observar que o acréscimo de prata ao ligante quelante, 2-tionaimidazolina, não melhorou a atividade leishmanicida nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, apesar de não haver diferença estatística em relação ao JB5. Sendo assim, a prata não influenciou na potencialização dos compostos em questão, ou seja, a inserção da prata nas demais estruturas não contribuiu para uma melhora da atividade leishmanicida em *L. (L.) amazonensis* dos demais compostos.

Diante os resultados descritos sobre a atividade desses compostos em relação à promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, observa-se uma significativa melhora da atividade leishmanicida dos compostos contra essa espécie em relação às promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, uma vez que todos os compostos que possuem prata na sua estrutura foram muito ativos, comparados com o fármaco padrão, ou seja, contra as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, a prata contribuiu de maneira considerável com ganho na atividade antipromastigota. As melhores atividades leishmanicidas em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em ordem crescente de atividade foram mostradas pelos compostos JB5, JB6, JB4 e JB3 ( $IC_{50} = 1,46 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} = 2,75 \mu\text{g/mL}$ ;  $IC_{50} = 2,85 \mu\text{g/mL}$  e  $IC_{50} = 2,96 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), não havendo diferença estatística. Destaca-se o composto JB5 entre os outros compostos por ser este o composto que se apresentou mais ativo contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, sendo 0,45 vezes mais ativo que o fármaco padrão de referência, Anfotericina B. Neste contexto a prata contribuiu para uma melhora da

atividade leishmanicida. De fato, estudos revelam maior ação de compostos de prata sobre as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em relação à *L. (L.) amazonensis* (VALADARES et al., 2011).

Segundo SEGURA e colaboradores (2014), a atividade antiproliferativa de compostos de prata contra a forma promastigota do *L. (L.) amazonensis* depende diretamente do tipo de ligante quelante utilizado e do contra íon. Assim foi observado que a atividade leishmanicida do composto que apresenta o contra íon  $\text{NO}_3^-$  (composto JB5) obteve uma melhora tanto contra formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis* quanto de *L. (L.) infantum chagasi*, comparáveis a fármaco de referência AmpB. Estudos mostram que a adição do grupamento nitrato pode contribuir para o aumento das atividades biológicas de compostos metálicos (FRANCO et al., 2014; ANDRADE et al., 2016).

Dados da literatura têm mostrado que diversas substâncias utilizadas em estudos para avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*, contra diferentes espécies de *Leishmania*, atuam modulando a produção de citocinas de macrófagos peritoniais murinos ou de linhagens de células humanas ou de camundongos (PONTE; SUCRE et al., 2006). Macrófagos são, não só o habitat preferencial das amastigotas de *Leishmania*, como também a principal célula efetora para sua destruição (KROPF et. al., 1998).

As formas encontradas nos hospedeiros vertebrados são as formas amastigotas, as quais são formas intracelulares e os verdadeiros alvos para os fármacos. Os processos de absorção e distribuição dos compostos são de grande importância, uma vez que é necessário que se dissolvam e atravessem as membranas biológicas que formam os tecidos e sistemas multicompartimentados dos seres vivos, até que alcancem seus respectivos sítios de ação (TAVARES; FERREIRA, 2006).

Quando se refere à quantificação da carga parasitária intracelular, isto é, a avaliação do percentual de macrófagos infectados e o número de amastigotas foi possível constatar que assim como a Anfotericina B, os compostos foram capazes de reduzir o parasitismo intracelular, *in vitro* tanto no modelo de infecção por *L. (L.) amazonensis* quanto no modelo de infecção por *L. (L.) infantum chagasi*.

A melhor atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L.(L.) amazonensis* foi mostrada pelo composto JB5 ( $\text{IC}_{50} = 1,30 \mu\text{g/mL}$ ), sendo 0,56 e 0,43 vezes mais ativo que os compostos JB4 ( $\text{IC}_{50} = 2,31 \mu\text{g/mL}$ , segundo mais ativo) e JB6 ( $\text{IC}_{50} = 3,01 \mu\text{g/mL}$ , terceiro mais ativo) e 1,08 vezes menos ativo que o fármaco padrão ( $\text{IC}_{50} = 1,20 \mu\text{g/mL}$ ), onde não apresentou diferença estatística da AmpB. Apesar do composto 2-tionaimidazolina ser menos

ativo contra formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, este é um interessante composto a ser avaliado em outros testes devido sua baixa toxicidade à macrófagos de mamíferos. Todavia, no contexto da atividade leishmanicida frente a amastigotas intracelulares, a prata melhora a atividade dos compostos.

De uma maneira geral, a melhor atividade leishmanicida contra as formas amastigotas de *L.(L.) infantum chagasi* foi mostrada pelo composto JB5 ( $IC_{50} = 8,20 \mu\text{g/mL}$ ), sendo um composto com melhor atividade quando comparado com os demais e não havendo diferença estatística em relação ao fármaco padrão ( $IC_{50} = 3,72 \mu\text{g/mL}$ ), mostrada abaixo, na tabela 2.

Vale ressaltar que as formas amastigotas da *Leishmania* são de tratamento mais difícil, por se alojarem no interior de fagócitos humanos. Neste sentido, a lipofilicidade é uma importante propriedade muitas vezes relacionada com a atividade biológica de compostos, uma vez que na maioria dos casos quanto mais lipofílico um composto, maior a facilidade de transposição de membranas biológicas (LIPINSKI et al., 1997). Portanto, ação dos compostos sobre as formas amastigotas de *Leishmania* pode ser relacionada com o logP, ou seja, para que o composto consiga atingir o parasito precisa primeiramente transpor as biomembranas dos macrófagos. De fato, ao correlacionarmos o logP com a atividade anti-amastigota constata-se que o composto 2-tionaimidazolina ( $\log P = 2,05$ ) o qual é o menos lipofílico é também o que apresenta menor eficácia em amastigotas intracelulares. Os demais compostos que se mostraram mais lipofílicos, ou seja, com uma maior facilidade de atravessar a membrana biológica, foram os mais eficazes para atingir o parasito.

Adicionalmente, os compostos testados nesta pesquisa mostraram-se pouco tóxicos aos macrófagos peritoniais murinos, enquanto que a AmpB exibe uma toxicidade. A princípio, os compostos 2-tionaimidazolina e JB3 ( $CC_{50} = 166,50 \mu\text{g/mL}$ ;  $CC_{50} = 91,80 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente), apresentaram-se menos tóxicos para macrófagos, sendo cerca de 7,00 e 4,00 vezes menos tóxico que o fármaco de referência, Anfotericina B ( $CC_{50} = 25,00 \mu\text{g/mL}$ ). O composto JB5 ( $CC_{50} = 52,45 \mu\text{g/mL}$ ) foi o que se apresentou mais tóxico, porém ainda cerca de 2,00 vezes menos tóxico que o fármaco padrão.

Estudos mostram que o grupamento fenantrolina apresenta uma toxicidade as células de mamíferos (SILVA-LOPEZ, 2010). Em análise aos resultados apresentados, observa-se que os compostos que apresentam o ligante fenantrolina e prata mostraram-se mais tóxicos que o composto 2-tionaimidazolina. Com isso, avaliou-se a atividade do ligante fenantrolina separadamente, revelando sua toxicidade com um valor de  $CC_{50} = 30,80 \pm 5,37 \mu\text{g/mL}$ . A partir desse resultado, pode-se concluir que o grupamento fenantrolina contribuiu

consideravelmente para a toxicidade dos compostos. Com isso, despertou-se o interesse de testar um destes compostos com prata em sua estrutura sem o grupamento mencionado para avaliar sua atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi* e sua toxicidade. Visto que o JB5 foi o composto que apresentou melhores atividades leishmanicida em ambas as espécies, ele foi modificado estruturalmente, retirando o grupamento fenantrolina (JB5SF) para análise.

A partir da avaliação da toxicidade do composto JB5SF, verificou-se um valor de  $CC_{50} = 89,62 \mu\text{g/mL}$ . Portanto, pode-se concluir que este composto é interessante candidato e merece maiores estudos, além de comprovar o efeito citotóxico do grupamento phen.

Estudos mostram que a prata exibe uma baixa toxicidade em humanos e quando absorvida no corpo humano entra no sistema circulatório complexada com proteínas sendo eliminada principalmente pelos rins e pelo fígado (HADRUP; LAM, 2014). Neste sentido, pode-se observar que os compostos estudados e com os resultados apresentados que os compostos estudados mostram uma menor toxicidade em relação ao fármaco de referência. Portanto, os resultados obtidos no presente estudo são promissores para a realização de modificações químicas e realização de novos testes, devido à baixa toxicidade apresentada e ótima atividade leishmanicida em ambas as formas de *Leishmania*. Assim, será testado o composto JB5SF quanto sua eficácia *in vivo*, baseando-se em seu panorama promissor como candidato à fármaco.

Ao avaliar a atividade leishmanicida contra formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* e de *L. (L.) infantum chagasi* do composto JB5SF, observam-se ótimas atividades, mesmo sem a presença do grupamento fenantrolina (Tabela 4). Esses resultados mostram que o grupamento não interfere positivamente na estrutura do composto, ou seja, além de ser o possível grupamento responsável por aumentar a toxicidade, este também não interfere na melhora significativa da atividade leishmanicida.

Com base nos resultados de índice de seletividade (Tabela 5), o composto 2-tionaimidazolina poderia ser questionável quanto a sua escolha para a realização do teste *in vivo* devido ao fato de não ser o composto mais ativo contra as formas do parasito, mas apresentou menor toxicidade em relação aos demais, além de apresentar seu SI considerado satisfatório (PEREIRA et al., 2010).

Para investigar um possível mecanismo pelo qual estes compostos poderiam estar exercendo sua atividade leishmanicida, foram realizados testes de inibição de atividade enzimática de proteases. No caso do gênero *Leishmania*, as proteases melhor estudadas são as

CPA e CPB, que são enzimas do tipo catepsina L, segundo Robertson e Coombs (1990) e CPC, que é uma enzima do tipo catepsina B (BART et al., 1995). Cisteíno proteases (CPs) são assim denominadas devido à função de uma cisteína catalítica, a qual medeia a hidrólise protéica (PANDEY, 2011). As enzimas do tipo CPB são encontradas nos megassomos (lisossomos largos), nos vacúolos parasitóforos e extracelularmente nas lesões, dando a estas enzimas a oportunidade de interagirem com proteínas do hospedeiro (ILG et al., 1994). Com a obtenção de linhagens de *Leishmania* mutantes que são deficientes dos genes que codificam a CPA, CPB e CPC, foi possível estudar a importância dessas enzimas na interação parasito-hospedeiro. Revelando que estas CPs são pouco expressas nas formas procíclicas, expressas nas formas metacíclicas e principalmente nas formas amastigotas do parasita. Elas são importantes fatores de virulência que modulam a resposta imune do hospedeiro e parecem possuir um papel vital na diferenciação, multiplicação e sobrevivência do parasita nos macrófagos (MOTTRAM et al., 2004).

Os resultados na Tabela 6 indicam os valores de  $IC_{50}$  para os compostos organometálicos na inibição da isoforma r-CPB 2.8 de *L. (L.) mexicana*, evidenciando o potencial do composto JB5 como inibidor da protease ( $IC_{50} = 0,125 \mu M$ ).

Apesar dos compostos não apresentarem potente atividade frente à cisteína protease (CPB 2.8), quando comparado com o padrão E64, pode-se especular que este não seria o principal mecanismo de ação apresentado por estes compostos frente às formas deste parasito.

A inibição de sesteiam protease prejudica o shift que a *leishmania* causa direcionando para a resposta imune anti-inflamatória (Th2), podendo ter relação na ativação da via Th1 (resposta pró-inflamatória) e produção de NO.

Os macrófagos constituem o principal tipo celular que é infectado por *Leishmania*, a sua função é essencial para o desfecho da infecção no hospedeiro, pois os parasitas vivem e se proliferam nos macrófagos. Estas células são especializadas na fagocitose e têm um importante papel na detecção e eliminação dos micro-organismos patogênicos (MOSSER D.M E EDWARDS JP, 2008; STOUT R.D E SUTLLES J, 2004). Os macrófagos produzem óxido nítrico (NO), principal mediador citotóxico e citostático contra patógenos intracelulares (DUSSE et al., 2003; QUEIROZ S.L E BATISTA A.A, 1999).

O óxido nítrico tem um papel importante na defesa contra microorganismos além, de exercer uma regulação bifásica sobre os osteoclastos, estimulando-os quando presentes em baixas concentrações, e inibindo-os quando em grandes quantidades, segundo Ralson e

colaboradores (1995), além de ter um papel crucial na morte do protozoário *Leishmania* por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$  (HORTA, 2012).

Macrófagos ativados adquirem atividade microbicida devido a indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e a geração de óxido nítrico, a principal molécula efetora para destruição, completa ou parcial, de patógenos intracelulares, como é o caso da *Leishmania* (KROPF, MULLER & BRUNSON, 2002).

O lipopolissacarídeo de micro-organismos é descrito por ativar monócitos (COLONNA; FACCHETTI, 2003). Sendo assim, esta substância em contato com macrófagos induz efetivamente a produção de NO por essas células (SUZUKI et al., 2012). Nesse sentido a utilização do LPS como controle positivo nos ensaios de dosagem de NO nos permite avaliar seguramente a produção dessa molécula efetora em macrófagos tratados com o composto em estudo (JB5SF).

Nesse trabalho verificou-se que o tratamento com o composto JB5SF promoveu um pequeno aumento na produção de NO pelos macrófagos infectados e na concentração de 10  $\mu\text{g/mL}$ , quando co-estimulado com LPS, apresentando diferença estatística em relação à produção de NO pelos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*. Embora não tenha sido definido o mecanismo de ação do composto sobre o parasito pode-se inferir que o mesmo pode contribuir com a resposta imune.

Dado o potencial promissor do composto JB5SF os estudos do mecanismo de ação foram realizados com este composto, afm de complementar estudos que estão sendo conduzidos no Laboratório de Biologia Molecular de Micro-organismos da UNIFAL-MG e para confirmar o potencial desta molécula na descoberta de um novo hit no processo *hit to lead* no desenvolvimento de fármacos.

Avaliando a figura 12, apresentada por *Leishmania* tratada ou não com o composto JB5SF, na concentração 5  $\mu\text{g/mL}$  em afm, observa-se que não existe diferenças entre as situações (A) e (B), não havendo diferença em suas áreas de superfície. A figura 13, apresentada por macrófagos em microscopia de força atômica, observa-se modificações entre as situações (A- macrófago; B- macrófago infectado; C- macrófago infectado e tratado com JB5SF), onde se mostrou diferenças nas áreas de superfície, porém estas não apresentaram diferenças estatísticas. Todavia, precisa-se de mais estudos pra confirmação sobre a sua ação na membrana do parasito.

A ação dos compostos metálicos sobre o DNA foi descoberta na década de 60, quando Lerman descobriu que tinturas de acridina eram capazes de se ligar aos ácidos nucleicos

devido sua inserção entre os pares de base de polinucleotídeos por interações não covalentes (LERMAN,1961; BIVER, SECCO, VENTURINI, 2008). Este processo foi chamado de intercalação, que demonstrou a capacidade de alterar profundamente a estrutura secundária do nucleotídeo (BIVER, SECCO, VENTURINI, 2008).

Existem evidências sobre os danos causados pela a ação de metais sobre o DNA, as quais são relatadas a partir de vários estudos, como a atividade anticâncer citada por Gastaldo e colaboradores (2008). Todavia, mesmo tendo ação comprovada sobre os ácidos nucléicos, poucos metais (transição) foram testados (LIU et al., 2007). Bruijninx e Sadler (2008), ressaltam a importância dos compostos organometálicos para o campo da medicina através da pesquisa de novas interações com o DNA e como já foi descrito por Navarro e colaboradores (2006), as interações com o DNA seriam uma das possíveis interferências destes compostos no crescimento de protozoários (BRUIJNINX; SADLER, 2008; NAVARRO et al., 2006).

Navarro e colaboradores (2003) testaram a atividade leishmanicida de complexos de cobre sobre formas promastigotas de *L. (L.) braziliensis* comprovando sua interação com o DNA do parasita. Além disso, também já foi descrita a atividade do ouro sobre culturas de promastigotas de *L.(L.) mexicana* e interação sobre o DNA por intercalação. Raychaudhury e colaboradores (2005) também demonstraram atividade de complexos com estanho sobre *L. (L.) donovani*.

Sendo assim, baseado nos relatos supracitados avaliou-se o potencial do composto JB5SF estar interagindo com DNA. Porém, os resultados mostram que o JB5SF não causou degradação do DNA.

Os compostos 2-tionaimidazolina e JB5SF foram testados *in vivo*, devido à baixa toxicidade e melhor SI, respectivamente. Para este ensaio estudou-se o modelo visceral devido ao impacto causado pela doença.

Diante o ensaio, as vias de administração utilizadas nos nossos modelos experimentais foram via oral, para administrar o composto teste 2-tionaimidazolina e JB5SF, esta é uma via que possui vantagens, pois é segura, conveniente e econômico e, atualmente dentre os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose somente a Miltefosina é administrada por via oral. Para administrar o fármaco de referência Glucantime foi escolhida a via intraperitoneal. Tendo em vista que a via intraperitoneal pode levar a uma disponibilidade mais rápida, ampla e previsível que quando o fármaco é administrado por via oral (WILKINSON, 2005).

De modo geral, a PCR em tempo real é uma metodologia sensível, específica e reprodutível para detecção e quantificação de DNA e RNA. Comparando este método ao PCR convencional, nota-se que a PCR em tempo real dispõe de uma ampla faixa de detecção, possibilitando a detecção de quantidades mínimas ou altas quantidades de moléculas na amostra analisada (CDG, 2015). Além disto, esta tem sido usada como instrumento para avaliar a atividade de compostos antiparasitários no contexto *in vivo* (REIMÃO et al., 2013). Parâmetros como reprodutibilidade, confiabilidade e sensibilidade têm sido atribuídos a esta metodologia (REIMÃO et al., 2011).

Neste ensaio, a eficiência dos compostos 2-tionaimidazolina e JB5SF foram avaliadas após dez dias de tratamento usando a dosagem de 50 mg/kg/dia e 25 mg/Kg/dia, respectivamente, em suspensão por via oral e comparados com o grupo controle Glucantime. O tratamento iniciou sessenta dias após a inoculação, permitindo o estabelecimento da infecção. Ao final do tratamento observou-se que o Glucantime apresentou uma redução da carga parasitária, tanto no fígado quanto no baço, por grama de órgão. O composto 2-tionaimidazolina não se mostrou eficaz no tratamento *in vivo*. O grupo 2-tionaimidazolina teve média de  $1,59 \times 10^7$  no baço, e de  $8,92 \times 10^6$  no fígado, enquanto que o grupo tratado com Glucantime obteve médias de  $4,13 \times 10^4$  e de  $3,71 \times 10^3$ , no baço e no fígado, respectivamente. Foram utilizados a mesma dose em ambos tratamentos (50 mg/kg/dia), porém por vias diferentes, onde o Glucantime foi tratado por via intraperitoneal e o 2-tionaimidazolina, por via oral. Isso pode ter contribuído para as diferenças entre os resultados obtidos entre a droga teste 2-tionaimidazolina (2-tiona) e o glucantime (GLU). Analisando a eficiência do composto JB5SF, assim como o Glucantime, observou-se que estes apresentaram uma redução da carga parasitária, tanto no fígado quanto no baço, quando comparados com o grupo não tratado e destacando a redução da carga parasitária no baço a qual apresentaram estatísticas semelhantes entre si. Fazendo uma correlação entre os compostos em questão, podemos concluir que a inserção da prata e do contra íon nitrato na estrutura química do composto potencializou a atividade leishmanicida, acreditando-se que o composto JB5SF possa ser um potencial fármaco para o tratamento da leishmaniose.

## 8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que os compostos orgânicos que contém prata em sua estrutura e o ligante quelante 2-tionaimidazolina estudados apresentaram interessantes atividades contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum chagasi*, no contexto *in vitro*. Já no contexto *in vivo* podemos concluir que a inserção da prata e do contra íon nitrato na estrutura do composto em questão potencializou sua atividade leishmanicida, sendo capaz de reduzir a carga parasitária, apresentando estatística semelhante ao fármaco de referência, Glucantime, mostrando-se que o composto JB5SF possa ser um potencial fármaco para o tratamento da leishmaniose.

Os compostos não apresentaram atividade adequada frente à cisteíno proteases (CPB 2.8) e não apresentaram degradação no DNA. Especificamente o JB5SF na concentração de 5 µg/mL não modificou a membrana do protozoário, mas alterou a área de superfície do macrófago, porém essas alterações não foram estatisticamente diferentes. Todavia, o JB5SF na concentração de 10 µg/mL e associado ao LPS levou o macrófago infectado a uma maior produção de NO quando comparado ao não tratado. Embora não tenha sido definido o mecanismo de ação do composto sobre o parasito pode-se inferir que o mesmo pode contribuir com a resposta imune estimulando as células macrofágicas no processo de fagocitose.

## 10 PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Avaliar a degradação do DNA em quantidade maior de material;
- b) Requantificar os níveis de NO produzidos em sobrenadantes de cultura de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* e em contato com o composto testado, fazendo relação entre a quantidade de NO por número de macrófagos por poço.

## REFERÊNCIAS

- AAGAARD-HANSEN, J.; NOMBELA, N.; ALVAR, J. Population movement: a key factor in the epidemiology of neglected tropical diseases. **Trop Med Int Health**, v. 15, p. 1281–1288, 2010.
- ALEXANDER, J. W. History of the medical use of silver. **Surgical Infections**, v. 10, p. 289–292, 2009.
- ALMEIDA, G. G. Complexo anfifílico de antimônio: atividade leishmanicida *in vitro* e eficácia de uma formulação tópica em modelo murino de leishmaniose cutânea. Universidade Federal do Paraná, [s.d.], 2012.
- ALVAREZ, V., NIEMIROWICZ, G., CAZZULO, J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors and mediators of autophagy and programmed cell death. **Acta Biochem. Biophys.**, v. 1824, p. 195–206, 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, p. 699–705, 2010.
- ANDRADE, J. M. et al, Silver and Nitrate Oppositely Modulate Antimony Susceptibility through Aquaglyceroporin in *Leishmania (Viannia)* Species. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, p. 4482–9, 2016.
- APARÍCIO, I. M. et al. A New Cruzipain-Mediated Pathway of Human Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi* Requires Trypomastigote Membranes. **Infection and Immunity**, v.72, p. 5892–5902, 2004.
- ASSIS, D. M. et al. Inhibition of cysteine proteases by natural biflavone: behavioral of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **J. Enz. Inhib. Med. Chem**, v. 28, p. 661–670, 2012.
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune Response to *Leishmania* Infection. **Indian Journal of Medical Research**, v. 119, p. 238–258, 2004.
- BAIOCCO, P. et al. Inhibitory effect of silver nanoparticles on trypanothione reductase activity and *Leishmania infantum* proliferation. **Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, p. 230–233, 2011.
- BARREIRO, E. et al. Heteronuclear gold(i)–silver(i) sulfanylcarboxylates: synthesis, structure and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 131, p. 68–75, 2014.
- BART, C.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Isolation of *lmcpc*, a gene encoding a *Leishmania mexicana* cathepsin-B-like cysteine proteinase. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.73, n.12, p.271–274, 1995.

BERN, C. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. v. 7, n. 5, 2012.

BENITE, A.M.C., MACHADO, S. P., BARREIRO E. J. Uma visao da Quimica Bioinorganica Medicinal. **Quimica Nova**, v. 30, p. 2062-2067, 2007.

BENJAMIN, N.; WALLANCE, P. Plasma Nitric as a Marker of Nitric Oxide Production. **Lancet**. v. 344, p. 960, 1994.

BIVER, T.; SECCO, F., VENTURINI, M. Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**. V. 252, p. 1163–1177, 2008.

BOER, M. D.; ARGAW, D. JANNIN, J.; ALVAR, J. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, p. 1471-1477, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasilia: Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Disponível em: <[http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_vigilancia\\_leishmaniose\\_tegumentar\\_americana.pdf](http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf)>. Acesso em: 24 out. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_leish\\_visceral2006.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_leish_visceral2006.pdf). Acesso em: 13 fev. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília; 2010.

CALOGEROPOULOU, T.; ANGELOU, P.; DETSI, A.; FRAGIADAKI, I.; SCOULICA, E. **Journal Of Medicinal Chemistry**. v. 51, p. 897-908, 2008.

CAMARGO-NEVES, V. L. F. et al. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do Estado de São Paulo**. p. 158, 2006.

CHRUSCIAK-TALHARI A. et al. Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. v. 84, p. 255–260, 2011.

COLOMBO F.A. et al. Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. **Parasitol Res**. v. 109, p. 267-74, 2011.

COLOMBO, F. A. et al. This article evaluated the molecular diagnosis of the leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, 2015.

COYLE B., KINSELLA P., McCANN M., DEVEREUX M., O'CONNOR R., CLYNES M., KAVANAGH K., **Toxicol. In Vitro**, v. 18, p. 63, 2004.

CRAFFREY C.R., SCORY S., STEVERDING D. Cysteine proteinases of trypanosome parasites: novel targets for chemotherapy, **Curr. Drug Targets**, p.155-162, 2000.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy – challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1478-1483, 2011.

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

DA LUZ, J. S. B. et al. Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* Promastigotes Forms Treated *In Vitro* with Usnic Acid. **The Scientific World Journal**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1471–1477, 2011.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectiva no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, F.O.P.; LOROSA, E.S.; REBELO, J.M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.5, p.1373-1380, 2003.

DORLO TPC, BALASEGARAM M, BEIJNEN J AND DE VRIES PJ. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

DUSSE LM, VIEIRA LM, Carvalho MG. Revisão sobre óxido nítrico/Nitric oxide revision. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 39, p. 343-350, 2003.

EVANS TG, TEIXEIRA MJ, MCAULIFFE IT et al. Epidemiology of visceral leishmaniasis in Northeast Brazilian. **J. Inf. Dis.** v. 166, p. 1124-1132, 1992.

ESPARTA, I. N. et al. Canine visceral leishmaniasis on Margarita. p. 484–487, 2000.

ENGWERDA CR, ATO M, KAYE PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. **Trends Parasitol.** v. 20, p. 524–530, 2004.

FARRELL, N. Metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. **Comprehensive Coordination Chemistry II**, v. 9, p. 809-840, 2004.

FERNÁNDEZ, O. L. et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2871, 2014.

FIDALGO, L.M.; GILLE, J. Mitochondria and trypanosomatids: targeted and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 2770, 2011.

FOURNET, A.; MUNHOZ, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 2, p. 1215–1237, 2002.

FRANCO LP, CICILLINI SA, BIAZZOTTO JC, SCHIAVON A, MIKHAILOVSKY A, BURKS P, GARCIA J, FORD PC, DA SILVA RS. Photoreactivity of a quantum dot-ruthenium nitrosyl conjugate. **J Phys Chem A.**, v. 118, p. 12184-91, 2014.

FREITAS, E. O. et al. Immucillins Impair *Leishmania (L.) infantum chagasi* and *Leishmania (L.) amazonensis* Multiplication In Vitro. **PLoS one**, v. 10, n. 4, p. 0124183, 2015.

GRIENSVEN, J.; BALASEGARAM, M.; MEHEUS, F.; ALVAR, J.; LYNEN, L.; BOELAERT, M. **The Lancet Infectious Disease**. v. 10, p. 184-194, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analyses of Nitrate, Nitrite and [15N]Nitrate in Biological Fluids. **Anal. Biochem.**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GROUP, S. W. Scientific Working Group Report of the Scientific Working Group. n. February, 2004.

GONTIJO, V. S. Planejamento e semissíntese de novos análogos da Fukugetina com potencial atividade antileishmania, antioxidante e antiproteolítica, Alfenas-MG, Potencial atividade antileishmania, antioxidante e antiproteolítica, Alfenas-MG, n. 35, p. 0–179, 2011.

GUO, Z.; SADLER, P. J. **Metals in medicine**. Angewandte Chemie International Edition, v. 38, p. 1512-1531, 1999.

HADRUP, N.; LAM, H. R. Oral toxicity of silver ions, silver nanoparticles and colloidal silver – a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 68, p. 1-7, 2014.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Mol Biol Int.**, 2011():571242, 2011

HANDMAN E, BULLEN DV. *Interaction of Leishmania with the host macrophage*. **Trends Parasitol.**, v. 18, 332-4, 2002.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 25, p. 363-370, 2000.

HORTA, M. F. et al. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

HOTEZ, et al. **New Eng. J. Med.** n. 357, p. 1018, 2007.

ILG, T. et al. Distribution of parasite cysteine proteinases in lesions of mice infected with *Leishmania mexicana* amastigotes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 67, p. 193-203, 1994.

INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA AMARAL E. E. In vitro and in vivo effects of epigallocatechin 3-gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**. v. 76, p. 1993–1996, 2013.

JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1896-1904, 2013.

JESUS, J. A. D. E. Universidade federal de são paulo. 2015.

JULIANO J.C., MOTRAM G.H., COOMBS. Expression and characterization of a recombinant cysteine proteinase of *Leishmania mexicana*, **Biochem. J.** 347, 383 e 388, 2000.

JUNG, W. K.; KOO, H. C.; KIM, K. W.; SHIN, S.; KIM, S. H.; PARK, Y. H. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 2171-2178, 2008.

KAYE; SCOTT. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.** 2011.

KHADEM, F.; UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future microbiology**, v. 9, p. 901–15, 2014.

KAPPAGODA, S.; IOANNIDIS, J.P.A. Neglected tropical diseases: survey and geometry of randomised evidence. **BMJ**, p. 345, 2012.

KLASEN, H. J. A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. **Burns**, v. 26, p. 131-138, 2000.

LANSDOWN, A. B. G. Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. **Current Problems in Dermatology**, v. 33, p. 17-34, 2006.

LERMAN, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. **Journal Molecular Biology**, London, v. 3, p. 18-30, 1961.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and Computacional Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. **Advanced Drug Discovery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LUQUE-ORTEGA, J. R. et al. New Benzophenone-Derived Bisphosphonium Salts as Leishmanicidal Leads Targeting Mitochondria through Inhibition of Respiratory Complex II. **J. Med. Chem.**, v. 53, p. 1788–1798, 2010.

MACMICKING, John; XIE, Qiao-Wen; NATHAN, Carl. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-350, 1997.

MACHADO PR, AMPUERO J, GUIMARÃES LH, VILLASBOAS L, ROCHA AT, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, p. 912, 2010.

MALTEZOU, H.C.J. Review Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Biomed Biotechnol.** v. 61, p. 7521, 2010.

MANUAL de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, p. 120, 2006.

MARQUELE-OLIVEIRA, F. et al., Physicochemical characterization by AFM, FT-IR and DSC and biological assays of a promising anti-*leishmania* delivery system loaded with a natural Brazilian product, **J. Pharm. Biomed. Anal.**; 2016.

McCANN M., GERAGHTY M., DEVEREUX M., O'SHEA D., MASON J., O'SULLIVAN L., **Metal Based Drugs**, v. 7, p. 185, 2000.

McDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 147-179, 1999.

MCKERROW, J., CAFFREY, C., KELLY, B., LOKE, P., SAJID, M. Proteases in parasitic diseases Annu. **Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 1, p. 497–536, 2006.

MCGWIRE BS, SATOSKAR AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM.**, v. 107, p. 7–14, 2013

MICHELS, P. A.; AVILÁN, L. The NAD<sup>+</sup> Metabolism of *Leishmania*, Notably the Enzyme Nicotinamidase Involved in NAD<sup>+</sup> Salvage, Offers Prospects for Development of Anti-Parasite Chemotherapy. **Molecular Microbiology**, v. 82, p. 4–8, 2011.

MONDAL, D.; KAMHAWI, S. host – vector – parasite interface *Leishmania* vaccine development : exploiting the host – vector – parasite interface. v. 0584, 2016.

MONTEIRO P.S. Leishmaniose visceral no Brasil: perspectivas de controle. **Soc Bras Med Trop.**, v. 35, p. 335, 2002.

MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 375-381, 1997.

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell Biology and Immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, v. 240, p. 286–296, 2011.

MOSSER DM, EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.**, v. 8, p. 958-69, 2008.

MUKHERJEE S, et al. Decreased presence of Langerhans cells is a critical determinant for Indian Post kala-azar dermal leishmaniasis. **ExpDermatol.**, v. 24, p. 232-4, 2015.

NADERER T; MACOVILLE MJ. *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol.**, v. 10, p. 301-08, 2008.

NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: a review. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1464-1488, 2011.

NAVARRO, M. et al. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 8, p. 401–408, 2003.

NAVARRO M., CISNEROS-FAJARDO E.J., MARCHAN E., *Arzneimittelforschung* 56, 600, 2006.

NAVARRO et al. Synthesis and characterization of [Au(dppz)<sub>2</sub>]Cl<sub>3</sub>.DNA interaction studies and biological activity against *Leishmania (L) Mexicana*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 111–116, 2008.

WILKINSON, G.R. Farmacocinética: Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: GOODMAN, L.S; GILMAN, A. (eds.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro, McGraw Hill, 2005.

OMS. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. Weekly **Epidemiological Records**, v. 77, p. 365–372, 2002.

OMS. Leishmaniasis: background information. Geneva: WHO, 2010. Leishmaniasis, Magnitude of the problem. Disponível em: <[http://www.who.int/Leishmaniasis/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/Leishmaniasis/burden_magnitude/en/index.html)> Acesso em 4 de janeiro de 2016.

OMS. Leishmaniasis. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, accessed Jan 2017.

OSTAD, M. et al. Control of Cutaneous Leishmaniasis Using Geographic Information Systems from 2010 to 2014 in Khuzestan Province , **Iran**. p. 1–7, 2016.

PAGLIUCA, L. M. F.; FIALHO, A. V. M.; SIMAS, V. A.; SILVA, R. P. M. Prophylaxis chemical agents of neonative ophthalmia – exploratory study. *Cogitare Enferm.*, Curitiba, v. 2, n. 1, p. 18-20, 1997.

PANDEY, K. C. Centenary Celebrations Article: Cysteine Proteases of Human Malaria Parasites. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 35, n. 2, p. 94-103, 2011.

PANDEY K.; PUN S.B.; PANDEY B.D. Review Relapse of kala-azar after use of multiple drugs: a case report and brief review of literature. **Indian J Med Microbiol.**, v. 30, p. 227-9, 2012.

PAUL J, et al. TLR mediated GSK3 $\beta$  activation suppresses CREB mediated IL-10 production to induce a protective immune response against murine visceral leishmaniasis. *Biochimie.*, v. 107, p. 235-46, 2014.

PERCIVAL, S. L.; BOWLER, P. G.; RUSSELL, D. Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, v. 60, p. 1-7, 2005.

PEREIRA, G. R.; SANTOS, L. J.; LUDUVICO, I.; ALVES, R. B.; FREITAS, R. P. *Tetrahedron Letters*, v. 51, p. 1022-1025, 2010.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. *Phytomedicine*, v. 17, p. 339-45, 2011.

PURKAIT B, KUMAR A, NANDI N, SARDAR AH, DAS S, KUMAR S, PANDEY K, RAVIDAS V, KUMAR M, DE T, SINGH D, DAS P Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, p. 1031-41, 2012.

QUEIROZ SL, BATISTA AA. Biological functions of nitric oxide. *Quim Nova*, v. 22, p. 584-90, 1999.

RAYCHAUDHURY, B. et al. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*, v. 95, p. 1-8, 2005.

RALSTON, S. H. et al. Nitric oxide: a cytokine-induced regulator of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 10, p. 1040-1049, 1995.

RANGEL, O., HIRAMOTO, R. M., HENRIQUES, L. F., TANIGUCHI, H. H., CIARAVOLO, R. M. C., TOLEZANO, J. E., et al. Epidemiological classification of cities according to the Program of Surveillance and Control of American visceral leishmaniasis in the state of São Paulo, updated in. *Bol.*, 2013

RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRET, A.J. MEROPS: the peptidases database. *Nucleic Acids Res.*, v. 34, p. 270–272, 2006

REBELLO, K. M. et al. Cysteine proteinases from promastigotas of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasitology Research*, v. 106, p. 95-104, 2009.

REIMÃO, J.Q. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Exp. Parasitol.*, v. 130, p. 195-199, 2012.

REIMÃO, J.Q. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Experimental Parasitology.*, v. 128, p. 111–115, 2011.

REIS, L.E. Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: a comparative study of three methods using skin and spleen from dogs with natural *Leishmania infantum* infection. *Rev. Parasitol.*, v. 197, p. 498-503, 2013.

ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Characterisation of three groups of cysteine proteinases in the amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 269-276, 1990.

RONCONI L., SADLER P.J., **Coord. Chem. Rev.**, v. 251, p. 1633, 2007.

RUSSELL, A. D.; HUGO, W. B. Antimicrobial activity and action of silver. **Progress in Medicinal Chemistry**, v. 31, p. 351-370, 1994.

SADIJ, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine Proteases of Parasitic Organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, p. 1-21, 2002.

SANTOS, A. L. S. Protease expression by Microorganisms and its Relevance to Crucial Physiological/Pathological Events. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 2, n. 3, p. 48-58, 2011.

SEGURA, D. F. Síntese, caracterização e estudo de atividade biológica de complexos de prata(I) contendo ligantes baseados na 1,10-fenantrolina e tiouréia. 2014. 137f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

SEGURA, D. F. et al. Synthesis and biological evaluation of ternary silver compounds bearing N,N-chelating ligands and thiourea: X-ray structure of [ $\{Ag(bpy)(\mu-tu)\}_2\}(NO_3)_2$  (bpy = 2,2'-bipyridine; Tu = thiourea). **Polyhedron**, v. 79, p. 197–206, 2014.

SHAHEEN et al. Synthesis, characterization, in vitro cytotoxicity and anti-inflammatory activity of palladium(II) complexes with tertiary phosphines and heterocyclic thiolates: Crystal structure of [PdC<sub>28</sub>H<sub>19</sub>N<sub>8</sub>PS<sub>2</sub>]. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 693, p. 1117–1126, 2008.

SHUKLA, A. K. et al. Rational Approaches for Drugs Designing Against Leishmaniasis. **Applied Biochemistry Biotechnology**, DOI 10.1007/s12010-009-8764, 2009.

SILVA, V. et al. Leishmanicidal, antiproteolytic, and mutagenic evaluation of alkyltriazoles and alkylphosphocholines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 101, p. 24–33, 2015.

SILVA-LÓPEZ, R. E. Proteases de *Leishmania*: Novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, 2010.

SINGH B AND SUNDAR S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. **Vaccine**, v. 30, p. 3834-3842, 2012.

SINGH, N. Review Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian J Med Res.**, v. 123, p. 411-22, 2006

SOTO J, ARANA B. A., TOLEDO J., RIZZO N., VEJA J. C., et al. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clin Infect Dis.**, v. 38, p. 1266–1272, 2004.

SOTO J, REA J, BALDERRAMA M, TOLEDO J, SOTO P, et al. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 78, p. 210–211, 2008.

SOUZA, G. F. et al. Leishmanicidal activity of primary s-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. **Nitric Oxid**, v. 15, n. 3, p. 209-216. 2006.

STOUT RD, SUTTLES J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. **J Leukoc Biol.**, v. 76, p. 509-13, 2004.

PONTE-SUCRE A, VICIK R, SCHULTHEIS M, SCHIRMEISTER T, MOLL H. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 2439-47, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. [s.l.:s.n.]. p. 931-957, 1989.

SUNDAR S, JHA TK, THAKUR CP, BHATTACHARVA SK AND RAI M. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **N Engl J Med**, v. 347, p. 1739-1746, 2002.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health.**, v. 6, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S.; GUPTA, L.B.; RASTOGU, V., AGRAWAL, G., MURRAY, H.W. Trans R Short-course, cost-effective treatment with amphotericin B-fat emulsion cures visceral leishmaniasis. **Soc Trop Med Hyg.**, v. 94, p. 200-4, 2000.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FARLAMB, A.; GURTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. **The Journal Of Clinical Investigation.** v. 118, p. 1301, 2008.

SUZUKI, Takahiro et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 31, p. 488-493, 2002.

TAVARES, L. C.; FERREIRA E. I. Relações Quantitativas Estrutura-Atividade: Fundamentos e Aplicação da Análise de Hansch, 2006. Disponível em: <[http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry/Practica-II-1.pdf](http://old.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry/Practica-II-1.pdf)> Acesso em: maio/2017.

TEIXEIRA, D. E., et al. *Atlas didático: ciclo de vida da Leishmania*. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2013.

TEMPONE, A. G.; OLIVEIRA, C. M.; BERLINCK, R. G. S. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Med.**, v. 77, p. 572-585, 2011.

THURMANN, R. B.; GERBA, C. P. The molecular mechanisms of copper and silver on disinfection of bacteria and viruses. **Critical Reviews in Environmental Control**, v. 18, p. 295- 315, 1989.

TOQEER M, RAHMAN N, WHITEHEAD MW, LOCKWOOD D. Visceral leishmaniasis in immunosuppressed Caucasian patient. **BMJ Case Rep.** 2012, pii: bcr1120115199, 2012.

UYGUN, D.A., AKDUMAN, B., UYGUN, M., AKGOL, S., DENIZLI, A. Purification of papain using reactive green 5 attached supermacroporous monolithic cryogel Appl. **Biochem. Biotechnol.**, v. 167, p. 552–563, 2012.

VAN JG, CARRILLO E, LOPEZ-VELEZ R, LYNEN L, MORENO J. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. **Clin. Microbiol. Infect.** V. 20, p. 286–299, 2014.

VELEZ I, LOPEZ L., SANCHEZ X., MESTRA L., ROJAS C., et al. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 83, p. 351–356, 2010.

VALADARES, D. G. et al., Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitol Int.**, v. 60, p. 357-63, 2011.

YILMAZ, V. T.; GOCMEN, E.; ICSEL, C.; CENGIZ, M.; SUSLUER, S. Y.; BUYUKGUNGOR, O. Synthesis, crystal structures, *in vitro* DNA binding, antibacterial and cytotoxic activities of new di- and polynuclear silver(I) saccharinate complexes with tertiary monophosphanes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 131, p. 31-42, 2014.

KROPF, P., BRUNSON, K., ETGES, R. & MULLER, I. The leishmaniasis model. In: Immunology of Infection, Series: Methods in Microbiology. **Academic Press**, v. 25, p. 463-491, 1998.