

Viviane de Melo Mendes

**Estudo de alterações celulares e moleculares em  
*Leishmania (Leishmania) infantum* tratada com  
fármacos anti-histamínicos**

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

**Área de concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Samanta Etel Treiger Borborema

**SÃO PAULO**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Mendes, Viviane de Melo.

Estudo de alterações celulares e moleculares em *Leishmania (Leishmania) infantum* tratada com fármacos anti-histamínicos / Viviane de Melo Mendes. – 2019.

Dissertação (Mestrado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Pesquisa laboratorial em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Samanta Etel Treiger Borborema

1. Leishmaniose visceral/terapia. 2. Reposicionamento de medicamentos/utilização. 3. Espectrometria de fluorescência/métodos. 4. Microscopia eletrônica/métodos. 5. Expressão gênica/efeito dos fármacos. 6. Antagonistas dos receptores histamínicos/ farmacologia.

SES/CCD/CD-391/2019

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada mãe Conceição Maria de Melo Mendes, por sempre estar ao meu lado com sua incansável dedicação e confiança, aos meus irmãos Aline e Fábio pelo companheirismo e amizade, aos meus lindos sobrinhos Vinícius e João Lucca, ao meu marido Denilton pela motivação e compreensão e *in memoriam* de meu querido pai João Mendes por todos os caminhos que em vida me ajudou a percorrer com suas inesquecíveis palavras de carinho.

## **AGRADECIMENTO**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar o caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha mãe pelo carinho, amor, paciência, incentivo e compreensão ao longo desses anos.

Aos meus irmãos Aline e Fábio pelo companheirismo, confiança e incentivo.

Ao meu marido Denilton, pela paciência e incentivo, principalmente nos últimos meses.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Samanta Etel Treiger Borborema, agradeço pelas conversas construtivas que tivemos e pelo conhecimento no desenvolvimento desta dissertação de mestrado, além da oportunidade, confiança e compreensão nos obstáculos que encontramos ao longo desse trabalho.

Ao pesquisador Prof<sup>o</sup> Dr André Gustavo Tempone Cardoso pelos conselhos, incentivos e ensinamentos recebidos por esse que é, sem dúvida, um exemplo de conduta e postura profissional.

Ao pesquisador Prof<sup>o</sup> Dr Humberto Gomes Ferraz da Faculdade de Ciências Farmacêutica da Universidade de São Paulo que gentilmente doou os fármacos anti-histamínicos usados neste estudo.

À pesquisadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Lucia Pereira Chioccola pela solicitude com a qual sempre me tratou.

À pesquisadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Noemi Taniwaki do Instituto Adolfo Lutz pela análise de microscopia eletrônica.

Aos técnicos de laboratório Matília e Vicente pela assistência e ajuda laboratorial prestada.

Aos meus amigos do Laboratório de Novos Fármacos para Doenças Negligenciadas Juliana Tonini, Thaís, Daiane, Maiaras, Raquel e Fábio, além dos amigos dos laboratórios vizinhos Márcia, Fátima, Eleane, Helena, Leyva, Flavia, Cida, Cristina, Gabriela, Marta, Allecinéia, Ingrid e Ricardo, pelo aprendizado, paciência e momentos compartilhados.

Aos funcionários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz pela convivência.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade.

À banca de qualificação: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vera Lucia Pereira Chioccola, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Thais Alves da Costa Silva e Prof<sup>o</sup> Dr. Luiz Felipe Domingues Passero.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

Ao apoio financeiro da CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Enfim sou grata a todos que direta e indiretamente ajudaram e fizeram parte desta realização. Muito obrigada!

## RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica, causada pelos parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica em países tropicais e subtropicais. Por acometer principalmente populações de baixa renda em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos, a leishmaniose se encaixa no perfil das doenças negligenciadas, em razão de seu baixo retorno financeiro para a indústria farmacêutica. Devido ao alto custo, restrições e efeitos colaterais dos atuais fármacos utilizados na terapêutica da leishmaniose, há a real necessidade de identificar e desenvolver novas alternativas como a de reposicionamento de fármacos, que se trata de uma nova indicação terapêutica para um fármaco já disponibilizado no mercado. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antileishmania de fármacos anti-histamínicos e identificar marcadores celulares e moleculares relacionados à resposta terapêutica, usando um sistema de infecção *in vitro*. Foram realizados em *Leishmania (Leishmania) infantum*: i) a triagem de quatro fármacos anti-histamínicos, sendo eles: cetirizina (CTZ), ciproheptadina (CPH), fexofenadina (FXF) e meclizina (MCZ); ii) o estudo das alterações celulares e moleculares com o fármaco cinarizina (CNZ) e os que apresentaram atividade contra a forma amastigota. Para isto, foi feito estudos de concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em promastigota e amastigota de *L. (L.) infantum*, concentração citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) em células de mamífero e após foram analisadas a permeabilidade de membrana plasmática, o potencial de membrana mitocondrial, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a produção de tióis por meio de ensaios fluorimétricos e as ultra-estruturas celulares por microscopia eletrônica de transmissão e o perfil de expressão gênica por qPCR. Os resultados mostraram que CPH e MCZ apresentaram atividade antileishmania contra promastigotas, com CE<sub>50</sub> de 7 e 22 µM, respectivamente. CPH e MCZ eliminaram os amastigotas, com CE<sub>50</sub> de 30 e 35 µM, respectivamente. Os fármacos CTZ e FXF não apresentaram atividade contra ambas as formas do parasito. CNZ, CPH e MCZ provocaram em promastigota: i) alteração na permeabilidade da membrana plasmática; ii) despolarização do potencial de membrana mitocondrial, provocando danos celulares associados com o sistema bioenergético; iii) alteração no perfil de expressão gênica de 11 genes que codificam para diferentes funções celulares. Estes dados, além de apresentarem resultados direto para o tratamento das leishmanioses, com o desenvolvimento de novas alternativas, apresenta um grande potencial como sistema de avaliação de resposta terapêutica de vários tipos de fármacos.

**Palavras-chave:** leishmaniose visceral; reposicionamento de medicamentos; antagonistas dos receptores anti-histamínicos; espectrometria de fluorescência; microscopia eletrônica; expressão gênica.

## ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (LV) is a systemic infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, endemic in tropical and subtropical countries. Leishmaniasis fits the profile of neglected diseases because of its low financial returns to the pharmaceutical industry, as it mainly affects low-income populations in developing and underdeveloped countries. Due to the high cost, restrictions and side effects of the current drugs used in the treatment of leishmaniasis, there is a real need to identify and develop new alternatives such as drug repositioning, which is a new therapeutic indication for a drug already available in the market. Thus, the objective of this study was to evaluate the antileishmanic activity of antihistaminic drugs and to identify cellular and molecular markers related to the therapeutic response using an *in vitro* infection system. *Leishmania (Leishmania) infantum*: i) the screening of four antihistaminic drugs: cetirizine (CTZ), ciproheptadine (CPH), fexofenadine (FXF) and meclizine (MCZ); ii) the study of cellular and molecular alterations with the drug cinnarizine (CNZ) and those that showed activity against the amastigote form. For this, 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) studies were performed on promastigotes and amastigotes of *L. (L.) infantum*, 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) in mammalian cells and after plasma membrane permeability, membrane potential the production of reactive oxygen species (ROS) and the production of thiols by means of fluorimetric assays and the cellular ultrastructures by transmission electron microscopy and the gene expression profile by qPCR. The results showed that CPH and MCZ showed antileishmanic activity against promastigotes, with  $EC_{50}$  of 7 and 22  $\mu$ M, respectively. CPH and MCZ eliminated the amastigotes, with  $EC_{50}$  of 30 and 35  $\mu$ M, respectively. The CTZ and FXF drugs showed no activity against both forms of the parasite. CNZ, CPH and MCZ caused in promastigote: i) alteration in the permeability of the plasma membrane; ii) depolarization of the mitochondrial membrane potential, causing cell damage associated with the bioenergetic system; iii) alteration in the gene expression profile of 11 genes coding for different cellular functions. These data, besides presenting direct results for the treatment of leishmaniasis, with the development of new alternatives, presents a great potential as a system of evaluation of therapeutic response of several types of drugs.

**Keywords:** visceral leishmaniasis; drug repositioning; antihistamine receptor antagonists; fluorescence spectrometry; electron microscopy; gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i> por imagem de microscopia eletrônica de varredura .....18
<b>Figura 2:</b>	Representação esquemática da ultra-estrutura da forma promastigota de <i>Leishmania</i> spp. ....19
<b>Figura 3:</b>	Representação esquemática da ultra-estrutura da forma amastigota de <i>Leishmania</i> spp. ....20
<b>Figura 4:</b>	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp .....23
<b>Figura 5:</b>	Manifestação clínica da leishmaniose cutânea localizada ..... 26
<b>Figura 6:</b>	Manifestação clínica da leishmaniose cutânea difusa em um paciente HIV positivo .....26
<b>Figura 7:</b>	Manifestação clínica da leishmaniose mucocutânea .....26
<b>Figura 8:</b>	Manifestação clínica da leishmaniose visceral .....27
<b>Figura 9:</b>	Manifestação clínica da leishmaniose dérmica pós-calazar .....27
<b>Figura 10:</b>	Status de endemicidade da leishmaniose visceral em todo o mundo em 2016 .....28
<b>Figura 11:</b>	Evolução do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2016 ..... 29
<b>Figura 12:</b>	Estrutura química do Antimoniato de N-metilglucamina .....31
<b>Figura 13:</b>	Estrutura química da anfotericina B .....32
<b>Figura 14:</b>	Estrutura química da miltefosina .....34
<b>Figura 15:</b>	Estrutura química da pentamidina .....34
<b>Figura 16:</b>	Estrutura química da paromomicina .....35
<b>Figura 17:</b>	Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial e indicação da membrana externa, membrana interna, das cristas e da matriz mitocondrial .....45

- Figura 18:** Desenho experimental desenvolvido para avaliar as alterações celulares e moleculares em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com diferentes fármacos anti-histamínicos .....70
- Figura 19:** Atividade antileishmania dos fármacos anti-histamínicos em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*.....74
- Figura 20:** Permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e incubados com SYTOX® Green .....77
- Figura 21:** Permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 90% (CE<sub>90</sub>) e incubados com SYTOX® Green .....78
- Figura 22:** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e incubados com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA .....79
- Figura 23:** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 90% (CE<sub>90</sub>) e incubados com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. ....79
- Figura 24:** Potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>) e incubados com a sonda Rodamina 123 .....80
- Figura 25:** Avaliação do nível intracelular de glutatona em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>) .....81
- Figura 26:** Avaliação do nível intracelular de cisteína em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratadas com fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>) .....82
- Figura 27:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, grupo controle de parasitos não tratados .....83
- Figura 28:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, tratados com cinarizina na CE<sub>90</sub> após 1 hora .....84

<b>Figura 29:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , tratados com cinarizina na CE90 após 2 hora .....	85
<b>Figura 30:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , tratados com cinarizina na CE90 após 4 hora .....	86
<b>Figura 31:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , tratados com cinarizina na CE90 após 6 hora .....	87
<b>Figura 32:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> , tratados com ciproeptadina na CE90 após 30 minutos .....	88
<b>Figura 33:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com ciproeptadina na CE90 após 2 horas .....	89
<b>Figura 34:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com ciproeptadina na CE90 após 4 horas .....	90
<b>Figura 35:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com ciproeptadina na CE90 após 6 horas .....	91
<b>Figura 36:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com meclizina na CE90 após 30 minutos .....	92
<b>Figura 37:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com meclizina na CE90 após 2 horas .....	93
<b>Figura 38:</b>	Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com meclizina na CE90 após 6 horas .....	94
<b>Figura 39:</b>	Análise da pureza e integridade de RNA usando o sistema de eletroforese automatizado (Bioanalyzer 2100). Imagem de um gel virtual gerada pelo programa 2100 Expert .....	96
<b>Figura 40:</b>	Valor médio de estabilidade de expressão (M) dos genes referência obtido pelo programa geNorm .....	103

- Figura 41:** Expressão relativa dos genes alvo MRPA, PAP, CBS, TRYP, CYTB, PGM, ABCF, TCP, LPP, GAPDH e ATUB em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ na CE50 por 1 h.....106
- Figura 42:** Expressão relativa dos genes alvo CBS, ABCF, TRYP, PGM e TCP em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos fármacos CNZ, CPH e MCZ na CE50 por 1 h .....107
- Figura 43:** Expressão relativa dos genes alvo MRPA, PAP, CYTB, LPP, GAPDH e ATUB em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos fármacos CNZ, CPH e MCZ na CE50 por 1 h .....108

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Espécies do gênero <i>Leishmania</i> causadoras da Leishmaniose e suas representações clínicas .....	25
<b>Tabela 2:</b>	Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses .....	36
<b>Tabela 3:</b>	Lista de compostos reposicionados atualizados com informação sobre o ano de aprovação do composto .....	38
<b>Tabela 4:</b>	Fármacos anti-histamínicos avaliados com respectiva descrição de estrutura química, massa molécula e registro CAS .....	51
<b>Tabela 5:</b>	Características, sequência e identificação dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR .....	63
<b>Tabela 6:</b>	Avaliação da Concentração Efetiva 50% e 90% de fármacos anti-histamínicos em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	72
<b>Tabela 7:</b>	Avaliação da Concentração Efetiva 50% de fármacos anti-histamínicos em amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	74
<b>Tabela 8:</b>	Avaliação da Concentração Citotóxica 50% e 90% de fármacos anti-histamínicos em células NCTC .....	75
<b>Tabela 9:</b>	Análise da pureza e concentração de RNA usando espectrofotômetro, fluorímetro e sistema de eletroforese automatizado .....	96
<b>Tabela 10:</b>	Análise da eficiência, coeficiente de determinação e limite de detecção dos genes obtidos da curva-padrão de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	98
<b>Tabela 11:</b>	Tm dos genes alvo de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	100
<b>Tabela 12:</b>	Candidatos a gene referência de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> analisados pelo programa geNorm .....	102
<b>Tabela 13:</b>	Comparação da eficiência de amplificação entre gene referência ATUB2 e genes alvo em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> não tratados .....	104

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>1.1. Leishmanioses</b>	<b>18</b>
1.1.1. Agente etiológico.	18
1.1.2. Classificação taxonômica	20
1.1.3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	21
1.1.4. Leishmaniose e suas formas clínicas	24
<b>1.2. Epidemiologia das leishmanioses</b>	<b>27</b>
1.2.1. Leishmaniose visceral no mundo	28
1.2.2. Leishmaniose visceral no Brasil	28
1.2.3. Leishmaniose visceral no Estado de São Paulo	29
<b>1.3. Tratamento da leishmaniose</b>	<b>29</b>
1.3.1. Antimonial Pentavalente	30
1.3.2. Anfotericina B	31
1.3.3. Anfotericina B lipossomal	32
1.3.4. Miltefosina	33
1.3.5. Pentamidina	34
1.3.6. Paromomicina	35
<b>1.4. Reposicionamento de fármacos</b>	<b>37</b>
1.4.1. Fármacos anti-histamínicos de classe H1	40
<b>1.5. Marcadores moleculares e celulares de resposta terapêutica em <i>L. (L.) infantum</i></b>	<b>42</b>
1.5.1. Membrana plasmática	43
1.5.2. Mitocôndria	44

1.5.3. Biossíntese de esteróis .....	46
1.5.4. Biossíntese de folato .....	46
1.5.5. Enzimas do metabolismo de tiol .....	47
1.5.6. Via glicolítica .....	47
1.6. Justificativa .....	48
<b>2. OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>50</b>
2.1. Objetivo específico .....	50
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>51</b>
<b>3.1. Fármacos .....</b>	<b>51</b>
<b>3.2. Reagentes .....</b>	<b>53</b>
<b>3.3. Parasitos, células de mamíferos e animais de experimentação ...</b>	<b>53</b>
3.3.1. <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i> .....	53
3.3.2. Células de mamífero .....	54
3.3.3. Animais de experimentação .....	54
3.3.4. Comissão de ética no uso de animais .....	54
<b>3.4. Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>) dos fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>55</b>
3.4.1. Ensaio com promastigota .....	55
3.4.2. Ensaio com amastigota .....	55
3.4.3. Ensaio de citotoxicidade .....	56
<b>3.5. Avaliação de alteração celular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> incubados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>57</b>
3.5.1. Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática .....	57

3.5.2.	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	57
3.5.3	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	58
3.5.4.	Avaliação de ultraestruturas celulares.....	58
3.5.5.	Determinação de tiol intracelular .....	59
3.5.6.	Análise estatística .....	59
<b>3.6.</b>	<b>Avaliação de alteração molecular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> tratados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>60</b>
3.6.1.	Padronizações de qPCR para avaliação da expressão gênica em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	60
3.6.2.	Tratamento e preparo das amostras biológicas .....	60
3.6.3.	Extração de RNA total .....	61
3.6.4.	Quantificação e análise da qualidade de RNA total extraído ..	61
3.6.5.	Síntese de DNA complementar (cDNA) de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	62
3.6.6.	Avaliação do desempenho da reação de qPCR pelo método de curva-padrão.....	68
3.6.7.	Prevenção de contaminação cruzada.....	68
<b>3.7.</b>	<b>Perfil dos níveis relativos de expressão gênica de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> incubados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>69</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1.</b>	<b>Determinação <i>in vitro</i> da concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>) dos fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>71</b>
4.1.1.	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos fármacos anti-histamínicos em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	71
4.1.2.	Avaliação da atividade <i>in vitro</i> dos fármacos anti-histamínicos amastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> .....	73

4.1.3.	Avaliação da citotoxicidade dos fármacos anti-histamínicos em células de mamífero.....	75
<b>4.2.</b>	<b>Avaliação de alteração celular em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> incubados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>76</b>
4.2.1.	Análise da permeabilidade da membrana plasmática .....	76
4.2.2.	Análise de espécies reativas de oxigênio (ERO) .....	78
4.2.3.	Análise do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) .....	80
4.2.4.	Determinação de tiol intracelular .....	81
4.2.5.	Análise de ultraestruturas celulares por microscopia eletrônica de transmissão .....	82
<b>4.3.</b>	<b>Padronizações das metodologias de qPCR para avaliação da expressão gênica em promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> incubados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>95</b>
4.3.1.	Quantificação e análise da qualidade do RNA total extraído ....	95
4.3.2.	Avaliação de eficiência da reação de qPCR .....	97
4.3.3.	Análise da curva de dissociação .....	99
4.3.4.	Determinação do gene referência .....	101
4.3.5.	Comparação da eficiência de amplificação: gene referência versus gene alvo .....	103
<b>4.4.</b>	<b>Perfil de expressão gênica de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> incubados com fármacos anti-histamínicos .....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>118</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>121</b>
<b>8.</b>	<b>APÊNDICES .....</b>	<b>135</b>
	Apêndice 1. Curva de dissociação para o gene GCS de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	135

Apêndice 2. Curva de dissociação para o gene CS de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	136
Apêndice 3. Curva de dissociação para o gene TDR1 de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	137
Apêndice 4. Curva de dissociação para o gene DNAPA de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	138
Apêndice 5. Curva de dissociação para o gene AQP1 de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	139
Apêndice 6. Curva de dissociação para o gene GAPDH de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	140
Apêndice 7. Curva de dissociação para o gene PAP de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	141
Apêndice 8. Curva de dissociação para o gene PGM de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	142
Apêndice 9. Curva de dissociação para o gene ATUB de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	143
Apêndice 10. Curva de dissociação para o gene ATUB2 de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	144
Apêndice 11. Curva de dissociação para o gene TR de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	145
Apêndice 12. Curva de dissociação para o gene TCP de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	146
Apêndice 13. Curva de dissociação para o gene LPP de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	147

Apêndice 14. Curva de dissociação para o gene CYTB de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	148
Apêndice 15. Curva de dissociação para o gene ABCF de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	149
Apêndice 16. Curva de dissociação para o gene TRYP de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	150
Apêndice 17. Curva de dissociação para o gene MRPA de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	151
Apêndice 18. Curva de dissociação para o gene CBS de promastigotas de <i>L. (L.) infantum</i> na reação da qPCR .....	152
<b>9. ANEXO .....</b>	<b>153</b>
Anexo 1      Parecer de aprovação da Coordenadoria da Comissão Ética no Uso de Animais – Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) no projeto 08/2014: Identificação de marcadores moleculares e celulares de resposta terapêutica de fármacos com atividade antileishmania .....	153

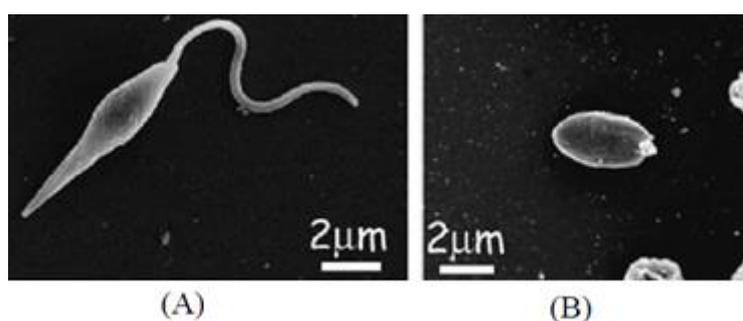
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Leishmanioses

A leishmaniose é uma doença relacionada à pobreza com duas formas clínicas principais: leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea. Estima-se que 0,7 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose por ano sejam relatados em quase 100 países endêmicos. A OMS lista a leishmaniose como uma das doenças tropicais negligenciadas, para as quais o desenvolvimento de novos tratamentos é uma prioridade (Burza *et al.*, 2018).

### 1.1.1. Agente etiológico

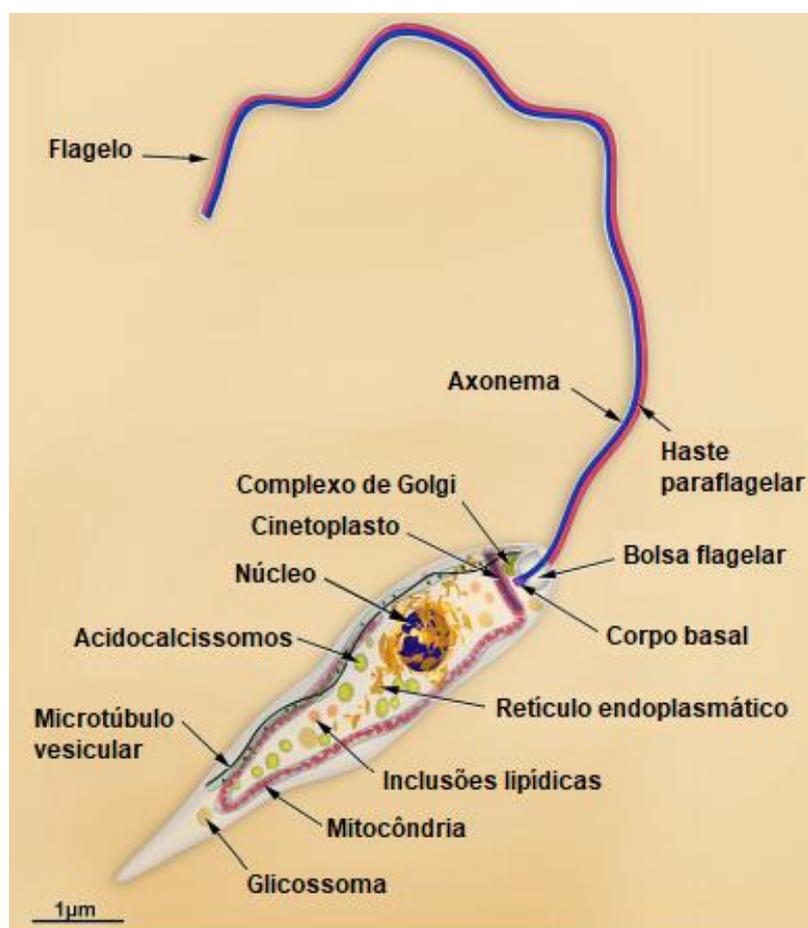
Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos dimórficos, com duas formas distintas (Figura 1): promastigota (flagelada), encontrada no trato digestório do inseto vetor, e amastigota (desprovida de flagelo externo), parasito intracelular obrigatório, encontrado no interior de células fagocíticas do sistema mononuclear de hospedeiros vertebrados mamíferos (Gontijo e Carvalho, 2003).



**Figura 1:** Formas evolutivas do gênero *Leishmania* por imagem de microscopia eletrônica de varredura. Em (A) forma promastigota encontrada no trato digestório do hospedeiro invertebrado. Em (B) forma amastigota presente no hospedeiro vertebrado. Fonte: Besteiro *et al.*, 2007.

Os promastigotas são alongados, apresentando um longo flagelo externo emergindo da região anterior, com formato mais arredondado e extremidade posterior mais afilada. Seu tamanho é variável, medindo entre 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura x 16 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, incluindo o flagelo que normalmente tem

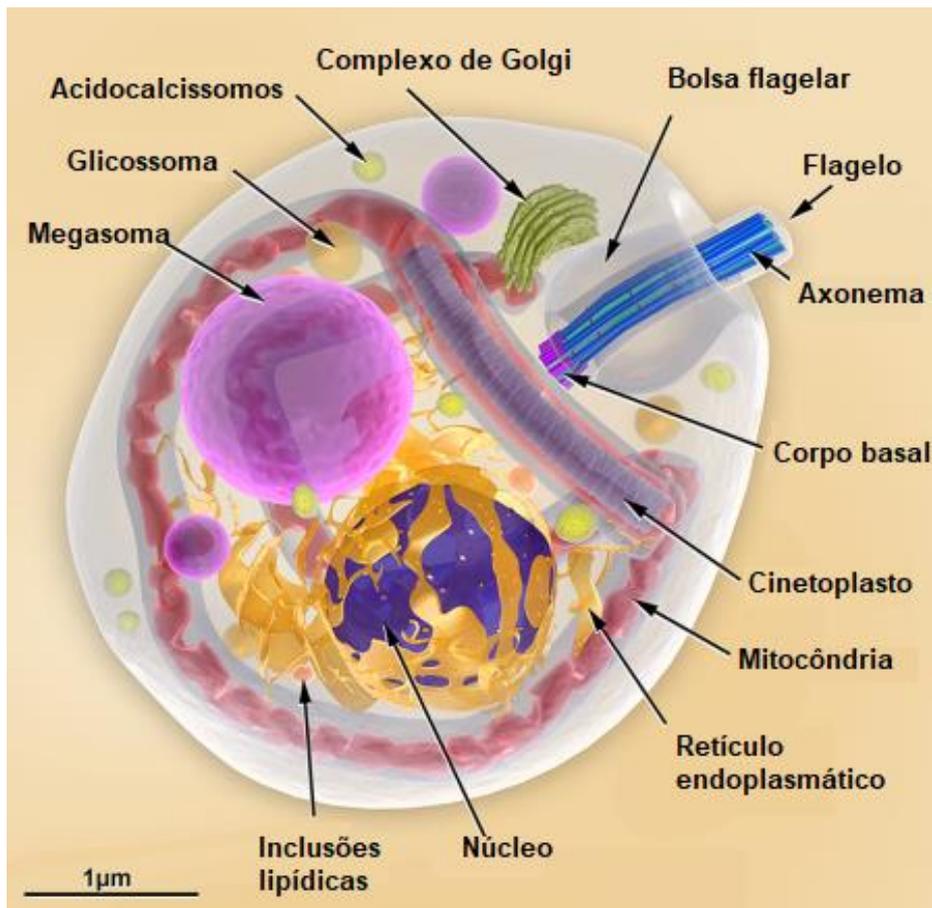
tamanho igual ou maior ao corpo do parasito. O núcleo é arredondado e fica situado no terço médio da célula e o cinetoplasto encontra-se na extremidade anterior ao núcleo, próximo a bolsa flagelar. Quanto à mitocôndria, provida de septos internos irregulares e pouco numerosos, mostra continuidade com a parede do cinetoplasto localizado próximo à bolsa flagelar. O retículo endoplasmático é pouco abundante; o aparelho de Golgi, vesículas e outras formações citoplásmicas não apresentam particularidade. O flagelo deixa o corpo flexível dando motilidade. (Figura 2) (Rey, 2001; Conceição-Silva e Alves, 2014).



**Figura 2:** Representação esquemática da ultra-estrutura da forma promastigota de *Leishmania* spp. Adaptado de Teixeira, 2013.

Os amastigotas são ovóides, apresentam flagelo curto e interiorizado na bolsa flagelar. O tamanho dos amastigotas varia de acordo com a espécie do parasito, possui dimensões entre 1,5-3 µm x 3-6,5 µm de diâmetro (Conceição-Silva e Alves, 2014). O núcleo é arredondado, ocupando cerca de um terço do

corpo do parasito, contendo geralmente dois nucléolos e abundante material granuloso forrando a membrana nuclear. O retículo endoplasmático é pouco abundante; o complexo de Golgi, vesículas e outras formações citoplásmicas não apresentam particularidade. Quanto à mitocôndria, provida de septos internos irregulares e pouco numerosos, localizado próximo à bolsa flagelar (Figura 3) (Rey, 2001).



**Figura 3:** Representação esquemática da ultra-estrutura da forma amastigota de *Leishmania* spp. Adaptado de Teixeira, 2013.

### 1.1.2. Classificação taxonômica

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros com base no seu desenvolvimento em flebotomíneos. O crescimento das espécies do subgênero *Leishmania* ocorre no intestino anterior e médio do flebótomo, enquanto que o subgênero *Viannia* ocorre no intestino médio e no intestino grosso (OMS, 2010).

Esses parasitos possuem a seguinte posição sistemática:

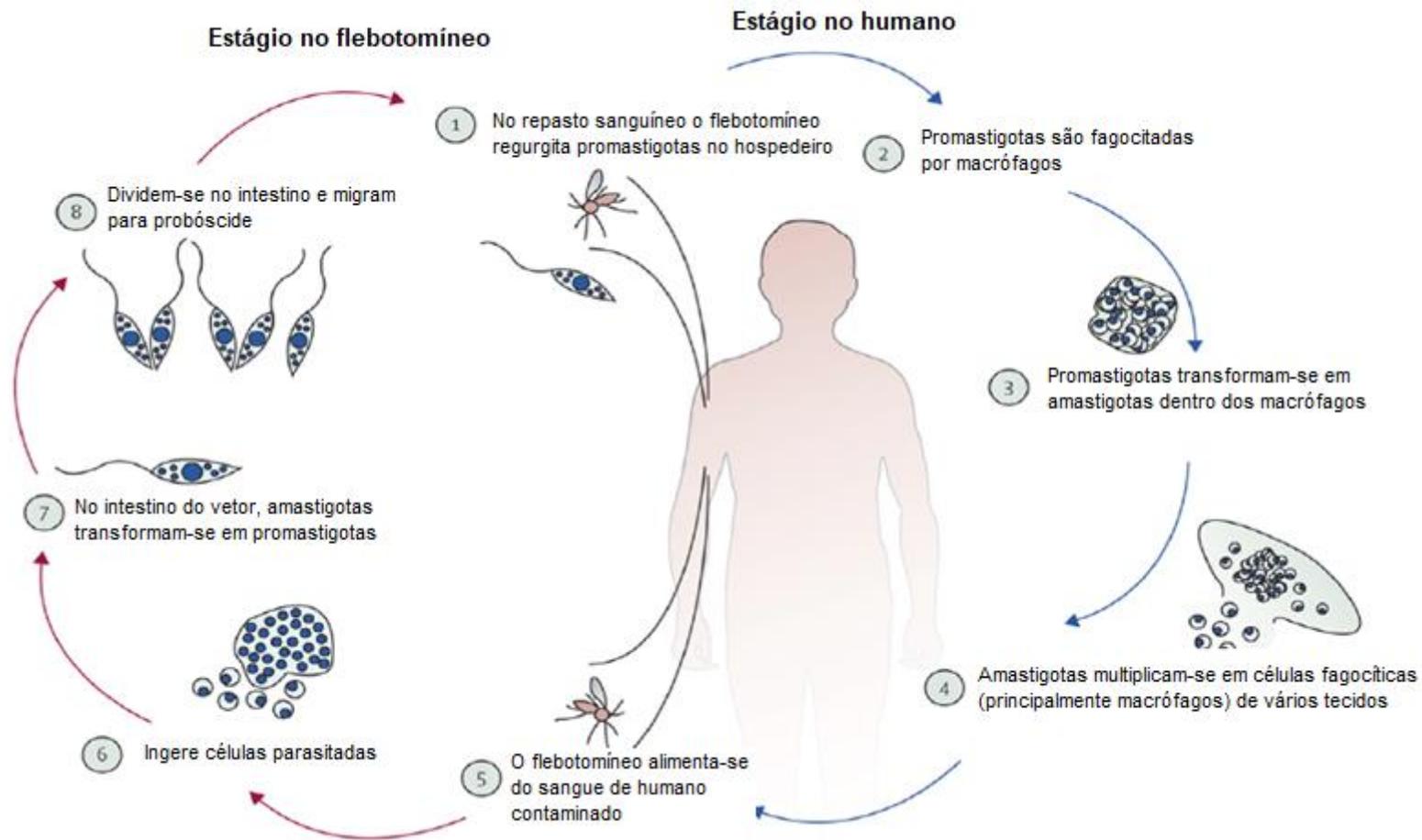
- Reino: **Protista** Haeckel, 1866
- Sub-reino: **Protozoa** Goldfuss, 1817
- Filo: **Sarcomastigophora** Honigberg e Balamuth, 1963
- Subfilo: **Mastigophora** Deising, 1866
- Classe: **Zoomastigophorea** Calkins, 1909
- Ordem: **Kinetoplastida** Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976
- Subordem: **Trypanosomatina** Kent, 1880
- Família: **Trypanosomatidae** Dofein, 1901, *emend.* Grobben, 1905
- Gênero: ***Leishmania*** Ross, 1903
- Subgêneros: ***Leishmania Leishmania***  
***Leishmania Viannia***

### 1.1.3. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

A transmissão da leishmaniose é feita pela fêmea hematófaga do flebotomíneo infectado, que durante o repasto sanguíneo regurgita juntamente com a saliva, formas infectantes (promastigotas) no hospedeiro vertebrado. Na epiderme do hospedeiro, os promastigotas são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear. Dentro do vacúolo parasitóforo dos macrófagos, diferenciam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária até o rompimento dos mesmos, ocorrendo a liberação dessas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo sucessivo, havendo a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células fagocíticas como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Figura 4) (Coura, 2008).

A fêmea do flebotomíneo ao realizar novo repasto sanguíneo, provoca uma pequena laceração da pele e um hematoma, do qual ingere macrófagos infectados com amastigotas. No interior do vetor, estas formas chegam ao intestino médio e se transformam em promastigota procíclica (Freitas *et al.*, 2012), onde sofrem divisão binária e depois passam por outra diferenciação, adquirindo a forma infectante promastigota metacíclica, as quais propagam-se

no esôfago e faringe do inseto e ficam aderidas ao epitélio pelo flagelo e migram para a probóscide, infectando novos hospedeiros (Coura, 2008; Neves, 2010).



**Figura 4:** Ciclo biológico da *Leishmania* spp. As setas em azul representam o estágio de *Leishmania* spp. no humano e as setas vermelhas representam o estágio no flebotomíneo. As formas arredondadas são os amastigotas e as formas ovais com presença de flagelos são os promastigotas. Adaptado de Reithinger *et al.*, 2007.

#### 1.1.4. Leishmaniose e suas formas clínicas

O estabelecimento, progressão e a gravidade da infecção é dependente da espécie do parasito (Tabela 1), regime de tratamento, genética do hospedeiro e imunossupressão, particularmente devido à coinfeção por HIV (Reithinger *et al.*, 2007; Novais *et al.*, 2013).

A Leishmaniose pode apresentar diferentes formas clínicas, sendo as duas principais: leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV). A LC apresenta-se tipicamente como nódulos ou lesões cutâneas no local da picada do flebótomo (leishmaniose cutânea localizada) (Figura 5). Em alguns casos, os parasitos se disseminam através da pele e se apresentam como múltiplos nódulos não ulcerativos (leishmaniose cutânea difusa, LCD) (Figura 6) ou se propagam pelo sistema linfático, resultando em destruição da mucosa nasal e com comprometimento do septo, boca e garganta, com risco de deformidade permanente (leishmaniose mucosa, LMC) (Figura 7) (Reithinger *et al.*, 2007). A LC localizada pode se resolver espontaneamente e geralmente responde bem ao tratamento; o tratamento da LCD e LMC é mais difícil e os casos podem demorar consideravelmente mais tempo para apresentar melhoras. A LV (Figura 8) é progressiva e sintomática, geralmente afeta o baço, o fígado ou outros tecidos linfóides e, se não for tratada, é fatal; uma fração de casos de LV tratados com sucesso pode resultar em erupções maculopapulares ou nodulares (leishmaniose dérmica pós-calazar) (Figura 9) (Murray *et al.*, 2005).

**Tabela 1:** Espécies do gênero *Leishmania* causadoras da leishmaniose e suas representações clínicas. Adaptado de Reithinger *et al.*, 2007.

	<b>Patologia clínica principal</b>	<b>Principal distribuição geográfica</b>
<b>spp. <i>Leishmania</i> do Novo Mundo</b>		
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LCL, mucosa	América do Sul, partes da América Central, México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LCL, mucosa	Norte da América do Sul e sul da América Central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LCL	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LCL, LCD	América do Sul
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LCL, LCD	América Central, México, EUA
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LCL	América do Sul
<b>spp. <i>Leishmania</i> do Velho Mundo</b>		
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LCL, LCD	Etiópia, Quênia
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	LCL	Norte da África
<i>L. (Leishmania) major</i>	LCL	Ásia Central, norte da África, Oriente Médio, leste da África
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LCL	Ásia Central, Oriente Médio, partes do Norte da África, sudeste da Ásia
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	Visceral, LCL	África, Ásia Central, sudeste Asiático
<b>spp. <i>Leishmania</i> do Novo e Velho Mundo</b>		
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	Visceral, LCL	Europa, norte da África, América Central, América do Sul

LCL= Leishmaniose Cutânea Localizada. LCD= Leishmaniose Cutânea Difusa. Subgênero está entre parênteses. Sudeste da Ásia inclui o subcontinente indiano e a China



**Figura 5:** Manifestação clínica da leishmaniose cutânea localizada. Fonte: Reithinger *et al.*, 2007.



**Figura 6:** Manifestação clínica da leishmaniose cutânea difusa em um paciente HIV positivo. Fonte: Zijlstra, 2014.



**Figura 7:** Manifestação clínica da leishmaniose mucocutânea. (A) Lesão que afeta a narina direita, o lábio superior e o freio labial. (B) Lesões que afetam a úvula e o palato mole adjacente. Fonte: Burza *et al.*, 2018.



**Figura 8:** Manifestação clínica da leishmaniose visceral. Fonte: van Griensven e Diro, 2012.



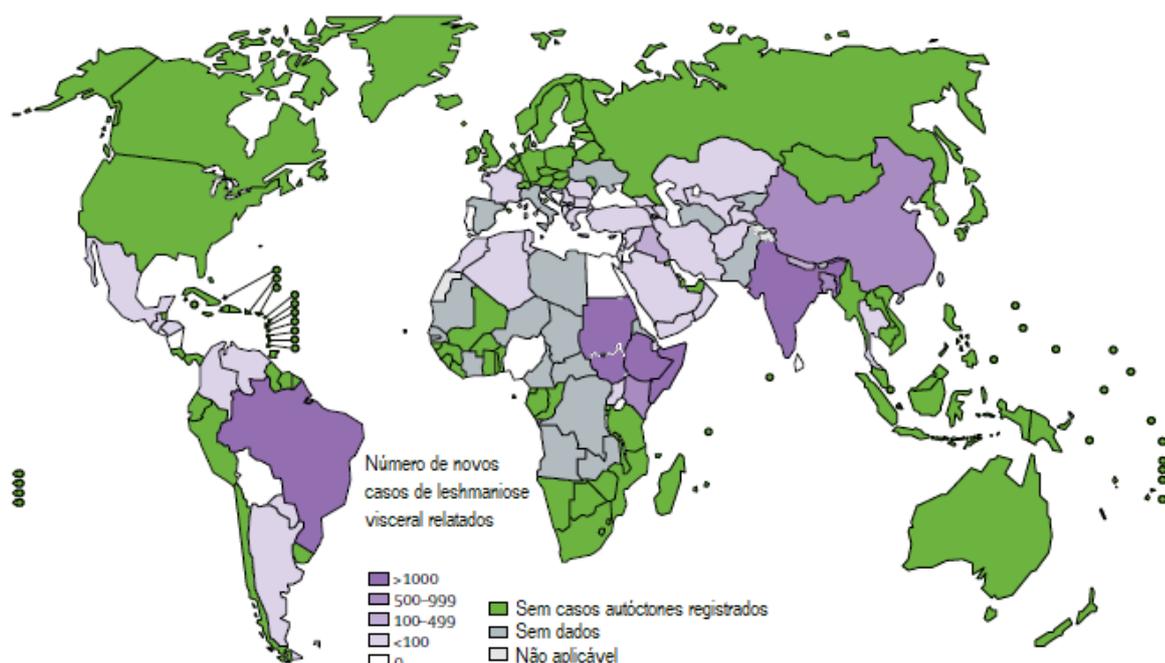
**Figura 9:** Manifestação clínica da leishmaniose dérmica pós-calazar. Fonte: van Griensven e Diro, 2012.

## 1.2. Epidemiologia das leishmanioses

Estima-se que 0,7 a 1 milhão de novos casos de leishmaniose por ano sejam relatados em quase 100 países endêmicos. Na última década, houve uma considerável redução no número de casos relatados de LV como resultado de um melhor acesso ao diagnóstico, tratamento e controle vetorial mais intenso dentro de uma iniciativa de eliminação na Ásia. No leste da África, no entanto, os números de casos de LV continuam a ser mantidos. O aumento do conflito em áreas endêmicas de leishmaniose cutânea e deslocamento forçado resultou em um surto nessas áreas endêmicas, bem como em clínicas em todo o mundo (OMS, 2018; Burza, et al., 2018).

### 1.2.1. Leishmaniose visceral no mundo

Em 2015, sete países (Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão) relataram mais de 90% dos casos mundiais de leishmaniose visceral. No entanto, a doença permanece endêmica em mais de 60 países (Figura 10) (Burza, *et al.*, 2018). A incidência global da leishmaniose visceral em 2017 foi entre 50.000 e 90.000 casos (Alvar, *et al.*, 2012; OMS, 2018).

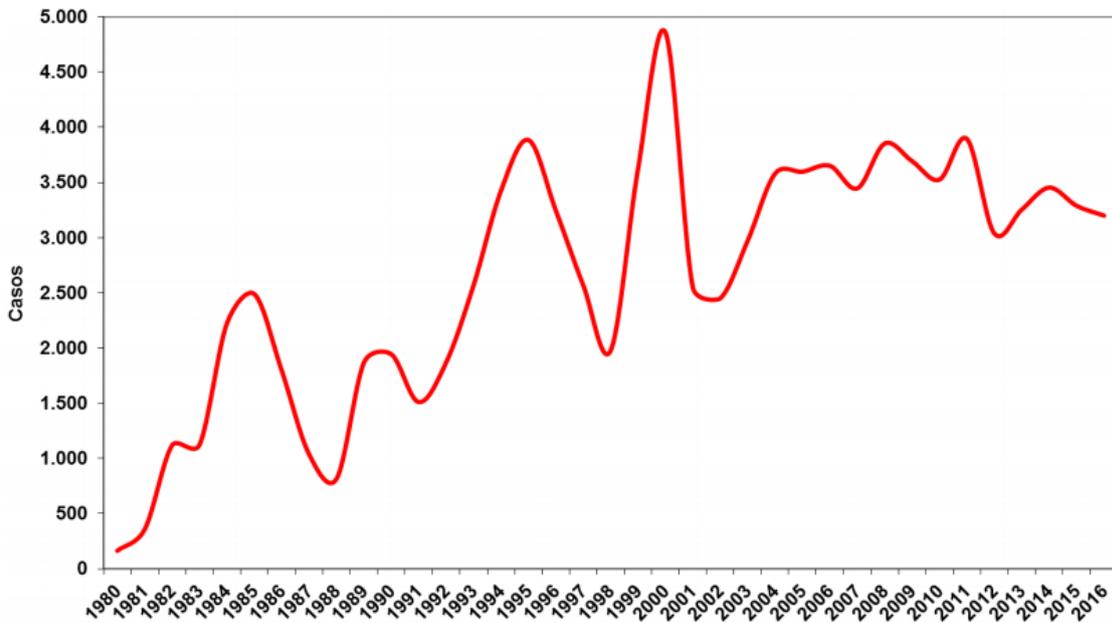


**Figura 10:** Status de endemicidade da leishmaniose visceral em todo o mundo em 2016. Adaptado de OMS, 2018.

### 1.2.2. Leishmaniose visceral no Brasil

Até a década de 1990, o nordeste brasileiro correspondeu a 90% dos casos de LV. Entretanto, as modificações no ambiente ocasionadas pelo processo migratório, por pressões econômicas ou sociais, o empobrecimento consequente de distorções na distribuição de renda, o processo de urbanização crescente, o esvaziamento rural e as secas periódicas, favoreceram a expansão das áreas endêmicas e o surgimento de novos focos (Figura 11) (Ministério da Saúde, 2005).

No Brasil foram registrados, no período entre 1990 a 2017, 87.619 casos confirmados de LV (Ministério da Saúde, 2018). Somente em 2017, 4.103 casos de LV foram confirmados com 327 óbitos (Ministério da Saúde, 2018).



**Figura 11:** Evolução do número de casos de leishmaniose visceral no Brasil de 1980 a 2016. Fonte: Ministério da Saúde, 2017.

### 1.2.3. Leishmaniose visceral no Estado de São Paulo

No Estado de São Paulo, no período de 2014 a 2018, foram notificados 628 casos de LV, dos quais 52 casos evoluíram para óbito, resultando em uma letalidade de 8,3% (52/628). O ano com maior número de casos foi 2017, com 143 confirmações, enquanto a maior letalidade ocorreu em 2014, com 8,5% (12/141) (CVE, 2018).

### 1.3. Tratamento da leishmaniose

As leishmanioses são tratáveis. Entretanto, a terapia é um desconcertante assunto, em grande parte devido à complexidade da doença (McGwire e Satoskar, 2014). A escolha específica do fármaco ou a duração do tratamento geralmente não leva em conta as particularidades dos diferentes agentes etiológicos, porque não há métodos facilmente acessíveis para o diagnóstico específico da espécie, enquanto a coexistência de espécies diferentes na mesma área geográfica é comum. Portanto, em geral, pesquisadores e clínicos não foram capazes de determinar se os esquemas de

tratamento específicos para cada espécie são mais apropriados do que uma estratégia geral. Os antimoniais pentavalentes foram a primeira classe de drogas aplicadas ao tratamento da leishmaniose. Juntamente com a anfotericina B, a pentamidina, a miltefosina e a paromomicina, constituem os recursos disponíveis para a quimioterapia da leishmaniose (Uliana *et al.*, 2016).

Atualmente, nenhuma vacina humana para leishmaniose encontra-se comercialmente disponível, fato que torna a quimioterapia, constituída por um número restrito de fármacos (Singh e Sundar, 2012).

### **1.3.1. Antimonial Pentavalente**

Em 1912, o médico brasileiro Gaspar Vianna descobriu ação leishmanicida do antimônio trivalente –  $Sb^{3+}$ , o chamado tártaro emético (tártaro de potássio e antimônio) (Laison, 1996; Fiocruz, 1997).

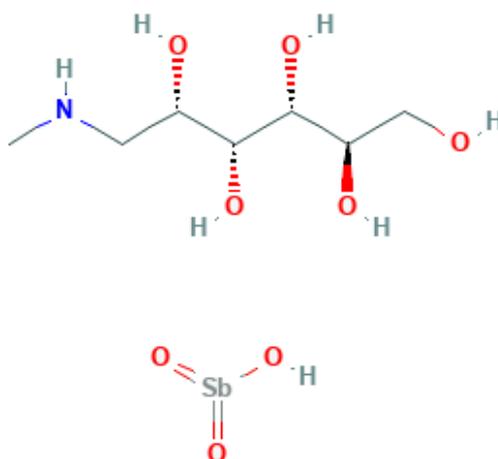
Em 1937, Schimdt introduziu na terapia médica o estibogluconato de sódio, (Pentostam®) medicamento derivado do ácido estibônico, onde o antimônio está na forma pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) que tinha a vantagem da redução de alguns efeitos adversos comparado ao tártaro emético (Berman, 1988).

Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França, uma alternativa ao estibogluconato de sódio, o antimoniato de N-metilglucamina (Figura 12) comercializado como Glucantime®. Atualmente, o Pentostam® é distribuído em países de língua inglesa e o Glucantime® comercializado nos países de língua francesa, espanhola e no Brasil (Rath *et al.*, 2003), onde o fármaco é disponibilizado pelo Ministério da Saúde para uso clínico na rede pública de saúde.

Este medicamento é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV), e provoca regressão das manifestações clínicas e hematológicas da doença (Rath *et al.*, 2003). Entretanto, a dose de antimoniato e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos os pacientes só evoluem para cura clínica após a tentativa de vários esquemas terapêuticos (Pelissari *et al.*, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) preconiza que as doses de antimoniais não devam ultrapassar 20 mg / kg por dia, por injeção intramuscular ou por infusão intravenosa ao longo de 28 a 30 dias. Além de serem dolorosos se administrados por via intramuscular, os antimoniais são cardiotóxicos e podem induzir arritmias (Sundar e Chakravarty, 2010). Esse efeito adverso é particularmente evidente na coinfeção HIV / leishmaniose visceral (Ritmeijer *et al.*, 2001). No subcontinente indiano, o estibogluconato de sódio não é mais recomendado devido à resistência a drogas (Sundar *et al.*, 2000).

O antimônio pentavalente ( $Sb^{5+}$ ) é considerado um pró-fármaco convertido em antimônio trivalente ( $Sb^{3+}$ ), uma forma ativa do fármaco (Ephros *et al.*, 1999). Como mecanismo de ação, a enzima redutase dependente de tiol do parasito, catalisa a conversão de  $Sb^{5+}$ , em  $Sb^{3+}$ , usando glutatona como um redutor (Torres *et al.*, 2010). Ambas as formas de antimonial matam as espécies de *Leishmania* por fragmentação do DNA (Serenio *et al.*, 2001). No entanto, os mecanismos exatos de ação ainda são inexplorados (Serenio *et al.*, 2001).



**Figura 12:** Estrutura química do Antimoniato de N-metilglucamina (PubChem, 2019).

### 1.3.2. Anfotericina B

O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico poliênico (Figura 13), descoberto em 1953 como substância de ação antifúngica (Filippin e Souza, 2006). No final da década de 1950, a anfotericina B foi descrita por Furtado e

Lacaz como uma alternativa ao tratamento de pacientes com leishmaniose mucocutânea que recidivavam com frequência ou não respondiam aos antimoniais (Sampaio *et al.*, 1960) e logo foi aplicada ao tratamento da LV grave (Prata, 1963). Este fármaco é considerado de primeira escolha no tratamento de gestantes e em pacientes clinicamente resistentes ao antimônio e pentamidinas acometidos pela LV. Como mecanismo de ação, o fármaco interage especificamente com o ergosterol, esteróide da membrana da *Leishmania* causando aumento de permeabilidade, que resulta em alterações osmóticas que levam morte do parasito (Berman, 1997). O desoxicolato de anfotericina B é altamente tóxico e deve ser administrado por infusão intravenosa lenta por 4 a 6 h, necessitando de hospitalização. Os efeitos adversos durante o tratamento podem ser de febre, hipotensão, tremor, dor de cabeça, anorexia, náuseas, vômito, insuficiência renal, anemia, dores musculares e outros (Rang *et al.*, 2001).

Em regiões da Índia, onde existe uma frequência elevada de resistência ao antimônio, a anfotericina B é administrada por via intravenosa em doses de 0,75 -1 mg / kg / dia por 15-20 dias, ou alternadamente (Menezes *et al.*, 2015).

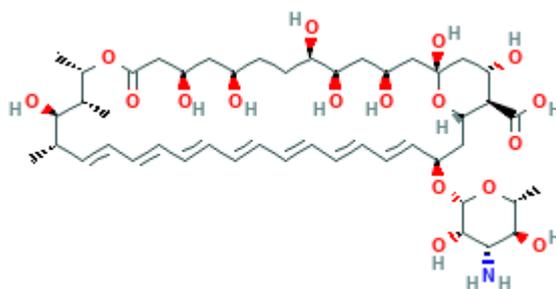


Figura 13: Estrutura química da anfotericina B (PubChem, 2019).

### 1.3.3. Anfotericina B lipossomal

A anfotericina B lipossomal é uma formulação em que a anfotericina B é incorporada em lipossomas. Devido os amastigotas de *Leishmania* se multiplicarem no interior de macrófagos, existe uma grande dificuldade de acesso ao fármaco, com isso têm sido usados sistemas de liberação de fármacos, o que melhora a atividade leishmanicida e o composto atinge níveis

plasmáticos mais elevados e menor toxicidade se comparado ao desoxicolato de anfotericina B (Soares e Leon, 2014). O esquema terapêutico é dado pela administração de 10 - 30 mg / kg dose única ou 5 mg / Kg pela via intravenosa por 5 dias, apresentando-se como uma modalidade de tratamento mais curta e com menos incidências de reações adversas (Croft e Coombs, 2003; Menezes *et al.*, 2015).

Apesar dessa formulação lipossomal da anfotericina B ser menos tóxica, a utilização terapêutica está limitada em países subdesenvolvidos devido ao elevado custo (Croft e Coombs, 2003).

#### **1.3.4. Miltefosina**

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) um análogo da fosfatidilcolina (Figura 14), foi desenvolvida originalmente como um fármaco antineoplásico, que mostrou boa atividade contra *L. (L.) donovani* e demonstrou ser muito eficaz no tratamento de LV na Índia, país que foi o primeiro a aprovar o seu uso em 2002 (Sundar *et al.* 2002). O esquema terapêutico indicado é de 100 – 150 mg / dia (28 dias) (Menezes *et al.*, 2015)

As principais desvantagens da miltefosina são seu potencial teratogênico e a longa meia-vida que pode levar à seleção de cepas resistentes a medicamentos. No entanto, beneficia de ser administrado por via oral. Os efeitos colaterais são principalmente gastrointestinais e, embora graves em alguns pacientes, são geralmente considerados administráveis (Soto *et al.*, 2004; Dorlo *et al.*, 2008).

A eficácia da miltefosina para o tratamento de infecções por *L. (L.) donovani* na África ainda está em estudo (Omollo *et al.* 2011), mas parece ser baixa em populações com uma alta prevalência de co-infecção por HIV (Ritmeijer *et al.* 2001). A miltefosina foi usada por alguns anos como terapia de primeira linha para LV em partes da Índia, mas o surgimento de uma taxa de recidiva relevante moveu a miltefosina para baixo da linha como uma opção principalmente para terapia combinada (Sundar *et al.* 2012; Rijal *et al.* 2013).

Como mecanismo de ação, o composto interfere na membrana celular do parasito alterando a composição lipídica, permeabilidade da membrana e metabolismo fosfolipídico, induzindo a morte celular por apoptose (Filho *et al.*, 2008).



Figura 14: Estrutura química da miltefosina (PubChem, 2019).

### 1.3.5. Pentamidina

A pentamidina (Figura 15) tem sido usada desde o ano de 1940 para o tratamento da doença do sono. A primeira utilização na terapêutica de LV foi relatada na Índia em 1949 e na Espanha em 1950. O regime terapêutico é de 3 mg / Kg em dias alternados – 7 doses (Menezes *et al.*, 2015). Os efeitos colaterais incluem hipoglicemia, hipotensão, febre, miocardite e toxicidade renal (Hazarika, 1949; Nagle *et al.*, 2014).

Na Índia a pentamidina foi usada como fármaco de segunda escolha no tratamento de LV quando os antimoniais se revelaram ineficazes, mas devido a sua toxicidade e resistência emergente, seu uso foi abandonado a partir de 1990 e substituído pelo desoxicolato de anfotericina B. Na Guiana Francesa e no Suriname a pentamidina é a primeira opção para o tratamento da LC causada pela *L. guyanensis*, onde é o único fármaco leishmanicida (Croft e Coombs, 2003).

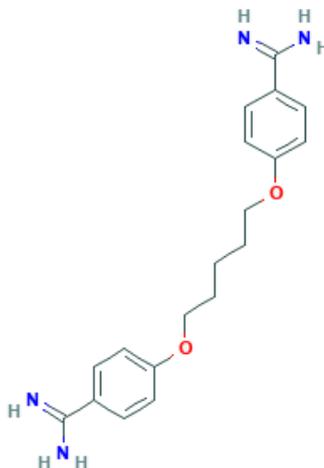


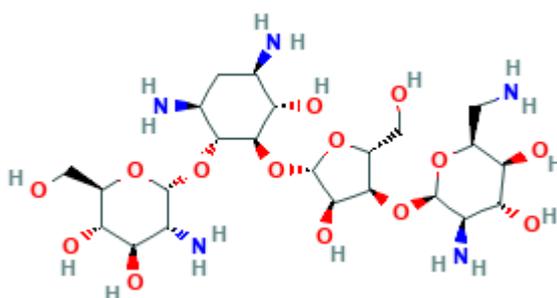
Figura 15: Estrutura química da pentamidina (PubChem, 2019).

### 1.3.6. Paromomicina

A paromomicina é um antibiótico aminoglicósido (Figura 16) identificado como um leishmanicida desde o ano de 1960 (Croft e Coombs, 2003). Como mecanismo de ação, a paromomicina também induz alterações na fluidez da membrana e no metabolismo lipídico e afeta a atividade mitocondrial (Maarouf *et al.* 1997).

Os ensaios em fase III conduzidos em Bihar na Índia entre 2003 e 2004 apresentaram excelente eficácia. Num regime de 11 mg / kg durante 21 dias foi demonstrado não ser inferior a anfotericina B (1 mg / kg em dias alternados por 15 – 20 dias), com taxas de cura de 94,6% contra 98,8%, respectivamente. Os efeitos adversos relatados pelo uso da paromomicina é dor no local (55%), entretanto, isso geralmente não leva a interrupção da terapia. Uma pequena fração dos pacientes expressa ototoxicidade reversível (2%) e um aumento das transaminases hepáticas (6%) (Sundar *et al.*, 2007).

A paromomicina além ser ativa contra uma ampla variedade de agentes patogênicos, incluindo bactérias, apresenta outra vantagem que é a sua acessibilidade, uma vez que o custo do tratamento é de apenas US\$ 5 - 10. (Chappuis *et al.*, 2007).



**Figura 16:** Estrutura química da paromomicina (PubChem,2019).

As dificuldades quanto à administração, duração dos tratamentos e efeitos adversos (Tabela 02), tem motivado pesquisadores do mundo todo a buscarem novos candidatos a fármacos (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

**Tabela 2:** Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses. IV: administração intravenosa; IM: intramuscular; IL: administração intralesional. Adaptado de Menezes *et al.*; 2015.

Fármacos	Esquema terapêutico	Via de administração	Eficácia	Efeitos adversos	Custo
<b>Antimoniais pentavalentes</b>	20 mg / kg diários por 20 dias	IM, IV ou IL	35-95% (dependendo da espécie)	Cardiotoxicidade grave, pancreatite, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade	~US\$50-70
<b>Pentamidina</b>	3 mg / kg dias alternados – 7 doses	IM	35-96% (dependendo da espécie de <i>Leishmania</i> )	Hiperglicemia, como resultado de danos no pâncreas; hipotensão, taquicardia e alterações eletrocardiográficas.	~US\$ 100
<b>Anfotericina B</b>	0,75 - 1 mg / kg / dia (15 - 20 dias, diárias ou alternadamente)	IV	>90%	Nefrotoxicidade grave, hipocalcemia, febre alta e reações relacionadas a infusão.	~US\$ 100
<b>Anfotericina B lipossomal</b>	10 - 30 mg / kg dose única (dose individual 3 - 5 mg / kg / dose)	IV	>97%	Leve e pouco frequente: nefrotoxicidade e calafrios.	~US\$ 280
<b>Miltefosina</b>	100 - 150 mg / dia (28 dias)	Oral	Ásia: 94% (Índia) 60% -93% (África)	Vômitos e diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, teratogenicidade.	~US\$ 70
<b>Paromomicina</b>	15 mg / dia (21 dias) ou 20 mg / dia (17dias)	IM ou tópico	94% (Índia) 46-85% (África)	Nefrotoxicidade grave, ototoxicidade, hepatotoxicidade.	~US\$ 10

#### 1.4. Reposicionamento de Fármacos

Apesar de a leishmaniose ser a oitava maior doença tropical, as forças do mercado são insuficientes para impulsionar a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos para essa doença (Pink *et al.*; 2005). Os investimentos financeiros para a pesquisa de novos fármacos são limitados, pois os medicamentos disponíveis destinados à terapêutica apresentam um baixo retorno econômico para as indústrias farmacêuticas. Embora haja esse obstáculo, um esforço tem sido dedicado para a descoberta de novos fármacos como os de reposicionamento a partir de fármacos já caracterizados anteriormente (Nagle *et al.*, 2014).

Reposicionamento de fármacos refere-se a descobertas de novas indicações clínicas a um medicamento já disponível no mercado, assim como a adição de uma nova opção terapêutica para uma determinada doença (Sistigu *et al.*, 2011; Oprea e Mestres, 2012). Devido à disponibilidade dos dados prévios de farmacocinética, toxicologia e segurança, esta estratégia apresenta inúmeras vantagens, pois otimiza o processo de desenvolvimento do fármaco com redução de custos da pesquisa, possibilitando a introdução de um novo medicamento num curto período de tempo (Padhy e Gupta, 2011; Pinto *et al.*, 2014).

Conforme recomendação da Organização Mundial de Saúde, através de sua agência internacional TDR (“Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases”), estratégias para o desenvolvimento de novos medicamentos envolvem o planejamento / síntese de novas substâncias ativas ou de fármacos já conhecidos com modificações químicas; a associação reversível do fármaco, já em uso, a um sistema transportador, a fim de direcioná-lo ao local alvo, reduzindo sua toxicidade e efeitos colaterais; outra estratégia está relacionada ao reposicionamento de fármacos que oferece vantagens na fase de desenvolvimento, por utilizar um medicamento já caracterizado farmacologicamente.

Vários medicamentos têm sido reposicionados com sucesso para uma nova indicação, a exemplo disso, os mais proeminentes o viagra e a talidomida (Tabela 3), que vem gerando um número elevado de receitas (Novac, 2013).

Atualmente, todos os medicamentos em uso clínico indicados no tratamento da leishmaniose são fármacos de reposicionamento, como o antifúngico anfotericina B, o antibiótico paromomicina e o fármaco oral antineoplásico miltefosina (Freitas-Junior *et al.*, 2012).

**Tabela 3:** Lista de compostos reposicionados atualizados com informação sobre o ano de aprovação do composto (Novac, 2013).

<b>Fármaco</b>	<b>Indicação original</b>	<b>Indicação de reposicionamento</b>	<b>Ano<sup>a</sup></b>
Anfetamina	Estimulante	Hipercinesia em crianças (transtorno do déficit de atenção com hiperatividade, o TDAH)	1943
Alopurinol	Síndrome de lise tumoral	Gota	1967
Zidovudina	Câncer	HIV/AIDS	1985
Minoxidil	Hipertensão	Alopecia	1988
Bupropiona	Depressão	Tabagismo	1997
Sibutramina	Depressão	Obesidade	1997
Finasterida	Hiperplasia benigna da próstata	Alopecia	1997
Metotrexato	Câncer	Artrite reumatoide	1999
Fluoxetina	Depressão	Transtorno disfórico pré-menstrual	2000
Atomoxetina	Mal de Parkinson	Déficit de atenção e hiperatividade	2002
Talidomida	Enjoo matinal	Mieloma múltiplo	2003
Cymbalta	Depressão	Neuropatia periférica diabética	2004
Topiramato	Epilepsia	Enxaqueca	2004
Paclitaxel	Câncer	Reestenose	2004
Sildenafil	Angina	Disfunção erétil	2005
Lumigan	Glaucoma	Hipotricose simples	2009
Dapoxetine	Analgesia e depressão	Ejaculação precoce	2009
Fentolamina	Hipertensão	Agente de reversão de anestesia dental	2009
Lidocaína	Anestesia local	Arritmia	2010
Mifepristone	Interrupção da gravidez	Síndrome de Cushing	2012

<sup>a</sup>Ano da primeira aprovação em novas indicações

Estudos recentes publicados por nosso grupo têm demonstrando a potencial aplicação de diferentes medicamentos na terapêutica das leishmanioses. A furazolidona, um fármaco nitrofurano, utilizado no tratamento da tricomoníase, cólera, giardíase e infecção causada por *Helicobacter pylori*, demonstrou atividade *in vitro* contra diferentes espécies de *Leishmania*, apresentando uma concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>) na faixa de 0,47 a 0,73 µg / mL, causando dano mitocondrial e nuclear em promastigotas (Reimão *et al.*, 2010). A furazolidona encapsulada em lipossomas foi avaliada em modelos de hamsters infectados com *Leishmania (L.) infantum*, após 12 dias consecutivos de tratamento, numa dose 100 vezes menor que o fármaco livre (0,5 mg / kg), foi capaz de reduzir em mais de 74 % a carga parasitária no baço e 32 % no fígado; a furazolidona livre (50 mg / kg) também reduziu a carga parasitária no baço (82 %) e no fígado (85 %), portanto ambas as formulações apresentam-se como candidatos à fármacos efetivos no tratamento da LV (Tempone *et al.*, 2010).

A nimodipina, um bloqueador de canais de cálcio, indicado para prevenir e tratar danos causados por isquemia cerebral apresentou atividade contra promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania*, com uma CE<sub>50</sub> de 81,2 e 21,5 µM, respectivamente, causando danos mitocondrial e na membrana plasmática (Tempone *et al.*, 2009). Outro bloqueador de canais de cálcio, o bepridil, usado como um agente anti-hipertensivo demonstrou atividade contra promastigotas e amastigotas de espécies de *Leishmania*, com uma CE<sub>50</sub> de 3,81 e 21,55 µM, respectivamente. No entanto, no tratamento de animais experimentalmente infectados quando usado uma dose de 12 mg / kg não apresentou efetividade (Reimão *et al.*, 2011). Estes fármacos mostraram-se como potenciais candidatos a agentes antileishmania, podendo ser explorados como compostos líderes e protótipos de fármacos.

A nitazoxanida, um derivativo sintético nitrotiazolil-salicilamida, aprovado para tratar infecções diarréicas causadas por diversos protozoários e vírus parasitos do trato gastrointestinal, apresentou atividade antileishmania com CE<sub>50</sub> de 42 µg / mL contra promastigotas e 6,8 µg / mL contra amastigotas, causando alterações no metabolismo celular, pela despolarização da membrana mitocondrial e regulando positivamente a produção de espécies reativas de

oxigênio, também provocou condensação da cromatina nuclear, inchaço da mitocôndria e bolhas na membrana plasmática (Mesquita *et al.*, 2013).

Recentemente foi descrito pela primeira vez por nosso grupo que os antagonistas de receptores histamínicos H1, inibidores de liberação de histamina em mastócitos, usados no tratamento de alergias e como ansiolíticos, apresentaram atividade antileishmania (Pinto *et al.*, 2014). Os setes fármacos testados (clorfeniramina, cinarizina, hidroxizina, cetotifeno, loratadina, quetiapina e risperidona) demonstraram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum* com CE<sub>50</sub> de 13 a 84 µM, dentre eles a cinarizina demonstrou efetividade contra amastigotas com uma CE<sub>50</sub> de 21 µM. Quando usada no tratamento de hamsters infectados com *L. (L.) infantum*, numa dose de 50 mg / kg pela via intraperitoneal (IP) e a 100 mg / kg por via oral por oito dias consecutivos, não reduziu a carga parasitária no baço e fígado. No entanto, quando encapsulada em lipossomas e administrada numa dose 17 vezes menor, pela via IP a 3 mg / kg durante oito dias, houve uma redução de 54 % da carga parasitária no fígado, quando comparado ao grupo não tratado (Pinto *et al.*, 2014). Estes dados ressaltam a necessidade de avaliação de outros fármacos anti-histamínicos e elucidação de seu mecanismo de ação para identificar possíveis alvos relacionados com a atividade antiparasitária.

#### **1.4.1. Fármacos Anti-histamínicos de classe H1**

Os fármacos com ação anti-histamínica apresentam diferentes aplicações clínicas, desde o tratamento de doenças alérgicas, não alérgicas e distúrbios do sistema nervoso e estão entre as medicações mais comumente prescritas na prática médica diária, tanto em adultos como em crianças (Criado *et al.*, 2010).

Os antagonistas de receptores histamínicos H1 têm sido utilizados por mais de 70 anos. Atualmente, mais de 45 fármacos estão disponíveis mundialmente, compreendendo a maior classe de medicamentos usados para o tratamento de doenças alérgicas (Simons e Simons, 2011).

Os anti-histamínicos são diferenciados em primeira e segunda geração. Os de primeira geração ou clássicos são fármacos lipofílicos e classificados em seis diferentes classes de acordo com a sua estrutura química: etanolamina, etilenodiamina, alquilamina, piperazina, piperidina e fenotiazina (Simons e Simons, 2011); são rapidamente absorvidos e metabolizados, o que significa que eles devem ser administrados de três a quatro vezes ao dia; devido a sua estrutura molecular lipofílica, cruzam mais facilmente a barreira hematoliquórica, além de não se comportarem como substrato da glicoproteína P no endotélio dos vasos da barreira hematoliquórica, ligando-se assim aos receptores H1 cerebrais e originando seu principal efeito adverso: a sedação (de Benedictis *et al.*, 2008). Já os de segunda geração, são substâncias desenvolvidas nos últimos 25 anos, algumas derivadas dos anti-H1 de primeira geração, porém oferecendo maiores vantagens em relação aos compostos de primeira geração, em decorrência de apresentarem menores efeitos anticolinérgicos ou sedativos (Bartra *et al.*, 2006).

Os anti-histamínicos investigados neste estudo são fármacos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA – EUA), e estão em uso clínico por muitas décadas, demonstrando sua eficácia e segurança. A cinarizina e a meclizina são usadas para o tratamento de vômitos e enjôos. A cinarizina também apresenta propriedade vasodilatadora, devido ao bloqueio dos canais de cálcio. A ciproheptadina é indicada para o tratamento de rinites e conjuntivites alérgicas, urticárias, angioedema e terapia de reação anafilática, também é um antagonista de receptores de serotonina, usado em casos de anorexia e dores de cabeça. A cinarizina, ciproheptadina e meclizina são anti-histamínicos pertencentes a primeira geração. A fexofenadina e a cetirizina são indicadas no tratamento de rinite e alergias. A cetirizina também é indicada no tratamento de urticária crônica e asma induzida por pólen. A fexofenadina e a cetirizina são anti-histamínicos de segunda geração (Wishart *et al.*, 2006).

### **1.5. Marcadores moleculares e celulares de resposta terapêutica em *L. (L.) infantum***

A identificação de marcadores moleculares e celulares de reposta terapêutica em *Leishmania*, é um importante meio para se conhecer o mecanismo de ação de fármacos (Fidalgo e Gille, 2011).

Um dos aspectos característicos no processo de desenvolvimento de um fármaco, é a identificação de enzimas pertencentes as vias metabólicas que possam ser diferentes ou até ausente daquelas encontradas no parasito em relação ao hospedeiro, de tal modo que sejam exploradas como um alvo para os fármacos (Singh *et al.*, 2012). Tais enzimas são consideradas vitais para o crescimento e sobrevivência do parasito dentro da célula hospedeira. Explorar tais diferenças pode levar ao desenvolvimento de novos inibidores que irão seletivamente eliminar os parasitos sem causar maiores danos ao hospedeiro (Conceição-Silva e Alves, 2014).

Desde que as sequências do genoma de *Leishmania* se tornaram disponíveis as técnicas de PCR quantitativo em tempo real (qPCR): usado para análise simultânea de um conjunto específico de genes em grandes coleções de amostras (Vandesompele *et al.* 2002), vêm rapidamente ganhando popularidade e estão se tornando uma ferramenta importante para a seleção de candidatos a fármacos na terapia da leishmaniose, bem como um maior entendimento da interação do parasito com o seu hospedeiro (Silva-López, 2010). Além disso, a qPCR apresenta uma série de vantagens quando comparado com outras técnicas de amplificação convencional: quantificação simples de ácidos nucléicos, as amostras não precisam ser manipuladas após a realização do processo, detecção de variabilidade das sequências amplificadas através da realização da curva de dissociação, além de ser rápido e automatizado (Traub *et al.*, 2005).

Análises de expressão gênica indicam possíveis alvos relacionados ao mecanismo de resistência de espécies de *Leishmania* frente aos fármacos de uso clínico (Decuyper *et al.*, 2005; Mukherjee *et al.*, 2007). Estes alvos também podem ser utilizados como marcadores moleculares envolvidos na resposta terapêutica, permitindo a quantificação e a comparação da efetividade de

fármacos, tornando uma ferramenta útil para projetar novos compostos ativos com toxicidade seletiva contra esses parasitos (Fidalgo e Gille, 2011). Em vista disto, diversos alvos potenciais de fármacos têm sido descritos em espécies de *Leishmania*, tais como: enzimas da biossíntese de poliaminas, peptidases, enzimas do metabolismo de tióis, enzimas da maquinaria glicosomal, quinases dependentes de ciclinas, enzimas da biossíntese de esterol, entre diversas outras (Singh *et al.*, 2012).

Alterações provocadas na mitocôndria também são bastante exploradas como alvo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos experimentais sobre o mecanismo de ação das principais drogas antiprotozoários sugerem que a mitocôndria pode ser considerada como um dos alvos mais importantes para os protozoários. Diferentes possíveis alvos podem ser identificados na mitocôndria, relacionados à morfologia, composição e funcionalidade, tais como: cadeia de transporte de elétrons, oxidase alternativa, DNA do cinetoplasto (kDNA), topoisomerase, síntese de esterol e ácidos graxos, potencial de membrana mitocondrial, espécies reativas de oxigênio (ERO) e morte celular (Fidalgo e Gille, 2011).

A seguir uma sucinta descrição de alguns dos principais alvos terapêuticos discutidos em *Leishmania*.

### **1.5.1. Membrana plasmática**

As células dos seres vivos são envolvidas pela membrana plasmática. Esta desempenha importante função de separação entre o ambiente extracelular e intracelular, e atua de forma seletiva e específica interligando esses dois compartimentos (Silva *et al.*, 2014).

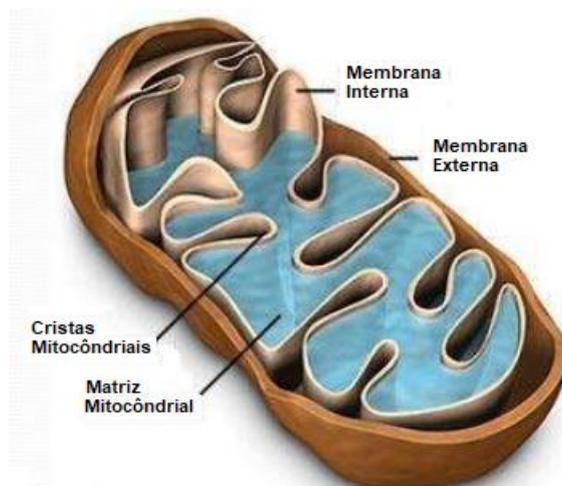
A membrana plasmática de *Leishmania* apresenta como principal esterol da bicamada lipídica, o ergosterol que substitui o colesterol encontrado nas células dos hospedeiros e o gradiente eletroquímico nesses parasitos é mantido por bombas H<sup>+</sup>-ATPases, semelhantes as encontradas em fungos e leveduras, ao invés de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase (Zilberstein e Dwyer, 1988). Essa similaridade entre a membrana plasmática de fungos e leveduras, permitiu o reposicionamento da anfotericina B (deoxicolato), um antibiótico poliênico com

atividade antifúngica para o tratamento das leishmanioses. Como mecanismo de ação, a interação da anfotericina B com o ergosterol do parasito, leva a formação de poros que atravessam a bicamada lipídica e altera a permeabilidade a íons, água e solutos, levando o parasito a morte. Por apresentar uma função vital e ser constitutivamente diferente do hospedeiro, a membrana plasmática representa um alvo potencial para o desenvolvimento de novos quimioterápicos para a *Leishmania* (Saha *et al.*, 1986; Chattopadhyaya e Jafurulla, 2011).

### 1.5.2. Mitocôndria

Enquanto que centenas a milhares de mitocôndrias podem ser detectadas em células de mamífero, os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam uma única mitocôndria, altamente ramificada, distribuída por todo o corpo do parasito (Vannier-Santos *et al.*, 2002; Fidalgo e Gille, 2011). Portanto, a manutenção da função da mitocôndria na *Leishmania* é muito importante em comparação com as células de mamíferos, porque a presença de múltiplas mitocôndrias garante a compensação para as com problemas funcionais. Assim, a sobrevivência de organismos com uma única mitocôndria depende da função adequada desta organela (Mehta e Shaha, 2004).

A mitocôndria (Figura 17) possui uma membrana externa que constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol. Também possui paralelamente uma membrana interna, que tem pequenas porções invaginadas para o interior da matriz denominadas cristas mitocondriais, onde estão localizados o sistema de elétrons e os transportadores. Já na matriz mitocondrial, próxima a base do flagelo estão presentes enzimas metabólicas e o cinetoplasto (Heller *et al.*, 2012). O cinetoplasto é a região que possui o mais complexo DNA mitocondrial (aproximadamente 15% do DNA celular total) encontrado na natureza (Lukes *et al.*, 2002).



**Figura 17:** Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial e indicação da membrana externa, membrana interna, das cristas e da matriz mitocondrial. Fonte adaptada de LHSC, 2019.

Na membrana interna está localizada a cadeia respiratória formada por diferentes complexos, que produz ATP em um processo baseado na transferência de elétrons com extrusão de prótons de hidrogênio ( $H^+$ ) para o espaço intermembranar, gerando um potencial elétrico através das membranas mitocondriais. O potencial elétrico de membrana mitocondrial é a diferença de potencial elétrico entre os meios intra e extracelular. Esse é vital porque mantém o funcionamento da cadeia respiratória, a síntese de ATP além de controlar os níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a homeostase de  $Ca^{+2}$  intracelular do parasito (Perry *et al.*, 2011).

A principal produção de ERO ocorre durante a respiração mitocondrial a partir da redução de oxigênio, sendo os mais conhecidos: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^-$ ). Estas espécies fazem parte dos processos metabólicos normais em todos os organismos aeróbios onde a mitocôndria é uma importante fonte intracelular de ERO pois, do total de  $O_2$  mitocondrial consumido, 1 a 2% acaba resultando na formação de ERO (Circu e Aw, 2010). Quando os níveis das ERO excedem a capacidade de neutralização dos sistemas antioxidantes, o desequilíbrio gerado é chamado de estresse oxidativo e causam danos a distintos componentes celulares tais como DNA, proteínas, lipídeos e açúcares (Lejay *et al.*, 2012, Sies, 2014).

Por ser uma organela única que desempenha um papel crucial em vários processos metabólicos do parasito, a mitocôndria vem sendo amplamente

estudada e possui diversos alvos terapêuticos com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos (Fidalgo e Gille, 2011).

### **1.5.3. Biossíntese de esteróis**

Os esteróis são importantes componentes da membrana celular e são vitais para a função e manutenção da estrutura celular. Ao contrário das células de mamíferos que apresentam o colesterol como principal esteroide de membrana, tripanossomatídeos sintetizam o ergosterol e outros esteróis 24-metilo que são essenciais para o seu crescimento e viabilidade. Esses esteróis estão ausentes em células de mamíferos. Portanto, a via de biossíntese de esteróis em *Leishmania* é considerada como um alvo importante de fármacos (Chawla e Madhubala, 2010).

Vários inibidores da biossíntese de esteróis foram identificados como agentes antileishmania como algumas enzimas indispensáveis à síntese dos ergostanos, que podem ser inibidas ou reguladas por fármacos, como os compostos azólicos (cetoconazol e itraconazol). Contudo, a resposta clínica frente ao tratamento com essa classe de fármacos depende da espécie de *Leishmania* (Soares-Bezerra, *et al.*; 2004).

### **1.5.4. Biossíntese de folato**

Folatos são importantes cofatores usados em uma variedade de vias metabólicas como a síntese de DNA, RNA e o metabolismo de aminoácidos. Uma vez que são essenciais para o crescimento, as enzimas envolvidas na sua síntese têm sido de interesse como alvo de fármacos, em particular a timidilato sintase (TS) e diidrofolato redutase (DHFR), que faz a redução do ácido diidrofólico a ácido tetraidrofólico, importante cofator na síntese de timidina. Por conseguinte, a inibição da biossíntese de DHFR impede a síntese de timidina e, como consequência, a biossíntese de DNA (Soares-Bezerra *et al.*, 2004).

### 1.5.5. Enzimas do metabolismo de tiol

Em *Leishmania*, enzimas pertencentes ao metabolismo de tiol são essenciais na defesa antioxidante por regular as concentrações de espécies de nitrogênio e reativas de oxigênio (Flohe *et al.*, 1999).

A síntese da tripanotiona (bis- (glutationilo) espermidina) é catalisada por duas enzimas chamadas tripanotiona sintetase (TS) e tripanotiona redutase (TR). TS catalisa a síntese tripanotiona de duas moléculas de glutatona e de espermidina. A tripanotiona é então mantida na sua forma reduzida pela enzima TR e cofator NADPH (Fairlamb *et al.*, 1985), sendo a forma reduzida responsável na detoxificação de espécies de nitrogênio e reativas de oxigênio produzido no processo de estresse oxidativo (Flohe *et al.*, 1999).

A TR é similar quanto a sequência e estrutura ao seu homólogo humano, glutatona redutase. No entanto, o local ativo da TR mostra cinco alterações não conservadoras, dando a esta enzima, especificidade ao seu substrato. Assim, a via tripanotiona fornece um promissor alvo para o desenvolvimento de fármacos porque além de diferente no hospedeiro mamífero, o parasito não apresenta mecanismos alternativos eficientes de proteção contra o estresse oxidativo (Chawla e Madhubala, 2010). Além disso, estudos demonstraram que a inibição enzima TR limita o crescimento e a capacidade de sobrevivência dos parasitos dentro de macrófagos (Dumas *et al.* 1997; Tiwari *et al.*, 2018).

### 1.5.6. Via glicolítica

Os tripanossomatídeos, como as espécies de *Leishmania*, são altamente dependentes da glicólise para a produção de ATP, e como muitas enzimas glicolíticas apresentam características próprias, elas foram consideradas como potenciais alvos para novos agentes quimioterápicos. Desta forma, a maioria dos estudos realizados e relatados na literatura envolve as enzimas de tripanossomatídeos: frutose-1,6-difosfato aldolase, triosefosfato isomerase, gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, fosfoglicerato quinase, piruvato quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase (Verlinde *et al.*, 2001).

Dentre as enzimas da via glicolítica de tripanossomatídeos, a que vem despertando maior interesse é a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GADPH). Esta enzima catalisa a fosforilação oxidativa de D-gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bisfosfoglicerato na presença de NAD<sup>+</sup> e fosfato inorgânico (Melos e Echevarria, 2012).

Nos tripanossomatídeos, o metabolismo parcial de carboidratos, incluindo a glicólise, é compartimentalizado em uma organela específica chamada glicosomo. A biogênese destas organelas e a correta compartimentalização de enzimas glicolíticas é assim essencial para esses parasitos (Tielens e Hellemond, 1998).

A alta dependência da via glicolítica para a obtenção de energia pelos tripanossomatídeos, a organização particular das enzimas dessa via no glicosomo e a ocorrência de características estruturais únicas de muitas enzimas envolvidas na glicólise explica o motivo pelo qual essas enzimas se tornam alvos promissores na busca por novos fármacos para o tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos (Tielens e Hellemond, 2009; Chawla e Madhubala, 2010).

## **1.6. Justificativa**

Como apresentado anteriormente, a leishmaniose é um complexo de doença infecciosa de ampla distribuição geográfica e elevada incidência global. No entanto, seu tratamento ainda é restrito e está enquadrada no rol de doenças negligenciadas. Entre os fatores de dificuldade terapêutica estão: (i) a descontinuidade no tratamento por conta de reações adversas causadas pelos medicamentos atualmente utilizados, (ii) acarretando no surgimento de cepas resistentes; (iii) o alto custo do tratamento e; (iv) via de administração dolorosa, intramuscular e intravenosa. Portanto, a busca por novas terapias é uma necessidade urgente, e o reposicionamento de fármacos tem se mostrado uma ferramenta de importância nessa busca.

Em 2014, Pinto e colaboradores analisou a atividade antileishmania de sete fármacos anti-histamínicos H1, entre eles o fármaco cinarizina, apresentou

atividade conta ambas as formas de *L. (L.) infantum*. Os dados obtidos com este estudo sugerem que outros fármacos dessa classe farmacológica podem ser avaliados como potenciais agentes antileishmania. Esses achados estimularam a avaliação antiparasitária de outros quatro fármacos anti-histamínicos: ciproheptadina, cetirizina, fexofenadina e meclizina. Além de avaliar as alterações celulares e moleculares de genes que codificam proteínas para diferentes funções.

Os dados obtidos com este estudo contribuirão na identificação de novas abordagens terapêuticas para o tratamento das leishmanioses, ampliando o restrito arsenal terapêutico. Além disso, poderão fornecer subsídios para um melhor entendimento do mecanismo de ação dos fármacos com atividade antileishmania. Através das ações realizadas, acredita-se que a identificação de alterações celulares e moleculares relacionadas à resposta terapêutica, permitirá uma avaliação mais precisa e rápida sobre o potencial farmacológico. Este estudo, além de apresentar resultados diretos para o tratamento das leishmanioses, com o desenvolvimento de novas alternativas, apresenta um grande potencial como sistema de avaliação de resposta terapêutica de vários tipos de drogas.

## 2. OBJETIVO

Este trabalho teve por objetivo geral avaliar a atividade antileishmania de fármacos anti-histamínicos, identificar marcadores moleculares e celulares relacionados à resposta terapêutica usando um sistema de infecção *in vitro*.

### 2.1. Objetivo Específico

1. Avaliar a concentração efetiva 50 % *in vitro* contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum* dos fármacos anti-histamínicos: cetirizina, cinarizina, ciproheptadina, fexifenadina e meclizina;

2. Avaliar a concentração citotóxica 50 % dos mesmos fármacos *in vitro* em células de mamífero;

3. Avaliar as alterações celulares de promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos anti-histamínicos ativos por fluorimetria como: permeabilidade da membrana plasmática, produção de espécies reativas de oxigênio, potencial de membrana mitocondrial e determinação de tiol intracelular;

4. Avaliar as alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos anti-histamínicos ativos por microscopia eletrônica de transmissão;

5. Padronizar a metodologia de qPCR para identificar marcadores moleculares de resposta terapêutica em promastigotas de *L. (L.) infantum*;

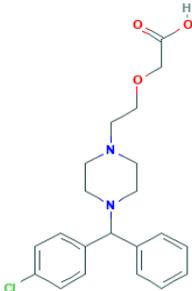
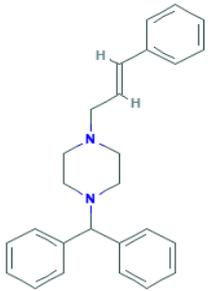
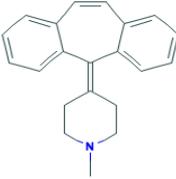
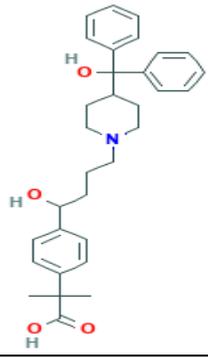
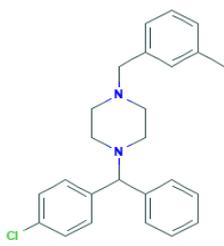
6. Comparar o perfil de expressão gênica de promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos anti-histamínicos ativos com os parasitos não tratados.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Fármacos**

Os fármacos cetirizina (CTZ), cinarizina (CNZ), ciproheptadina (CPH), fexofenadina (FXD) e meclizina (MCZ) (Tabela 4) foram gentilmente doados pelo Prof. Drº Humberto Gomes Ferraz (Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - FCF-USP). Os fármacos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) ( $C_2D_6OS$ ; MW = 84,17 g / mol; CAS 2206-27-1) obtido pela Merck (solução estoque de 30 mM), e armazenados a -20 °C. A miltefosina (MTF) foi adquirida pela Sigma-Aldrich, dissolvida em água filtrada.

**Tabela 4:** Fármacos anti-histamínicos avaliados com respectiva descrição de estrutura química, massa molecular e registro CAS (DrugBank, 2018).

Fármaco	Estrutura Química	Massa Molecular	Registro (CAS)
Cetirizina		388,88 g/mol	83881-51-0
Cinarizina		368,51 g/mol	298-57-7
Ciproheptadina		323,864 g/mol	969-33-5
Fexofenadina		501,667 g/mol	83799-24-0
Meclizina		427,413 g/mol	36236-67-6

### 3.2. Reagentes

O SYTOX® green dye, Rodamina 123 [cloreto 2-(6-amino-3-imino-3H-xanten-9-il) ácido benzoico metil éster] e H2DCf-DA foram adquiridas da Molecular Probes® - Óregon, EUA. Dimetilsulfóxido (DMSO) e Giemsa foram obtidos da Merck - Darmstadt, Alemanha. Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640), meio 199 (M199), Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), salina tamponada com fosfato (PBS), metanol 99,9% puro, sulfato de sódio ultrapuro (SDS) e MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio] foram adquiridos da Sigma - Missouri, EUA. Soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da GIBCO (Thermo Fisher Scientific) - Massachusetts, EUA. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos da Sigma.

### 3.3. Parasitos, células de mamífero e animais de experimentação

#### 3.3.1. *Leishmania (Leishmania) infantum*

Os amastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram extraídos do baço de hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), após de 60 - 70 dias da infecção, e purificadas por centrifugação diferencial. A infecção foi avaliada pelo método de Stauber e colaboradores (1958). Para a manutenção da cepa do protozoário, quinzenalmente foi realizado inóculos na concentração de  $1 \times 10^8$  parasitos/hamster em 500  $\mu$ L de solução de PBS, pela via intraperitoneal.

Os promastigotas de *L. (L.) infantum* (MHOM/BR/1972/LD) foram mantidos com meio M199 suplementado com 10% de SFB inativado (banho-maria a 56°C por 30 minutos), 0,25% de hemina, antibióticos e 5% de urina humana, incubadas em estufa tipo B.O.D. a 25 °C.

### **3.3.2. Células de mamífero**

Células de tecido conjuntivo de camundongo (NCTC clone L929) foram cultivadas em meio de cultura M-199, suplementado com 10% de SFB inativado e antibióticos, incubadas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C.

Macrófagos peritoneais foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c (*Mus musculus*), através de massagem e lavagem com meio RPMI 1640, suplementado com 10 % SFB e mantidos em estufa com 5 % CO<sub>2</sub> em temperatura de 37 °C.

### **3.3.3. Animais de experimentação**

Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, recém-desmamados (cerca de 21 dias após nascimento), com peso entre 50 - 70 g. Camundongos (*Mus musculus*) BALB/c, fêmeas, pesando entre 20 e 25 g. Ambas espécies foram fornecidas pelo biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo (IAL - SP). Todos os animais foram mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, dispostas em ambiente com controle de luminosidade, umidade relativa do ar e temperatura. Os animais foram alimentados com ração comercial autoclavada e água filtrada à vontade.

### **3.3.4. Comissão de ética no uso de animais**

Todos os procedimentos realizados com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Adolfo Lutz (CEUA - IAL nº 08/2014).

### **3.4. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>) e concentração efetiva 90 % (CE<sub>90</sub>) dos fármacos anti-histamínicos**

#### **3.4.1. Ensaios com promastigotas**

Os promastigotas foram contados em hemocitômetro (câmara de Neubauer) e  $2 \times 10^6$  células / poço foram plaqueadas com meio M-199 em microplaca de 96 poços. Os fármacos foram dissolvidos em DMSO, e serialmente diluídos com fator de diluição base 2 em meio de cultura e incubados com os parasitos, por 1 hora, 2 horas, 4 horas, 24 horas a 25 °C em estufa tipo B.O.D. A viabilidade dos parasitos foi verificada pelo ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio] (Tada *et al.*, 1986). Resumidamente, o MTT é um método colorimétrico rápido, usado para medir viabilidade celular. O MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico (de cor amarela) deste sal resulta na formação de cristais de formazan (de cor azul), que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose, sendo a endocitose um mecanismo fundamental das células vivas. A quantidade de conversão do corante em solução pode ser medida por espectrometria UV visível. Desta forma, 20 µL da solução de PBS contendo MTT (5 mg / mL) foi adicionada em cada poço. Após 4 horas de incubação a 25 °C, foi adicionado 80 µL/poço de SDS 10% por 18 horas a 25 °C. A medida foi realizada em espectrofotômetro (FilterMax F5 Multi-Mode Microplate Reader - Molecular Devices®) no comprimento de onda de 570 nm. Como controle, foram utilizados parasitos incubados apenas com meio de cultura (100% de viabilidade) e a miltefosina foi utilizada como fármaco padrão (Pinto *et al.*, 2014).

#### **3.4.2. Ensaios com amastigota**

Macrófagos peritoneais coletados de camundongo BALB/c foram plaqueados ( $1 \times 10^5$  macrófagos / poço) em microplaca de 16 poços (NUNC®) e

incubados por 24 horas a 37 °C em estufa com 5 % CO<sub>2</sub> para aderência na placa. Após a incubação, amastigotas de *L. (L.) infantum* isolados de baço de hamsters previamente infectados foram purificadas por centrifugação diferencial e adicionados aos macrófagos na proporção de 1:10 (macrófagos / amastigotas) e incubados nas mesmas condições por mais 24 horas. Os parasitos não internalizados foram removidos por lavagem com PBS e os macrófagos infectados foram tratados com os fármacos cetirizina, cinarizina, ciproheptadina, fexofenadina e meclizina durante 120 horas nas mesmas condições. Ao final do tratamento, os macrófagos foram fixados com metanol, corados com Giemsa e observados em microscópio óptico comum com objetiva de imersão (100x) (Reimão *et al.*, 2012).

### 3.4.3. Ensaio de citotoxicidade

A determinação da concentração citotóxica 50 % e 90 % (CC<sub>50</sub> e CC<sub>90</sub>) em células de mamíferos foi avaliada em células NCTC (6x10<sup>4</sup> células/poço) semeadas em placas de 96 poços. Os fármacos (cetirizina, cinarizina, ciproheptadina, fexofenadina e meclizina) foram dissolvidos em DMSO, serialmente diluídos com fator de diluição de base 2 (200 µM até 3,12 µM) em meio RPMI com 10% de SFB incubados por 48 horas a 37 °C em estufa com 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade foi verificada através do ensaio colorimétrico com MTT, conforme descrito anteriormente e incubada sob as mesmas condições por 4 horas. Após a incubação, foi adicionado 80 µL / poço de SDS 10% por 18 horas a 25 °C. Como controle foi usado células incubadas apenas com meio de cultura (100 % de viabilidade) e a miltefosina foi utilizada como fármaco padrão.

A determinação do Índice de Seletividade (IS) foi avaliada através da seguinte fórmula:

$$IS = \frac{\text{Citotoxicidade (CC}_{50} \text{ em células de mamífero)}}{\text{CE}_{50} \text{ em amastigota}}$$

### **3.5. Avaliação de alteração celular em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos**

#### **3.5.1. Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática**

Os promastigotas (fase final de crescimento) foram lavados em PBS e  $2 \times 10^6$  células / poço foram plaqueadas em placa de cultura preta de poliestireno e incubadas com a sonda fluorescente SYTOX® Green na concentração de 1  $\mu$ M por 15 minutos a 25 °C. Os fármacos (cinarizina, ciproheptadina e meclizina) foram adicionados na concentração  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  e a fluorescência foi medida a cada 20 minutos até 2 horas. A permeabilização máxima foi alcançada com detergente 0,5 % Triton X-100. A intensidade de fluorescência foi determinada usando um espectrofluorímetro (Filter Max F5 Multi - Mode Microplate Reader - Molecular Devices) no comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Os controles internos foram: (i) fluorescência basal dos fármacos nos respectivos comprimentos de onda; (ii) promastigotas incubados com meio (controle negativo); (iii) promastigotas incubados com Triton X-100 (controle positivo) e (iv) meio sem células (branco) (Mesquita *et al.*, 2013).

#### **3.5.2. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )**

Os promastigotas (fase final de crescimento) foram lavados em tampão HBSS e  $2 \times 10^6$  células / poço foram semeadas em placa preta de poliestireno. Os fármacos (cinarizina, ciproheptadina e meclizina) foram adicionados nas concentrações  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  por 1 hora a 25 °C. Posteriormente as células foram incubadas com a sonda fluorescente Rodamina 123 numa concentração de 0,3  $\mu$ g / mL por 10 minutos a 25 °C. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com HBSS e analisadas usando espectrofluorímetro (Filter Max F5 Multi - Mode Microplate Reader - Molecular Devices) no comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 535 nm. Os controles internos foram: (i) fluorescência basal dos fármacos nos respectivos comprimentos de onda; (ii)

promastigotas incubados com meio (controle negativo); (iii) promastigotas incubados com azida sódica, (controle positivo) e (iv) meio sem células (branco) (Lage *et al.*, 2015).

A azida sódica usada como controle positivo nesse estudo atua como inibidor do complexo respiratório IV e despolariza o  $\Delta\psi_m$  (Stannard e Horecker, 1948; Bennett *et al.*, 1996; Campbell, 2006).

### **3.5.3. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)**

Os promastigotas (fase final de crescimento) foram lavados em PBS e  $2 \times 10^6$  células/poço e semeadas em placa de cultura preta de poliestireno. Os fármacos foram adicionados nas concentrações  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$  por 1 hora e 2 horas a 25 °C. Posteriormente as células foram incubadas com a sonda fluorescente permeável celular diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) numa concentração de 5  $\mu M$  por 15 minutos a 25 °C. Após a incubação, as células foram analisadas usando espectrofluorímetro (Filter Max F5 Multi - Mode Microplate Reader - Molecular Devices) no comprimento de onda de excitação de 485 nm e emissão de 520 nm. Os controles internos foram: (i) fluorescência basal das drogas nos respectivos comprimentos de onda; (ii) promastigotas incubados com meio (controle negativo); (iii) promastigotas incubados com azida sódica (controle positivo) e (iv) meio sem células (branco) (de Macedo-Silva *et al.*, 2011).

### **3.5.4. Avaliação de ultraestruturas celulares**

Os promastigotas (fase final de crescimento) foram lavados em tampão PBS e  $2 \times 10^7$  células/poço foram semeadas em microplaca placa de poliestireno. Os fármacos (cinarizina, ciproheptadina e meclizina), foram adicionados nas concentrações  $CE_{90}$  por 30 minutos, 1, 2, 4 e 6 horas a 25 °C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes em PBS e fixadas em solução de 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 M/ sacarose 0,2 M (pH 7,2), pós-fixadas

em solução de 1% OsO<sub>4</sub>, e tratadas com 1% acetato de uranila. As amostras foram desidratadas em acetona embebida em Epon. As seções foram coradas em acetato de uranila e citrato de chumbo. Os materiais foram examinados no microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1011; Peabody, MA, EUA). Os controles internos foram: (i) parasitos incubados com o solvente utilizado para diluir os fármacos (DMSO), (ii) promastigotas incubados com meio (controle negativo).

### **3.5.5. Avaliação de tiol intracelular**

A concentração de tiol intracelular foi determinada em promastigotas de *L. (L.) infatum* nas concentrações CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> por duas horas utilizando o kit comercial de detecção de tiol (Cayman Chemical Company, MI, EUA) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 1x10<sup>7</sup> promastigotas (fase final de crescimento) foram concentrados por centrifugação a 2000 rpm por 10 minutos. Após lavagem com PBS (pH 7,4) o precipitado celular foi homogeneizado em 1 mL de tampão gelado (100 mM Tris-HCl, pH 7,5, contendo 1 mM de EDTA) e centrifugado a 13000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi coletado (50 µL) e adicionado em microplaca preta. A concentração de tiol foi estimada utilizando os comprimentos de onda de excitação de 390 nm e emissão de 520 nm. A concentração de tiol foi calculada usando a equação obtida da regressão linear da curva padrão (Deep *et al.*, 2017).

### **3.5.6. Análise estatística**

Os dados obtidos foram avaliados usando a média e o erro padrão da média (EP) de três experimentos independentes realizados em duplicata. A determinação de CE<sub>50</sub> e CE<sub>90</sub> foi calculada usando o software GraphPad Prism 5.02 (GraphPad Software), através de uma curva sigmóide de dose-resposta e o intervalo de confiança (IC 95 %) foi incluído. A significância estatística entre

amostras foi avaliada através dos valores de P pelo método One-way ANOVA, aplicando o teste Tukey's Multiple Comparison.

### **3.6. Avaliação de alteração molecular em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos**

#### **3.6.1. Padronizações de qPCR para avaliação da expressão gênica em promastigotas de *L. (L.) infantum***

Ensaio de biologia molecular utilizando a metodologia da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para avaliação da expressão gênica exibem sensibilidade e especificidade de ensaio para ensaio, portanto, é obrigatório a padronização da metodologia para cada nova abordagem empregada. Para a segurança e confiabilidade dos dados, após o tratamento das amostras biológicas, todas as etapas foram padronizadas e registradas a seguir.

O perfil de expressão gênica de promastigota de *L. (L.) infantum* foi analisado com o objetivo de identificar alterações moleculares causadas após o tratamento com os fármacos.

#### **3.6.2. Tratamento e preparo das amostras biológicas**

Os promastigotas de *L. (L.) infantum* (fase final de crescimento) foram lavados em PBS e plaqueados ( $2 \times 10^7$  células / poço) em microplaca de cultura. Os fármacos (cinarizina, ciproheptadina e meclizina) foram adicionados na concentração de  $CE_{50}$  por 1 hora a 25 °C. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS, e suspensas em solução de preservação RNA later (Ambion). Depois as amostras foram armazenadas a - 80 °C.

### **3.6.3. Extração de RNA total**

Após o descongelamento das amostras, a solução de preservação foi removida por centrifugação (5000 rpm por 10 min). A extração de RNA foi realizada usando o Kit PureLink RNA Mini (Ambion) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, as amostras foram suspensas em 600 µL de tampão de lise com 2-mercaptoetanol e homogeneizadas usando um disruptor de células (TissueLyser LT, Qiagen). Em seguida, foi adicionado 700 µL de etanol 70%, as amostras foram agitadas vigorosamente por 10 min e centrifugadas a 12000 rpm por 15 segundos. As amostras então foram transferidas para uma membrana à base de sílica inserida a um tubo coletor e submetidas a dois ciclos de lavagens com 700 µL de Wash Buffer I, seguido de centrifugação a 12000 rpm por 15 segundos e a troca do tubo coletor. Após foi adicionada 500 µL de Wash Buffer II, centrifugação de 12000 rpm por 15 segundos, com a troca do tubo coletor por microtubo de 1,5 mL. Depois o RNA foi precipitado em 30 µL de água livre de RNase. Em seguida as amostras foram tratadas com DNase-free (Ambion) para evitar eventuais contaminantes com DNA genômico e armazenadas a - 80 °C.

### **3.6.4. Quantificação e análise da qualidade de RNA total extraído**

A pureza do RNA extraído foi determinada usando o espectrofotômetro Nanodrop modelo ND100 (Thermo Fischer Scientific®). A pureza foi avaliada através da razão entre dois valores de absorvância nos comprimentos de onda: (i) A260 / A280 nm para identificar contaminação protéica e (ii) A260 / A230 nm para identificar contaminação por solventes orgânicos.

A concentração do RNA foi determinada usando o kit QuantiFluor RNA System no fluorímetro Quantus (Promega).

A integridade e qualidade do RNA foi determinada por eletroforese em microcapilar usando o kit RNA 6000 NanoLabchip no Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) conforme instruções do fabricante.

### **3.6.5. Síntese de DNA complementar (cDNA) e Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)**

O cDNA foi sintetizado a partir de aproximadamente 100 ng do RNA total utilizando a enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) com oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen) a 55 °C, com volume final de 20 µL de reação. O cDNA resultante de cada amostra foi diluído 10 vezes e 2 µL foi adicionado ao volume total de 25 µL das reações de qPCR, contendo 1X Kapa SYBR Fast q- Kit Master Mix (Kapa Biosystems) e oligonucleotídeos. Concomitantemente, foi realizada a mesma reação sem a enzima transcriptase reversa (RT-), para confirmar a ausência de DNA genômico nas amostras.

Para a análise do perfil de expressão gênica foram utilizados diversos genes que codificam para proteínas com diferentes funções conforme apresentado na Tabela 5 (Decuypere *et al.*, 2005; Decuypere *et al.*, 2008; Deep *et al.*, 2017). A reação foi realizada no Sistema Step One Real-time PCR (Applied Biosystems) usando o seguinte protocolo: 95 °C por 3 minutos (desnaturação), seguido por 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C (desnaturação), 20 segundos a 60 °C (anelamento) e 20 segundos a 72 °C (extensão). A qPCR foi imediatamente seguida de uma análise de curva de dissociação no qual ocorreu um aumento progressivo na temperatura de 0,5 °C a cada 10 segundos, partindo de uma temperatura de 60 °C até chegar a 95 °C. Os seguintes controles foram incluídos para cada corrida de cada gene da qPCR: (i) controle negativo da síntese de cDNA (reação sem a enzima transcriptase reversa, RT-), (ii) branco (tampão submetido a todas as etapas do processo), (iii) controle negativo sem amostra de cDNA (“no-template control”, NTC) e (iv) calibrador (amostra sem tratamento). Todas as reações foram realizadas em triplicata e a média aritmética do “quantification cycle” (Cq) ou “threshold cycle” (Ct) foi usada para a análise dos dados.

**Tabela 5:** Características, sequência e identificação dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

Gene	Produto	Função	Identificação GeneDB	Sequência (5'-3')	Conc final (nM)	Fonte
AQP1-F	Aquagliceroporina 1	Proteína de canal integrado de membrana para transporte de água e pequenos solutos	LinJ.31.0020	CTGTGTCTTTGGTGCCTTTCC	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
AQP1-R				GCCTTTTGGGCGTCGTC	400	
MRPA-F	Proteína multidrogas resistente A	Transportador intracelular ABC, envolvido no sequestro de conjugado metal-tiol	LinJ.23.0290	CGAAAGTTGAGCAGGAGACG	300	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
MRPA-R				AATCCCCAAGCAGCCAGAC	300	
PRP1-F	Proteína de resistência à pentamidina 1	Transportador intracelular ABC, envolvido resistência a pentamidina	LinJ.31.1810	TGATTCCCTTTTTGGGCATTA	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
PRP1-R				CGTAGAACTTGAGCAGGAGCAC	400	
ACR2-F	Arsenato redutase 2	Atividade de proteína tirosina fosfatase e metal-redutase na presença de glutatona	LinJ.32.3240	GCCCAGTCGCTCATACGG	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
ACR2-R				AGAACGCCTCCCACCCAC	400	
TDR1-F	Redutase tiol-dependente 1	Atividade enzimática associada com glutaredoxina (enzima redox, usa a glutatona como cofactor)	LinJ33.0250	GTGGCGAGGATGCGAAGG	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
TDR1-R				CGGACCAGGAAAGGTAGAATAGC	500	

CS-F				GTCTTGGCGGTTTCAGTTTCG	500	
CS-R	Cisteína sintase	Enzima para a biossíntese de cisteína a partir de serina	LinJ.36.3190	GACATTGTGGTTTCGTCTGCTC	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
CBS-F				CGCCGATGTCAACTGGATG	300	
CBS-R	Cistationa $\beta$ -sintase	Enzima para síntese de cisteína da homocisteína via de trans-sulfuração	LinJ.17.0280	GCTCCTTCTTCAGCGTGTCG	300	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
SAT-F				CCCGTATGCTGACAGAGTTGG	400	
SAT-R	Serina acetiltransferase	Enzima para biossíntese de cisteína a partir de serina	LinJ.34.2490	GCCGTGGTGAATGAAGAAGTG	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
GCS-F				TTTGCGTCCTGGTGCCTC	500	
GCS-R	$\gamma$ -Glutamilcisteína sintetase	Enzima chave na biossíntese de glutatona	AY371486	TCAATGTTTAGTTGGGGGTCC	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
ODC-F				ATCCACCTCCAACCCGC	500	
ODC-R	Ornitina descarboxilase	Enzima chave na biossíntese de espermidina	M81192	TCCGCAACAGCAACAACAG	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
TR-F				GGCGAGGTTCTGGGTGTTC	300	
TR-R	Tripanotiona redutase	Oxirredutase central para manutenção do potencial celular redox	Z23135	GACTCCGATGGTGCTGTGG	300	Decuypere <i>et al.</i> , 2008

MST-F	Mercapto-piruvato sulfurtransferase	Redução assimilatória do enxofre e papel putativo na destoxificação de ERO via oxidação da tiorredoxina	LinJ.05.0980	GGAGGAGAACCGCCACAAC	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
MST-R				GCCGCAGGAGAAGACGAAG	500	
S8-F	Proteína Ribossomal S8	Constituinte estrutural da subunidade grande de ribossomo	LinJ.24.1470	GCAGACAGGAAGACCACCAAG	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2008
S8-R				AGCGGCGTGGACGGACT	400	
GS-F	Glutationa sintetase	Biossíntese de tiol; superexpressão ligada à resistência ao Sb(III)	LinJ.14.0670	TGAGGGTCTTCCGAGTGAGG	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2005
GS-R				AAGGCAGGATGGGTGATTC	400	
ATUB-F	Alfa-tubulina	Componente fundamental do citoesqueleto, envolvida na divisão celular, motilidade flagelar e no transporte intracelular	U09612	AGGATGCGGCGAACAACACTAC	300	Decuypere <i>et al.</i> , 2005;
ATUB-R				CAGCGTGGAACACCATAAAGC	300	
CYCL-F	Ciclofilina	Antioxidantes específicos de tiol, reduz o peróxido de hidrogênio, peroxinitrito e hidroperóxidos orgânicos	LinJ.23.0050	CGGGATGAGTCGTTTTCTGG	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2005
CYCL-R				CGTATTGGGACCTGCGTTG	500	
DNAPA-F	DNA polimerase subunidade alfa	Multiplicação e proliferação celular	U78172	GGGCGAGGGCAAGACATAC	200	Decuypere <i>et al.</i> , 2005;
DNAPA-R				GAGAGCGGGCACCAATCAC	200	

PAP-F	Poli (A) polimerase	Determinantes da tradução e estabilidade do mRNA por ligação da cauda poli (A) de mRNA	LinJ.14.0900	GGCAAAGCAAGGTCCATCTACAG	500	Decuypere <i>et al.</i> , 2005
PAP-R				GCACACAAAGGCGGTGAGTATG	500	
PABP-F	Proteína de ligação de poli (A) nuclear	Determinantes da tradução e estabilidade do mRNA por ligação da cauda poli (A) de mRNA	LinJ.30.2650	CCAAGGACGAGGGCACAC	400	Decuypere <i>et al.</i> , 2005;
PABP-R				CGCCGACAAAGATGGAGGT	400	
TRYP-F	Triparedoxina peroxidase	Atividade oxidoreductase	LinJ.15.1120	GCTTCAACGAGCTCAACTGC	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
TRYP-R				CCCTGTTTCTCCTCCAGCAC	400	
CYTB-F	Citocromo b5 redutase	Atividade oxidoreductase	LinJ.15.0050	ACGCCGTTCTTTGGGTACG	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
CYTB-R				TGCCTTCTGAGTCTCCCACC	400	
PGM-F	Fosfoglucomutase putativa	Processo metabólico de carboidratos	Linj.21.0700	CGGCGCTTTTATCTTGACGG	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
PGM-R				TAGGTGCCGAGGGTGTGGAT	400	
LPP-F	Proteína precursora de lipase	Metabolismo lipídico	LinJ.31.0870	TTGGA CT TCTGGCTCACGC	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
LPP-R				AAGGCTGCTGTAAGCGCTG	400	

TSH-F	Tripanotona sintetase putativa	Metabolismo de tiol	LinJ.23.0500	CGAACACATGGACAAGCACG	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
TSH-R				TGAGTCGGTATGCGTACGTG	400	
MDRP-F	Proteína multidroga resistente	Transporte ativo	LinJ.24.1510	CTGTACGACCCCAACGGCTATCAG ACT	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
MDRP-R				GTGCTCCAGGAAGAGGTAGTACAG GCTCAC	400	
ABCF-F	Cassete de ligação de ATP subfamília F	Transporte ativo	LinJ.33.0340	CTCTGCACAGCCATTTCGTAA	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
ABCF-R				CTCTTTTTTCGAACTCCGCAC	400	
TCP-F	Chaperonina TCP20, Putativo	Dobramento de proteína	LinJ.13.1400	AAACTAACCTTGGGCCTCGT	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
TCP-R				GACCACACTCGTACTCCCGT	400	
AAT-F	Transportador de aminoácidos 19, putativo	Transporte ativo	LinJ.07.1340	CACCATGGTCGTGTTCTTTG	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
AAT-R				CGGATTCGCCATCTCATAGT	400	
GAPDH-F	Gliceraldeído-3 fosfato desidrogenase	Enzima glicolítica, catalisa a conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato	LinJ.30.2990	GAAGTACACGGTGGAGGCTG	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
GAPDH-R				CGCTGATCACGACCTTCTTC	400	
ATUB2-F	Alfa-tubulina	Componente fundamental do citoesqueleto, envolvida na divisão celular, motilidade flagelar e no transporte intracelular	LinJ.13.1450	CTACGGCAAGAAGTCCAAGC	400	Deep <i>et al.</i> , 2017
ATUB2-R				CAATGTGCGAGAGAACGACGA	400	

### **3.6.6. Avaliação do desempenho da reação de qPCR pelo método de curva-padrão**

O cDNA de uma amostra com  $1 \times 10^7$  promastigotas de *L. (L.) infantum* foi preparado conforme descrito anteriormente e submetido a diluição seriada base 10, as amostras foram diluídas sucessivamente, contendo de  $1 \times 10^7$  até  $1 \times 10^3$  parasitos, com cinco pontos de diluição, para construção da curva-padrão. A reação foi realizada no Sistema Step One Real-time (Applied Biosystems) usando as mesmas condições de amplificação descritas anteriormente. Para isso foi realizada a qPCR em triplicata e determinação do valor de Cq. Foi verificado: eficiência de amplificação, sensibilidade analítica, linearidade, limite máximo e mínimo de detecção, e repetibilidade. Para cada gene foi construída uma curva-padrão, inserindo o valor de Cq no eixo Y e o valor log da quantidade da amostra diluída no eixo X, uma equação foi obtida da regressão linear da curva-padrão.

### **3.6.7. Prevenção de contaminação cruzada**

Para trabalhos de expressão gênica, cuidados especiais são exigidos a fim de evitar contaminação cruzada. Após a realização dos testes com a divulgação dos resultados devem ser descritos quais medidas foram tomadas para evitar possíveis contaminações (Bustin *et al.*, 2009; Derveaux *et al.*, 2010).

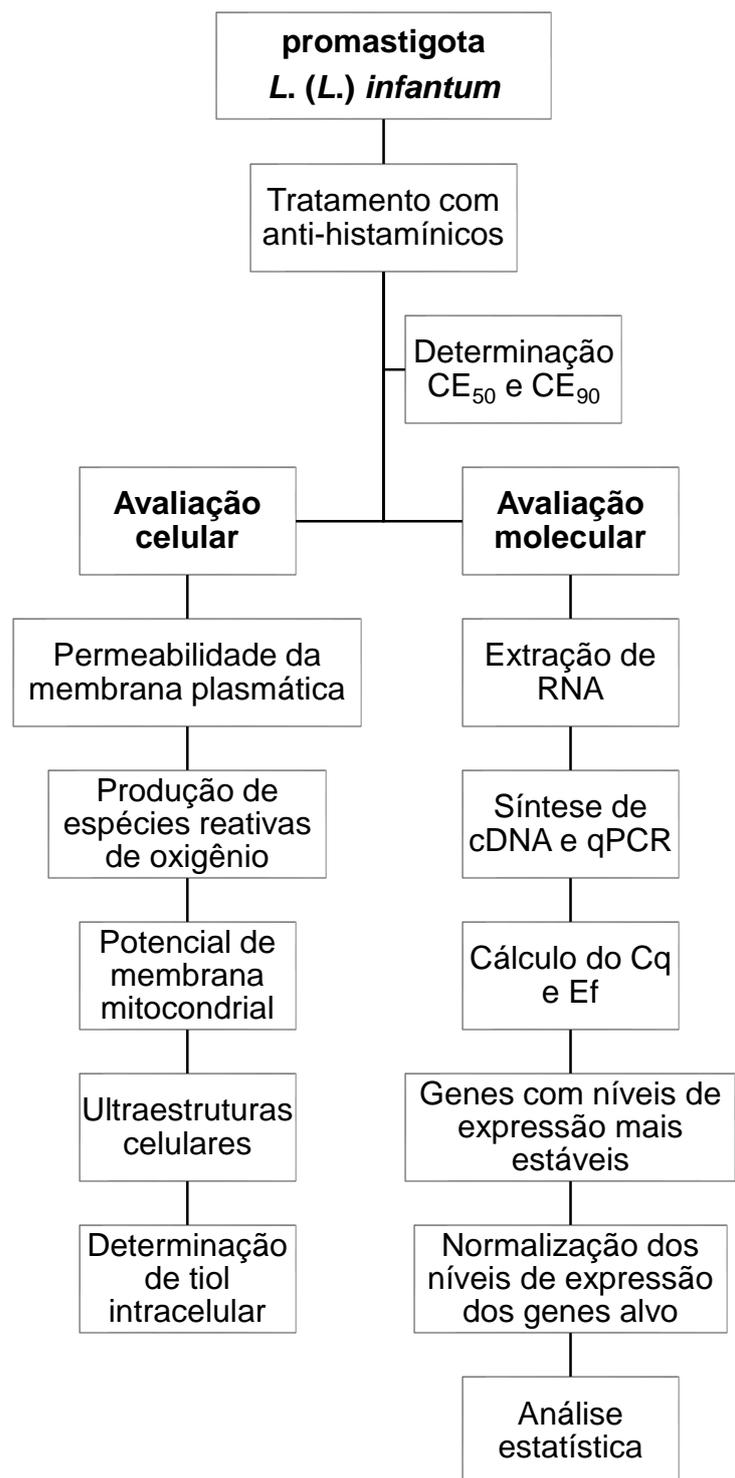
Para reduzir a possibilidade de contaminação dos fragmentos amplificados, os ensaios foram realizados em ambientes separados. Os procedimentos pré e os pós-ensaios ocorreram em três salas diferentes, as luvas foram trocadas com frequência, os reagentes foram previamente aliquotados e foram usados múltiplos controles em cada lote de amostras testadas. Ponteiras equipadas com filtros de vedação foram usadas para a pipetagem dos reagentes e todas as áreas e equipamentos foram descontaminadas com hipoclorito de sódio antes e depois da pipetagem. Além disso, cada cabine de trabalho e sala era equipada com lotes de reagentes, pipetas e materiais plásticos

independentes. Em cada reação de PCR foi incluído um controle negativo (NTC), isto é, um tubo contendo água e mistura de PCR.

### **3.7. Perfil dos níveis relativos de expressão gênica de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos**

A quantificação dos níveis de expressão foi analisada como descrito por Decuypere *et al.*, 2005. O nível de expressão bruta (não normalizado) foi determinado pelo método do delta Cq, isto é, o valor de Cq de um gene para uma amostra foi relacionado com valor de Cq do mesmo gene na amostra com a maior expressão, levando em consideração a eficiência de amplificação do PCR para este gene. Posteriormente, os dados foram processados em conjunto de acordo com Vandesompele *et al.* (2002) usando o método geNorm VBA para MS Excel, o qual determina os genes com expressão mais estável, ou seja, os genes normalizadores dentro do seu grupo de estudo. Para avaliar o perfil de expressão gênica entre os promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os diferentes anti-histamínicos foi utilizada a metodologia do Cq comparativo ( $\Delta\Delta Cq$ ), dada pela equação [ $\Delta Cq$  da amostra teste (Cq gene de interesse - Cq do gene referência) -  $\Delta Cq$  da amostra calibradora (Cq gene de interesse - Cq do gene referência)]. Posteriormente, o nível normalizado de expressão gênica do gene alvo foi calculado pela equação  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ .

O esquema a seguir (Figura 18), demonstra de forma simplificada a sequência de avaliações para os fármacos CNZ, CPH e MCZ, ativos na forma amastigota de *L. (L.) infantum*.



**Figura 18:** Desenho experimental desenvolvido para avaliar as alterações moleculares em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com diferentes fármacos anti-histamínico.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Determinação *in vitro* da concentração efetiva 50 % (CE<sub>50</sub>) e concentração efetiva 90 % (CE<sub>90</sub>) dos fármacos anti-histamínicos**

#### **4.1.1. Avaliação da atividade *in vitro* dos fármacos anti-histamínicos em promastigotas de *L. (L.) infantum***

A atividade antileishmania dos fármacos anti-histamínicos cinarizina (CNZ), ciproheptadina (CPH), meclizina (MCZ), fexofenadina (FXF) e cetirizina (CTZ) em promastigotas de *L. (L.) infantum* foi avaliada pelo método colorimétrico MTT. Os valores obtidos para as concentrações efetivas 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>) após incubação por 1, 2, 4 e 24 horas estão representados na tabela 06. A miltefosina (MTF) foi usada como modelo de fármaco padrão para comparação de dados.

**Tabela 6:** Avaliação da Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>) de fármacos anti-histamínicos em promastigotas de *L. (L.) infantum*. Valores expressos em µM. Os resultados representam a média ± erro-padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Fármaco	Promastigota de <i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>							
	1 hora		2 horas		4 horas		24 horas	
	CE50%	CE90%	CE50%	CE90%	CE50%	CE90%	CE50%	CE90%
CNZ	55,26 ± 0,16	> 150	45,97 ± 0,08	136,60 ± 11,48	33,83 ± 0,79	129,25 ± 0,84	24,76 ± 0,23	107,26 ± 5,55
CPH	9,65 ± 1,32	55,71 ± 1,08	8,83 ± 0,68	46,86 ± 3,03	7,13 ± 1,40	35,14 ± 5,42	6,89 ± 1,40	26,64 ± 0,86
MCZ	41,96 ± 0,97	> 150	34,01 ± 2,83	> 150	25,65 ± 1,89	> 150	22,19 ± 3,65	86,22 ± 6,68
FXF	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150
CTZ	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150	> 150
MTF	139,9	> 150	40,86	> 150	25,52	97,25	14,99	100

O fármaco CPH apresentou valores de CE<sub>50</sub> de 6,89 a 9,65 µM, nos períodos de incubação utilizados. Após 24 horas, foi 2 vezes mais efetivo que o fármaco padrão MTF. Os valores de CE<sub>90</sub> variaram de 26,64 a 55,71 µM, entre 1 e 24 horas após a incubação

O fármaco CNZ exibiu valores de CE<sub>50</sub> entre 24,75 a 55,26 µM, após as incubações. Os valores de CE<sub>90</sub> variaram de 107,26 a >150 µM.

O fármaco MCZ apresentou valores de CE<sub>50</sub> de 22,19 a 41,96 µM, após as incubações. O valor de CE<sub>90</sub> foi acima de 150 µM nas primeiras horas de incubação, e após 24 horas, expressou um valor de CE<sub>90</sub> de 86,22 µM.

Os fármacos FXF e CTZ não apresentaram atividade antileishmania na concentração máxima avaliada de 150 µM. Os fármacos ativos demonstraram uma relação tempo dependente para a atividade antileishmania.

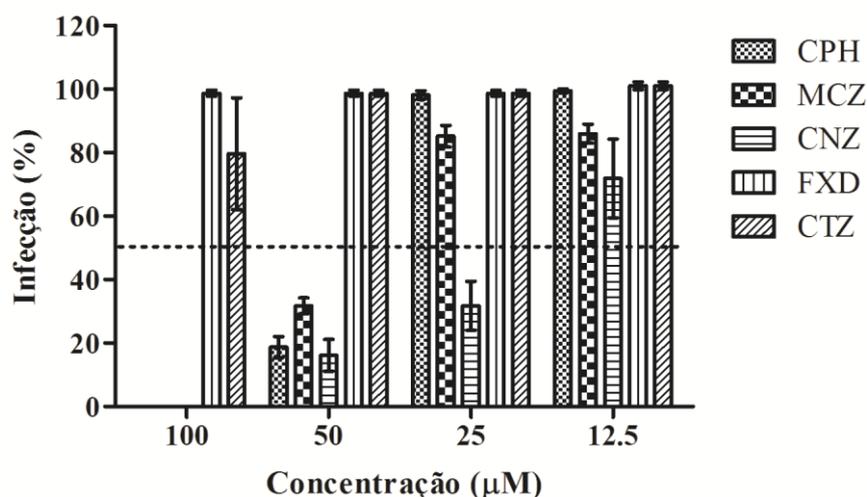
#### **4.1.2. Avaliação da atividade *in vitro* dos fármacos anti-histamínicos em amastigotas de *L. (L.) infantum***

A atividade antileishmania dos fármacos anti-histamínicos em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum* foi avaliada por microscopia óptica após 120 horas de incubação. Todos os experimentos foram analisados somente quando a carga parasitária do controle apresentava uma infecção maior que 90%. Na Tabela 7 estão representados os valores obtidos para a CE<sub>50</sub>.

**Tabela 7:** Avaliação da Concentração Efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) de fármacos anti-histamínicos em amastigotas de *L. (L.) infantum*. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Fármaco	Amastigota de <i>L. (L.) infantum</i>
CPH	30,21 $\pm$ 9,93
CNZ	19,93 $\pm$ 1,60
MCZ	35,11 $\pm$ 4,01
FXF	>100
CTZ	>100
MTF	17,80 $\pm$ 1,39

Os fármacos CPH, CNZ e MCZ apresentaram CE<sub>50</sub> entre 19 e 35  $\mu\text{M}$ , com efetividade similar ao fármaco MTF, não havendo diferença estatisticamente significativa. Os fármacos FXF e CTZ não apresentaram atividade antileishmania na maior concentração testada de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 19).



**Figura 19:** Atividade antileishmania dos fármacos anti-histamínicos em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) infantum*. Células tratadas por 120 h. CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinnarizina, FXD = fexofenadina, CTZ = cetirizina. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro-padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.1.3. Avaliação da citotoxicidade dos fármacos anti-histamínicos em células de mamífero

Os fármacos anti-histamínicos foram incubados com células NCTC por 48 horas e a viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT. O IS foi calculado pela razão entre  $CC_{50}$  deste ensaio pela  $CE_{50}$  em amastigotas de *L. (L.) infantum* de 120 horas. Os valores obtidos para as concentrações citotóxicas 50% ( $CC_{50}$ ) e 90% ( $CC_{90}$ ) estão representados na Tabela 8.

**Tabela 8:** Avaliação da Concentração Citotóxica 50% ( $CE_{50}$ ) e 90% ( $CE_{90}$ ) de fármacos anti-histamínicos em células NCTC. Valores expressos em  $\mu\text{M}$ . Os resultados representam a média  $\pm$  erro-padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. IS = índice de seletividade

Fármaco	NCTC-L929		IS
	$CC_{50}$	$CC_{90}$	
CPH	125,35 $\pm$ 1,75	166,34 $\pm$ 2,92	4,15
CNZ	128,94 $\pm$ 29,16	>200	6,47
MCZ	>200	>200	>5,70
FXF	>200	>200	-
CTZ	>200	>200	-
MTF	116,70 $\pm$ 5,30	>200	>6,55

A CPH e a CNZ demonstraram citotoxicidade similar ao fármaco miltefosina com  $CC_{50}$  de 125,35 e 128,9  $\mu\text{M}$  respectivamente, não havendo diferença estatisticamente significativa. Os fármacos MCZ, FXF e CTZ não apresentaram atividade citotóxica na maior concentração testada de 200  $\mu\text{M}$ . O índice de seletividade variou entre 4,1 a > 5,7 não havendo diferença estatisticamente significativa.

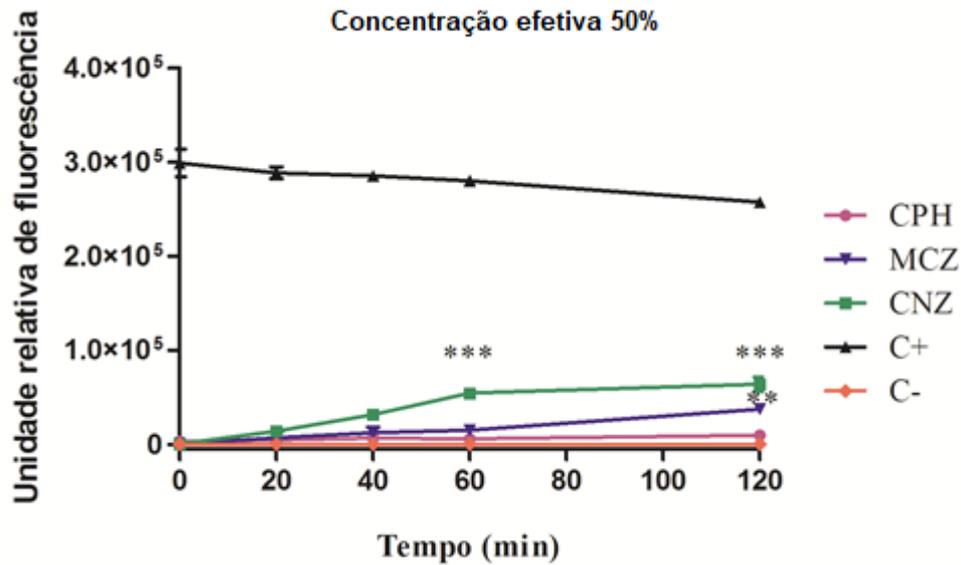
## **4.2. Avaliação de alteração celular em promastigotas de *L. (L.) infantum* incubados com fármacos anti-histamínicos**

Os fármacos CNZ, CPH e MCZ apresentaram efetividade contra amastigotas de *L. (L.) infantum*, forma relevante de interesse clínico e deram continuidade aos estudos. Com o objetivo de identificar o mecanismo de ação destes fármacos, foram avaliadas as alterações celulares que estes provocam quando incubados com o parasito levando a morte. Por questões técnicas, a forma promastigota foi utilizada como modelo celular usando as concentrações efetivas determinadas anteriormente.

### **4.2.1. Análise da permeabilidade da membrana plasmática**

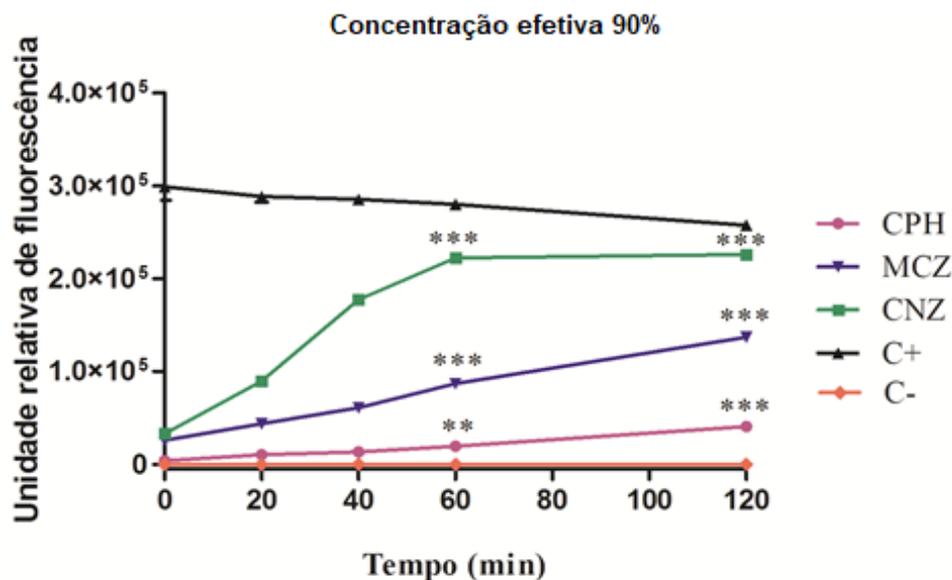
A permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos que apresentaram atividade antileishmania foi avaliada usando a sonda fluorescente SYTOX® Green. Ela penetra facilmente em células que apresentam comprometimento na membrana plasmática e apresenta um aumento >500 vezes na intensidade de fluorescência após se ligar com alta afinidade ao ácido nucléico de células mortas, e não atravessa células viáveis (Johnson e Spence, 2010).

Foram avaliadas duas concentrações diferentes,  $CE_{50}$  e  $CE_{90}$ , dos fármacos CNZ, CPH e MCZ incubados por até 120 minutos. Considerando o valor da  $CE_{50}$  (Figura 20), a CNZ provocou um aumento da intensidade de fluorescência (19%,  $P < 0,0001$ ) após 60 minutos e (25%,  $P < 0,0001$ ) 120 minutos, quando comparado com as células não tratadas. A CPH e MCZ não causaram alteração significativa na permeabilidade da membrana plasmática.



**Figura 20:** Permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e incubados com SYTOX® Green. Os promastigotas foram tratados com Triton X-100 para obter 100% de permeabilidade (controle positivo). Células não tratadas foram usadas como controle negativo. CNZ = cinarizina, CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*P < 0,0001; \*\*P < 0,001

Considerando o valor da CE<sub>90</sub> (Figura 21), a CNZ provocou um significativo aumento na intensidade de fluorescência (60 minutos = 79%, P < 0,0001; 120 minutos = 88%, P < 0,0001), quando comparado com as células não tratadas. Um efeito menor foi observado para a MCZ (60 minutos = 31%, P < 0,0001; 120 minutos = 53%, P < 0,0001) e para a CPH (60 minutos = 7%. P < 0,001; 120 minutos = 16%, P < 0,0001). Foi observado um efeito concentração-tempo-dependente na permeabilidade da membrana plasmática dos parasitos tratados com os fármacos anti-histamínicos.

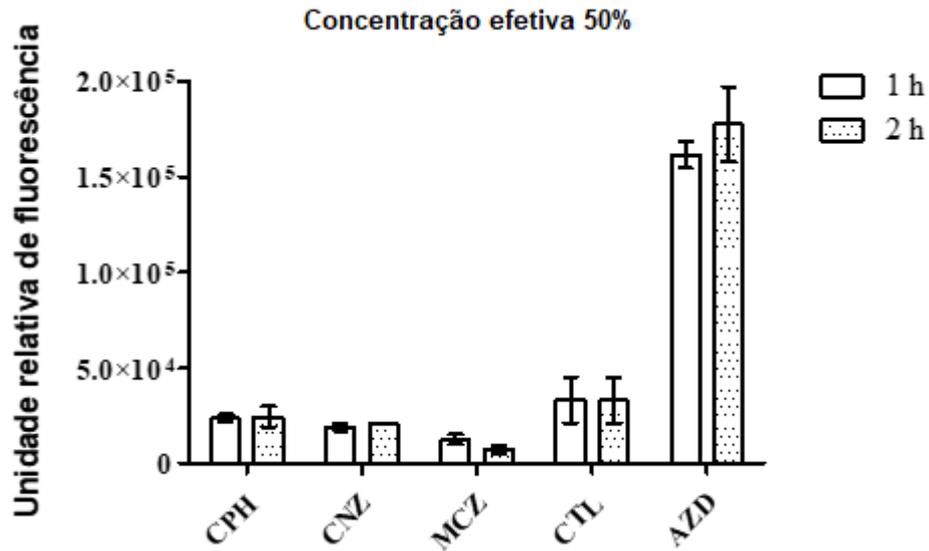


**Figura 21:** Permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 90% (CE<sub>90</sub>) e incubados com SYTOX® Green. Os promastigotas foram tratados com Triton X-100 para obter 100% de permeabilidade (controle positivo). Células não tratadas foram usadas como controle negativo. CNZ = cinarizina, CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata. \*\*\*P < 0,0001; \*\*P < 0,001.

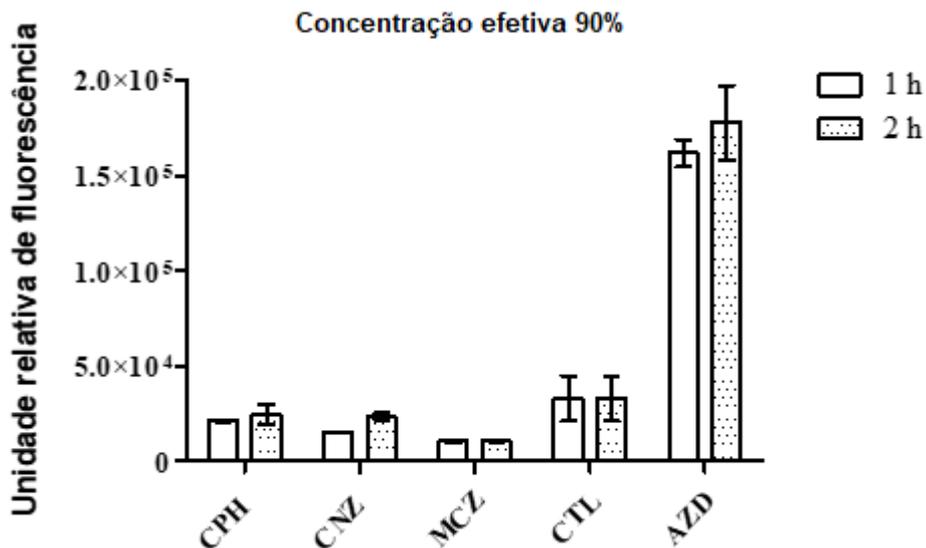
#### 4.2.2. Análise de espécies reativas de oxigênio (ERO)

A alteração nos níveis de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. (L.) infantum* incubados com fármacos anti-histamínicos foi avaliada utilizando a sonda fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA. Esta sonda é uma forma quimicamente reduzida de fluoresceína utilizada como um indicador de ERO. Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares e oxidação, a sonda não fluorescente é convertida para a forma altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). A detecção da oxidação desta sonda pode ser monitorada pelo aumento da fluorescência utilizando um espectrofluorímetro (de Macedo-Silva *et al.*, 2011).

Considerando o valor da CE<sub>50</sub> (Figura 22) ou CE<sub>90</sub> (Figura 23) em 1 e 2 horas dos fármacos CNZ, CPH e MCZ não houve alteração estatisticamente significativa na produção de ERO quando comparado com as células não tratadas (P > 0,05).



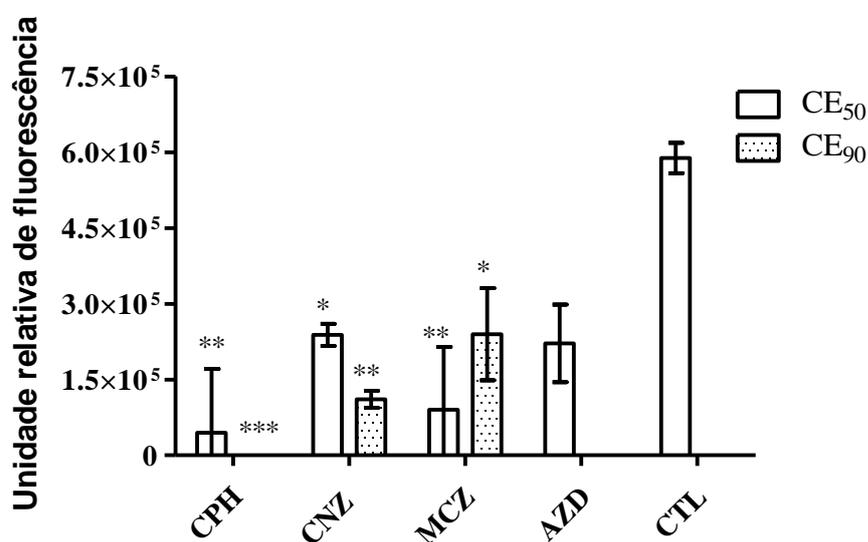
**Figura 22:** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e incubados com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Tratamento por 1 hora e 2 horas. CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinarizina, CTL = células não tratadas, AZD = azida sódica, controle positivo. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata.



**Figura 23:** Produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 90% (CE<sub>90</sub>) e incubados com a sonda H<sub>2</sub>DCFDA. Tratamento por 1 hora e 2 horas. CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinarizina, CTL = células não tratadas, AZD = azida sódica, controle positivo. Os resultados expressam a média ± desvio-padrão de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata.

### 4.2.3. Análise do potencial de membrana mitocondrial

Para avaliar o efeito dos fármacos anti-histamínicos na mitocôndria de promastigotas de *L. (L.) infantum* foi analisado o potencial de membrana mitocondrial, indicado pela sonda Rodamina 123, um corante catiônico fluorescente que é rapidamente capturado pela mitocôndria ativa sem efeito citotóxico e se acumula na mitocôndria polarizada (Figura 24). Após 1 hora de tratamento, todos os fármacos reduziram o nível de fluorescência da Rodamina 123, indicando despolarização do potencial de membrana mitocondrial. Considerando o valor da  $CE_{50}$ , CPH, CNZ e MCZ causaram uma redução na intensidade de fluorescência de 92% ( $P < 0,001$ ), 60% ( $P < 0,05$ ) e 85% ( $P < 0,001$ ) respectivamente, comparado com os parasitos não tratados. Para CNZ e CPH, o efeito de despolarização foi concentração-dependente. Considerando o valor da  $CE_{90}$ , o nível de fluorescência ficou indetectável para CPH ( $P < 0,0001$ ), CNZ e MCZ mostraram elevada redução de 81% ( $P < 0,001$ ) e 59% ( $P < 0,05$ ), respectivamente. Um efeito similar foi observado com a azida sódica (inibidor do complexo respiratório IV), utilizada como controle positivo.

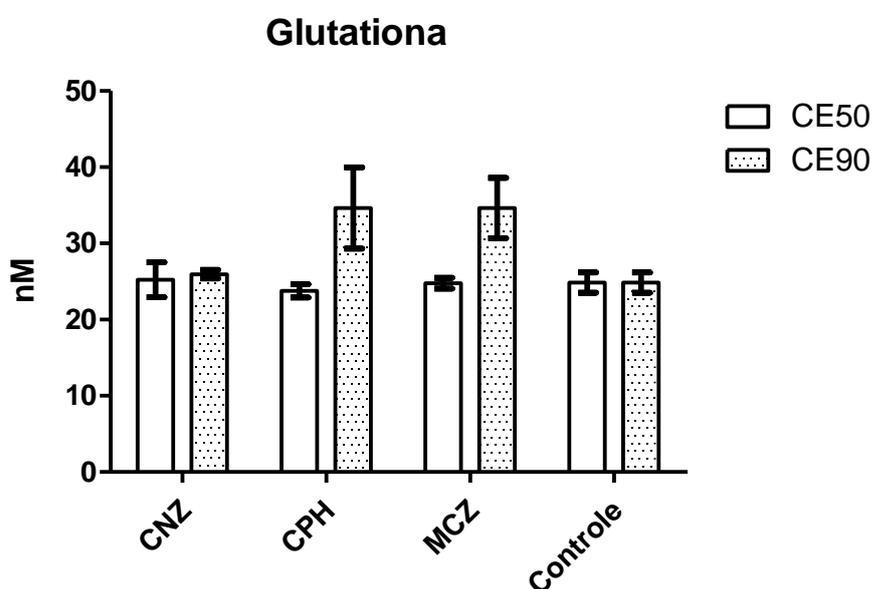


**Figura 24:** Potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) e 90% ( $CE_{90}$ ) e incubados com a sonda Rodamina 123. CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinarizina, CTL = células não tratadas, AZD = azida sódica, controle positivo. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio-padrão de um experimento representativo de três experimentos independentes realizados em duplicata. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$ .

#### 4.2.4. Determinação de tiol intracelular

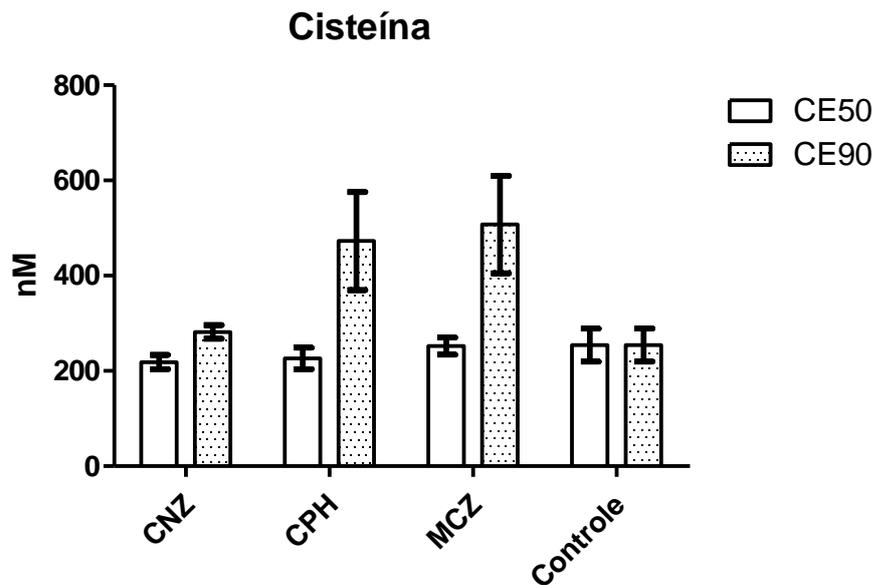
Os níveis intracelulares de tióis em promastigotas de *L. (L.) infantum* incubados com os fármacos anti-histamínicos CNZ, CPH e MCZ foram determinados por método fluorimétrico.

Considerando o valor da  $CE_{50}$  ou  $CE_{90}$  dos fármacos CNZ, CPH e MCZ em 2 horas, não houve alteração significativa na produção de glutathiona comparado ao grupo controle de parasitos não tratados (figura 25).



**Figura 25:** Avaliação do nível intracelular de glutathiona em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% ( $CE_{50}$ ) e 90% ( $CE_{90}$ ), por 2 horas. CPH = ciproheptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinarizina, Controle = células não tratadas. Os resultados expressam a média  $\pm$  erro-padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

Considerando o valor da  $CE_{50}$  dos fármacos CPH e MCZ não houve alteração significativa na produção de cisteína. CNZ não causou alteração em ambas concentrações. Entretanto, quando avaliada a  $CE_{90}$ , houve tendência de elevação de cisteína para os fármacos CPH e MCZ porém sem diferença estatisticamente significativa, comparado ao grupo não tratado (Figura 26).



**Figura 26:** Avaliação do nível intracelular de cisteína em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos na concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) e 90% (CE<sub>90</sub>), por 2 horas. CPH = ciprooptadina, MCZ = meclizina, CNZ = cinarizina, Controle = células não tratadas. Os resultados expressam a média ± erro-padrão da média de dois experimentos independentes realizados em duplicata.

#### 4.2.5. Análise celular ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Além dos estudos de mecanismo de ação, a análise das ultraestruturas celulares foi realizada usando a microscopia eletrônica de transmissão para identificar alterações em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos anti-histamínicos.

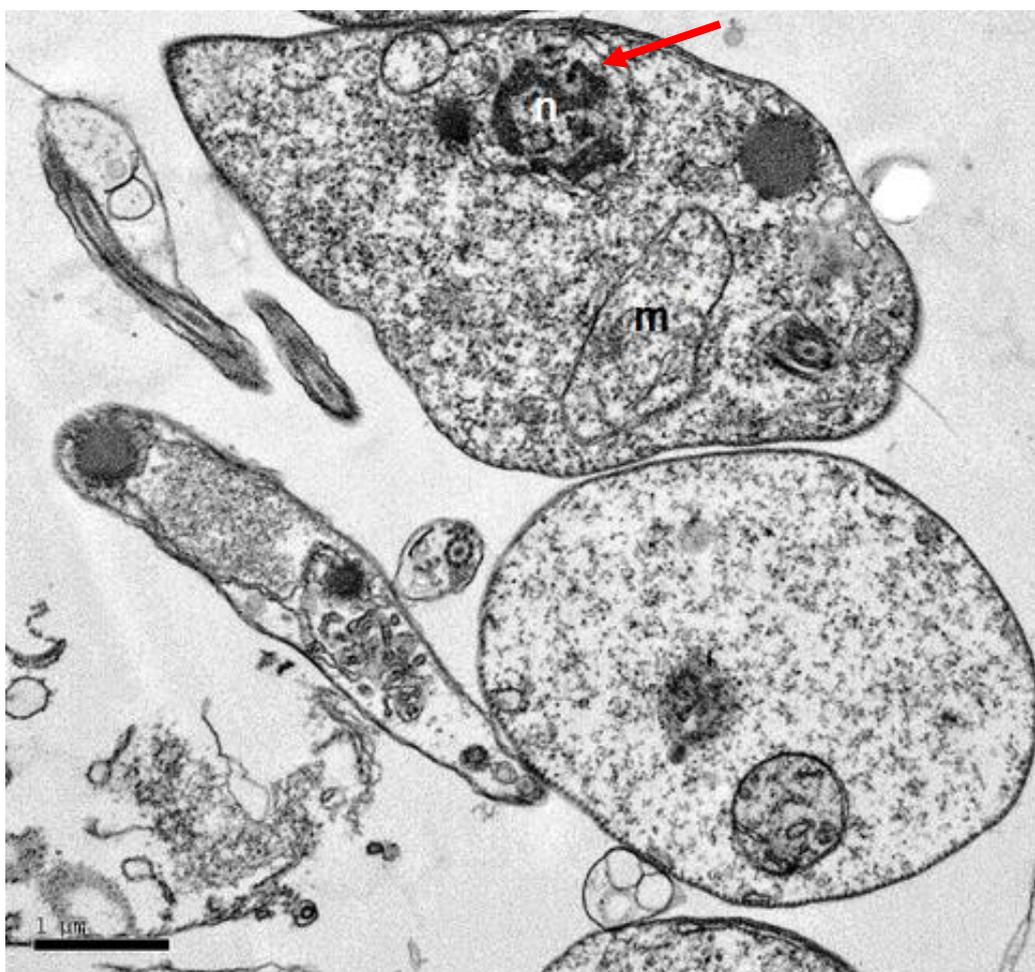
Considerando o valor da CE<sub>90</sub> os fármacos CNZ, CPH e MCZ provocaram alterações morfológicas e ultraestruturais, com dano crescente no decorrer dos tempos estudados, 30 minutos até 6 horas, comparado ao grupo controle de parasitos não tratados (Figura 27).

Ultraestruturas características do promastigota de *Leishmania* foram observadas no grupo controle. Células delgadas e alongadas, com superfície celular lisa,. A mitocôndria ramificada contendo cristas bem definidas com o cinetoplasto (complexo DNA mitocondrial) em forma de bastão e uma matriz eletro-densa no citoplasma (Figura 27).



**Figura 27:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, grupo controle de parasitos não tratados. m = mitocôndria, n = núcleo, f = flagelo, K= cinetoplasto.

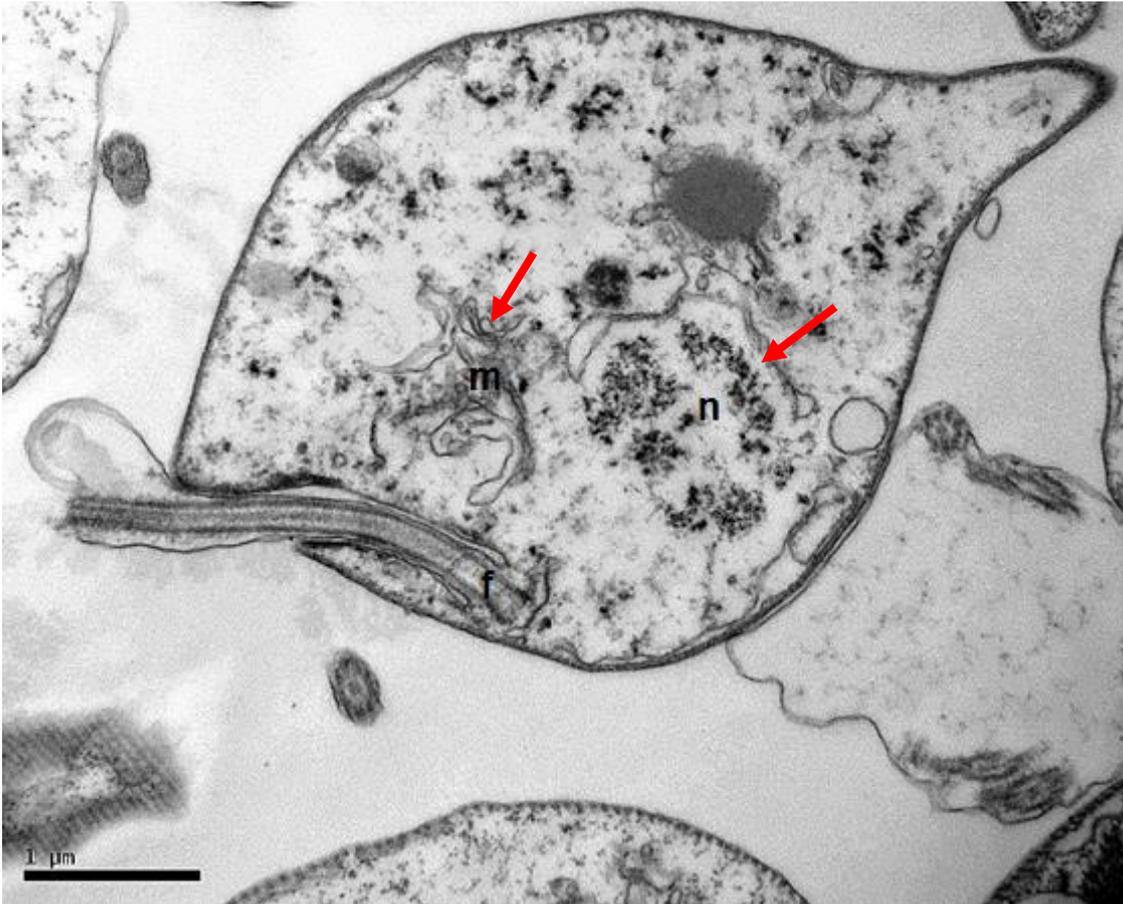
Tratamento com CNZ após **30 minutos**: causou descolamento da membrana nuclear, inchaço mitocondrial (Figura 28); **2 horas**: fragmentação do DNA (Figura 29); **4 horas**: degeneração do conteúdo nuclear e das cristas mitocondriais (Figura 30) e; **6 horas**: perda do conteúdo da matriz e desorganização da membrana interna com formação de bolhas na membrana plasmática (Figura 31).



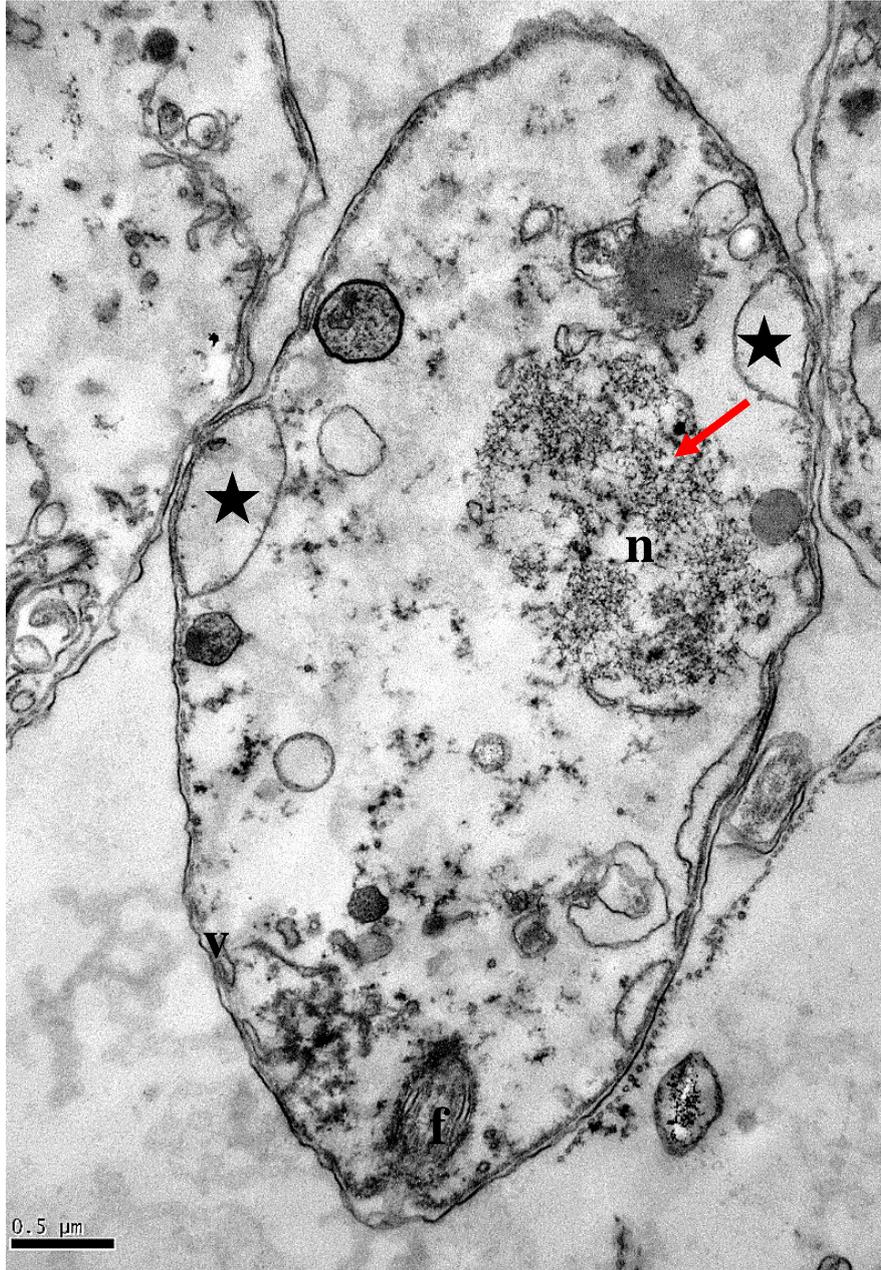
**Figura 28:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, tratados com cinarizina na CE<sub>90</sub> após 30 minutos. m = mitocôndria, n = núcleo, f = flagelo. Seta vermelha: descolamento da membrana nuclear.



**Figura 29:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, tratados com cinarizina na CE<sub>90</sub> após 2 hora. m = mitocôndria, n = núcleo, mt = microtúbulos subelulares. Seta vermelha: descolamento da membrana nuclear e fragmentação do DNA.

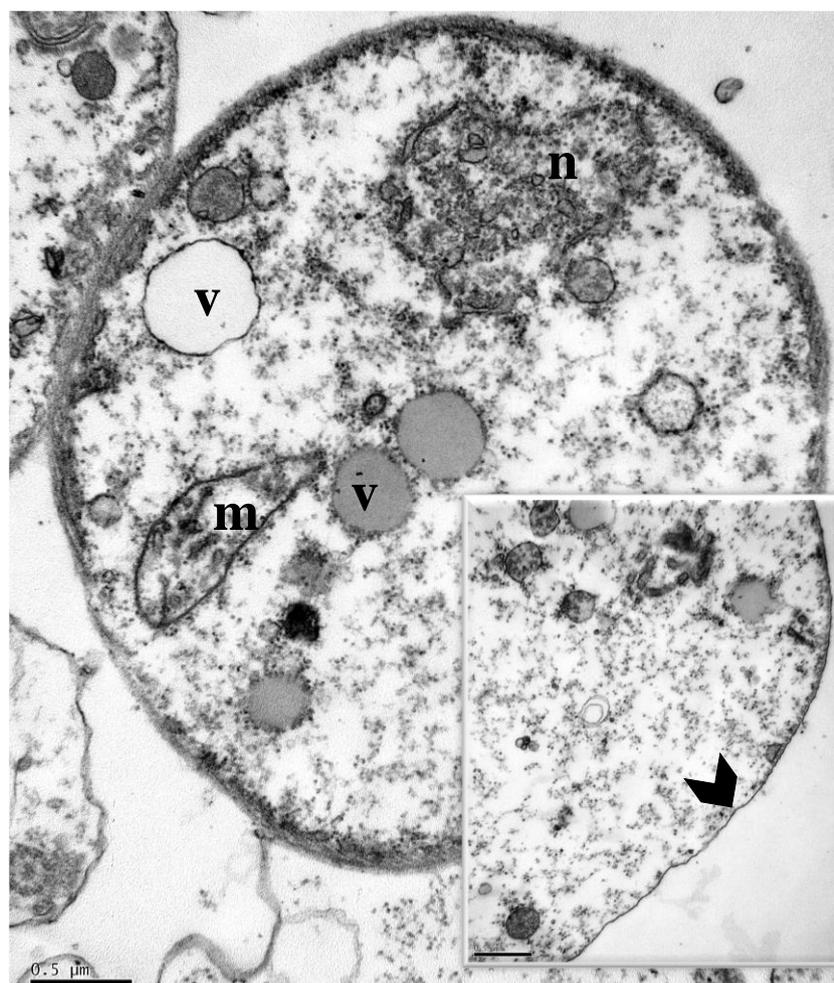


**Figura 30:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, tratados com cinarizina na CE<sub>90</sub> após 4 hora. m = mitocôndria, n = núcleo, f = flagelo. Seta vermelha: degeneração da mitocôndria e do conteúdo nuclear.

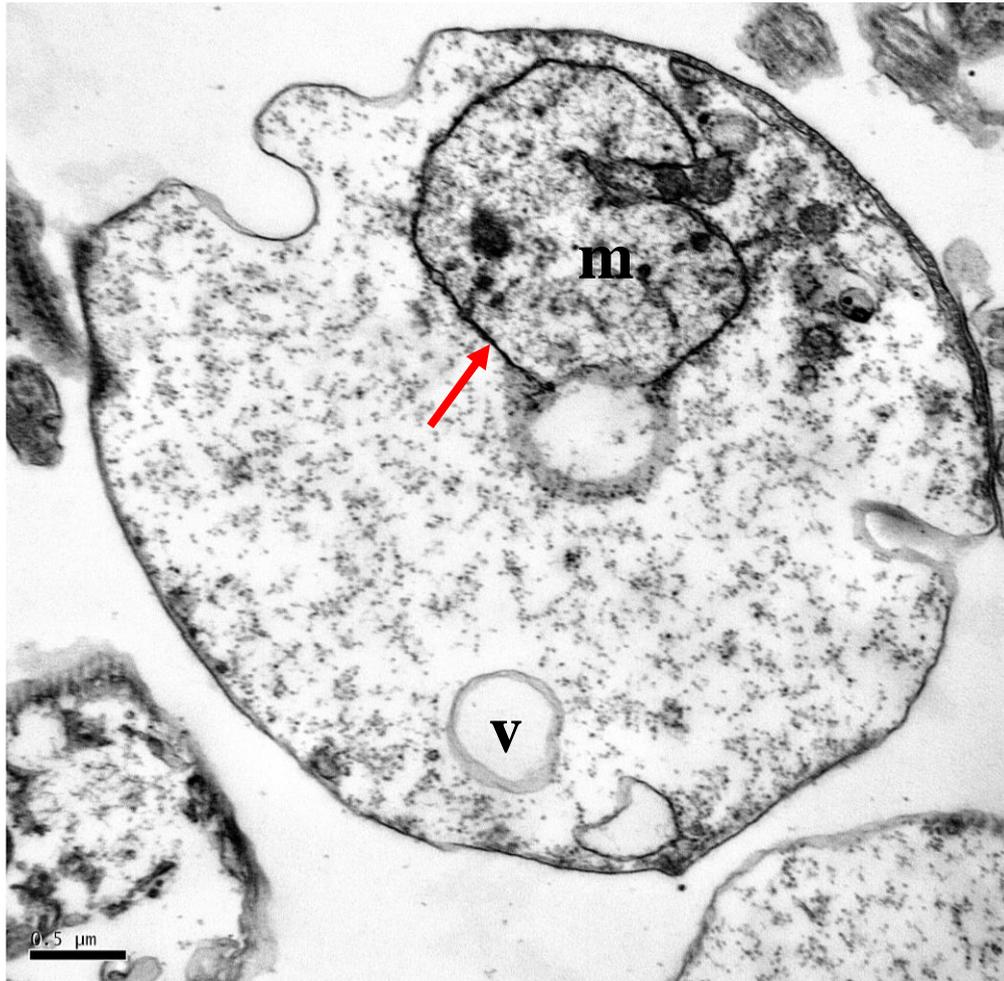


**Figura 31:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum*, tratados com cinarizina na CE<sub>90</sub> após 6 hora. n = núcleo, f = flagelo. Seta vermelha: desorganização do conteúdo nuclear, (estrela) bolhas na membrana plasmática.

Tratamento com CPH após **30 minutos**: provocou a descontinuidade dos microtúbulos subpeliculares, desorganização da membrana e do conteúdo mitocondrial, e aumento do número de vesículas com conteúdo eletro-denso distribuídas no citoplasma (Figura 32); **2 horas**: inchaço da mitocôndria (Figura 33); **4 horas**: completa desorganização do conteúdo intracelular, descolamento e enrugamento da membrana plasmática (Figura 34); **6 horas**: formação de vesículas endocíticas (Figura 35).



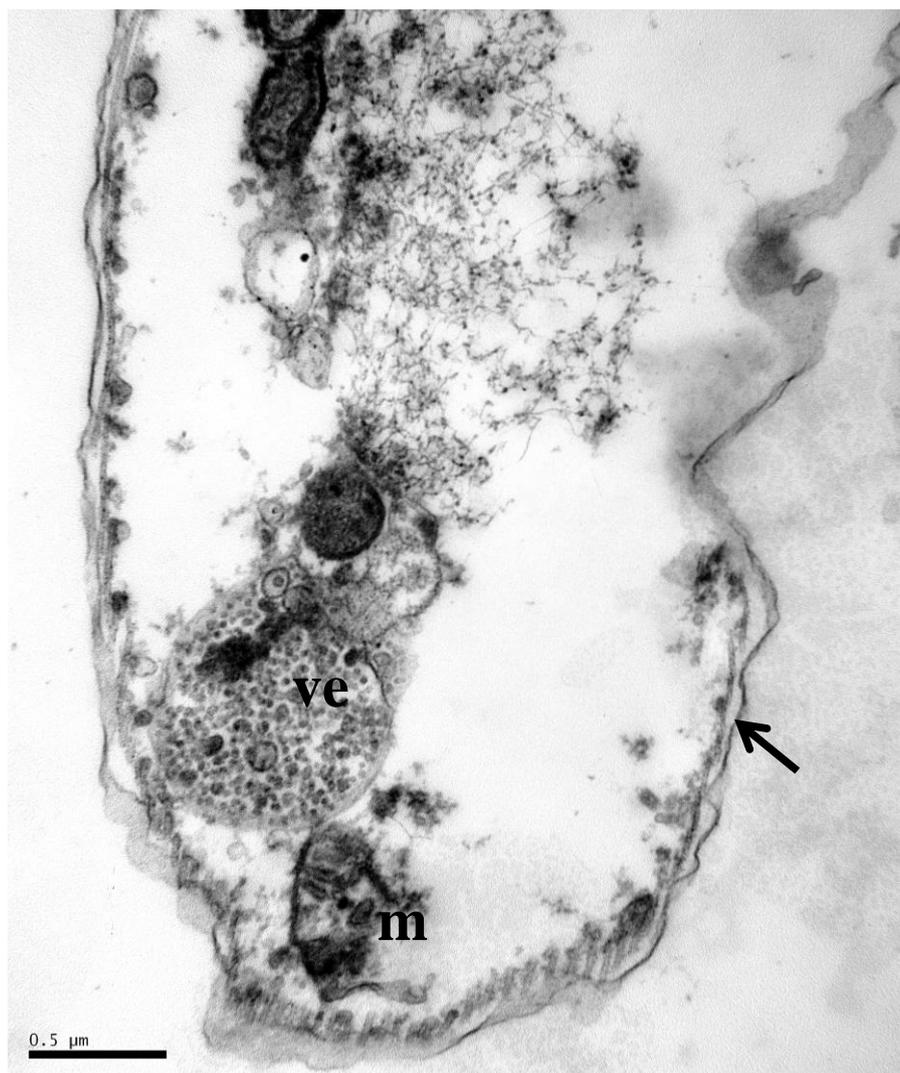
**Figura 32:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com ciproptadina na CE<sub>90</sub> após 30 minutos. m = mitocôndria, n = núcleo, v = vesículas com conteúdo eletro-denso. Seta preta: descontinuidade dos microtúbulos subpeliculares, desorganização da membrana e do conteúdo mitocondrial.



**Figura 33:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com ciproptadina na CE<sub>90</sub> após 2 horas. m = mitocôndria, v = vesículas com conteúdo eletro-denso. Seta vermelha: inchaço da mitocôndria.

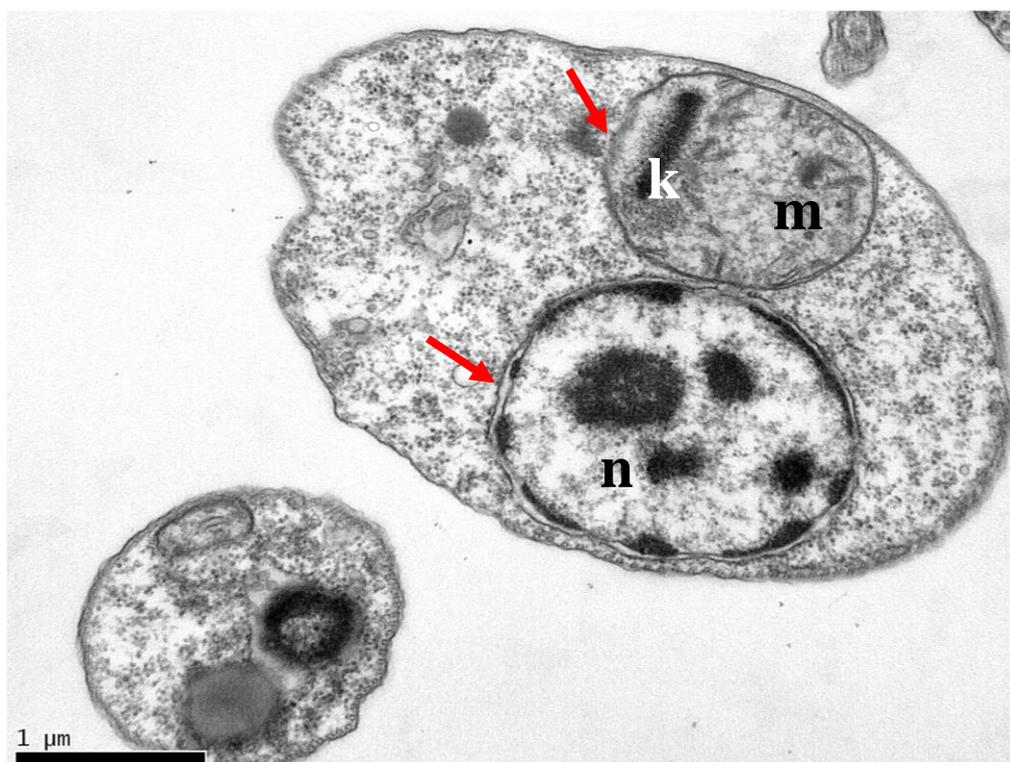


**Figura 34:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com ciprofloxacin na CE<sub>90</sub> após 4 horas. m = mitocôndria, v = vesículas com conteúdo eletro-denso. Seta preta: descolamento e enrugamento da membrana plasmática.

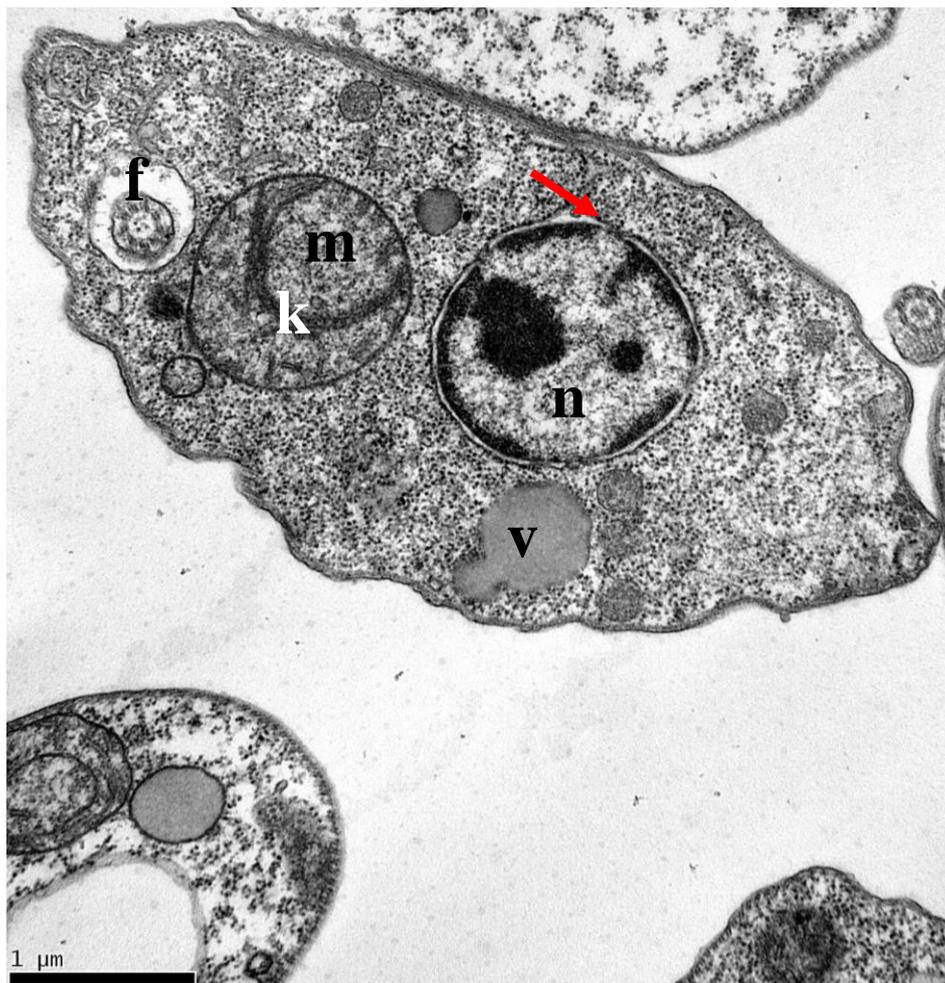


**Figura 35:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com ciprofloxadina na CE<sub>90</sub> após 6 horas. m = mitocôndria, ve = vesícula endocítica. Seta preta: enrugamento da membrana plasmática.

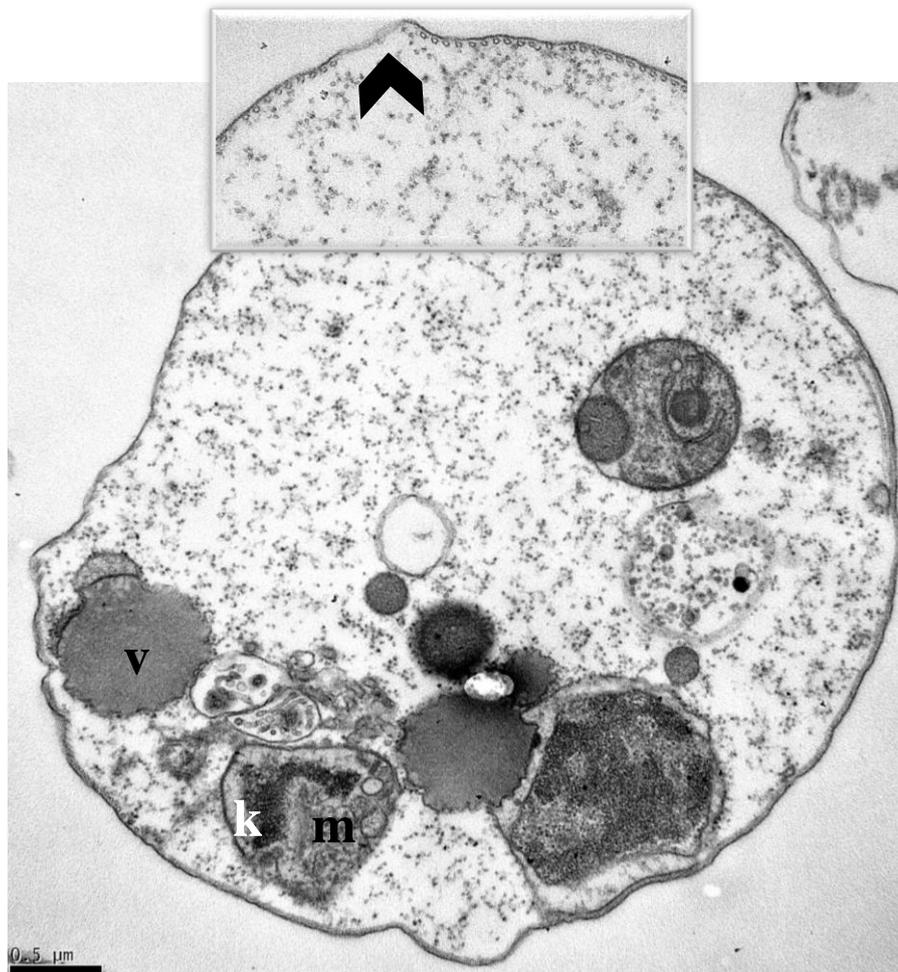
Tratamento com MCZ após **30 minutos**: provocou o inchaço da mitocôndria e descolamento da membrana nuclear (Figura 36); **2 horas**: formação de organelas com conteúdo eletro-denso (Figura 37); **6 horas**: progressiva perda do conteúdo da matriz e descontinuidade dos microtúbulos subpeliculares (Figura 38).



**Figura 36:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com meclizina na CE<sub>90</sub> após 30 minutos. m = mitocôndria, k = cinetoplasto, n = núcleo. Seta vermelha: inchaço da mitocôndria e descolamento da membrana nuclear.



**Figura 37:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com meclizina na CE<sub>90</sub> após 2 horas. m = mitocôndria, k = cinetoplasto, n = núcleo, f = flagelo, bf = bolsa flagelar, v = vesículas com conteúdo eletro-denso. Seta vermelha: descolamento da membrana nuclear.



**Figura 38:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com meclizina na CE<sub>90</sub> após 6 horas. m = mitocôndria, n = núcleo, mt = microtúbulos multivesiculares. Seta preta: descontinuidade dos microtúbulos subpeliculares e progressiva perda do conteúdo da matriz.

### **4.3. Padronizações de qPCR para avaliação da expressão gênica em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos**

#### **4.3.1. Quantificação e análise da qualidade do RNA total**

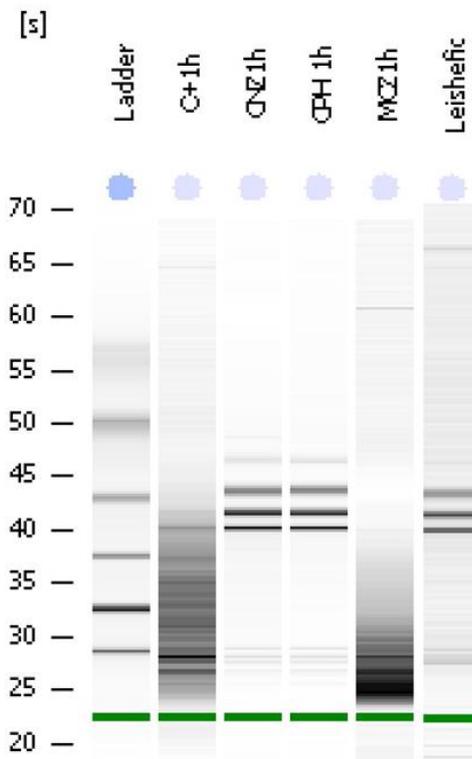
O RNA total de promastigotas de *L. (L.) infantum* foi extraído pelo método de purificação em coluna com membrana de sílica. A qualidade e a quantidade do RNA foram analisadas por diferentes metodologias (Tabela 9). A pureza do material extraído, com relação a contaminantes protéicos, foi avaliada em espectrofotômetro (NanoDrop) pela medida da razão A260 / 280, resultando em um valor entre 1,7 e 2,0, indicando que não há contaminantes. Somente pela medida da A260 nm não é possível discriminar entre a presença de DNA e RNA. Desta forma, o material foi quantificado usando corante fluorescente específico para RNA e a medida do sinal de fluorescência foi realizada em um fluorímetro (Quantus). A determinação específica da concentração de RNA foi de 54 a 76 ng/ $\mu$ L.

A análise da integridade do RNA foi determinada em um sistema de eletroforese automatizado (Bioanalyzer 2100), combinando a quantificação da integridade e da concentração. Através de um gel virtual e eletroferograma o programa utilizado calcula o número de integridade do RNA (RIN; “RNA integrity number”), que pode variar de 1 (degradado) até 10 (intacto). A figura 39 apresenta a integridade das amostras analisadas. O valor de RIN foi entre 2 e 8, numa faixa de concentração de 82 a 128 ng/ $\mu$ L (Tabela 9).

**Tabela 9:** Análise da pureza e concentração de RNA usando espectrofotômetro (NanoDrop), fluorímetro (Quantus) e sistema de eletroforese automatizado (Bioanalyzer 2100). CNZ = promastigotas tratados com cinarizina; CPH = promastigotas tratados com ciproeptadina; MCZ = promastigotas tratados com meclizina; C+ = Controle (promastigotas não tratados); Leishefic = promastigotas não tratados usados na construção da curva-padrão.

Amostra (RNA)	NanoDrop		Quantus		Bioanalyzer	
	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Conc (ng/μL)	Conc (ng/μL)	RIN	Conc (ng/μL)
CNZ	2,00	0,29	128,94	53,7	6,8	86
CPH	1,98	1,53	189,64	65,6	7,6	128
MCZ	2,00	0,77	174,07	56,2	2,3	82
C+	1,95	1,55	166,8	75,9	2,3	107
Leishefic	1,72	0,77	21,95	-	6,1	15

RIN = RNA integrity number; A= absorvância; Conc = Concentração



**Figura 39:** Análise da pureza e integridade de RNA usando o sistema de eletroforese automatizado (Bioanalyzer 2100). Imagem de um gel virtual gerada pelo programa 2100 Expert. CNZ = promastigota tratada com cinarizina; CPH = promastigota tratada com ciproeptadina; MCZ = promastigota tratada com meclizina; C+ = Controle (promastigota não tratada); Leishefic = promastigota não tratada usada para determinação da curva-padrão.

#### **4.3.2. Avaliação de eficiência da reação de qPCR**

A eficiência da reação para a amplificação do cDNA foi obtida após a confecção da curva-padrão com diluições seriadas em 5 pontos. Foram realizadas análises para todos os genes em estudo (Tabela 10). O valor de declive (“slope”) da curva indica a eficiência da reação. A maioria dos genes analisados apresentaram uma eficiência próxima de 1, considerando que 1 representa uma eficiência de 100%, isto é, a quantidade do produto de PCR dobra a cada ciclo. Dos 30 genes analisados, 18 apresentaram o valor de eficiência > 90%. O coeficiente de determinação ( $r^2$ ) representa a linearidade dos dados, todos os genes apresentaram um valor de  $r^2 > 0,99$ , que é desejável para as reações. Os valores de eficiência, limites de detecção e coeficiente de determinação para cada gene estão apresentados na Tabela 12. Dos 30 genes analisados, apenas em 04 genes (S8, CYCL, TSH e MDRP) não foi possível determinar os parâmetros, por apresentarem uma elevada amplificação inespecífica do produto amplificado. A otimização da reação destes genes (concentração de oligonucleotídeos, curva de dissociação, concentração de reagentes, temperatura de ciclagem, etc) pode favorecer uma amplificação satisfatória.

**Tabela 10:** Análise da eficiência, coeficiente de determinação ( $r^2$ ) e limite de detecção dos genes obtidos da curva-padrão de promastigotas de *L. (L.) infantum*.

<b>Gene</b>	<b>Eficiência (%)</b>	<b><math>r^2</math></b>	<b>LDMax</b>	<b>LDMin</b>
GCS	111,60	0,997	1,0E+07	1,0E+03
CS	108,04	0,992	1,0E+07	1,0E+04
TDR1	107,61	0,991	1,0E+07	1,0E+05
DNAPA	105,90	0,983	1,0E+07	1,0E+04
AQP1	104,80	0,997	1,0E+07	1,0E+04
GAPDH	100,62	0,999	1,0E+07	1,0E+04
PAP	98,51	1,000	1,0E+07	1,0E+05
PGM	97,91	0,993	1,0E+07	1,0E+05
ATUB2	96,37	1,000	1,0E+07	1,0E+04
ATUB	95,14	1,000	1,0E+07	1,0E+04
TR	94,61	0,998	1,0E+07	1,0E+03
TCP	94,43	0,999	1,0E+07	1,0E+04
LPP	94,31	0,998	1,0E+07	1,0E+04
CYTB	92,96	0,995	1,0E+07	1,0E+05
ABCF	92,60	0,999	1,0E+07	1,0E+05
TRYP	92,27	0,994	1,0E+07	1,0E+05
MRPA	91,53	0,998	1,0E+07	1,0E+05
CBS	91,28	0,997	1,0E+07	1,0E+05
PABP	88,47	1,000	1,0E+07	1,0E+05
AAT	88,40	1,000	1,0E+07	1,0E+05
GS	84,24	0,999	1,0E+07	1,0E+04

ODC	81,72	1,000	1,0E+07	1,0E+05
MST	80,66	0,997	1,0E+07	1,0E+05
PRP1	77,93	0,998	1,0E+07	1,0E+04
ACR2	72,79	0,990	1,0E+07	1,0E+05
SAT	72,79	0,997	1,0E+07	1,0E+05
S8	nd			
CYCL	nd			
TSH	nd			
MDRP	nd			

---

Nd = não determinado, elevada amplificação inespecífica do produto amplificado; LDMax= limite de detecção máximo; LDMin= limite de detecção mínimo.

#### 4.3.3. Análise da curva de dissociação

Diante dos resultados de eficiência apresentados anteriormente, dos 30 genes avaliados, 18 apresentaram características favoráveis ( $E = 100 \pm 10\%$ ) e deram continuidades aos estudos.

A avaliação da qPCR foi dada pela curva de dissociação para garantir a especificidade da reação. A curva de dissociação foi analisada pela temperatura de dissociação (*melting temperature*,  $T_m$ ) dos produtos amplificados. Foi utilizado um controle de amplificação, isto é, amostras de cDNA na qual a reação não continha a enzima transcriptase reversa (RT-), para se certificar que não havia contaminação com DNA genômico.

A determinação da  $T_m$  possibilita a diferenciação entre a amplificação de produtos específicos, que são as amostras teste (promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados) e calibradora (promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratados) de amplificações inespecíficas, como por exemplo, a formação de dímeros de primers.

As amostras controle (NTC e branco) apresentaram amplificações inespecíficas, com valores de  $T_m$  bem distintos das amostras teste e calibradora.

Além disso, apresentarm valor de Cq elevado, isto é, a quantidade de produto amplificado é desprezível quando comparado as ampliações de produtos específicos observados nas amostras teste e calibradora.

Todos os genes demonstraram alta especificidade de amplificação, e não houve amplificação de contaminantes. Na Tabela 11 estão representadas as Tm dos genes avaliados.

**Tabela 11:** Temperatura de dissociação (Tm) dos genes avaliados de promastigotas de *L. (L.) infantum*.

<b>Gene</b>	<b>Tm</b>
GCS	80,7°C
CS	82,5°C
TDR1	88,3°C
DNAPA	82,2°C
AQP1	83,7°C
GAPDH	87,9°C
PAP	83,4°C
PGM	86,9°C
ATUB2	87,2°C
ATUB	86,2°C
TR	85,0°C
TCP	84,2°C
LPP	85,2°C
CYTB	83,7°C
ABCF	84,9°C
TRYP	88,2°C
MRPA	86,4°C
CBS	84,2°C

#### 4.3.4. Determinação dos genes referência

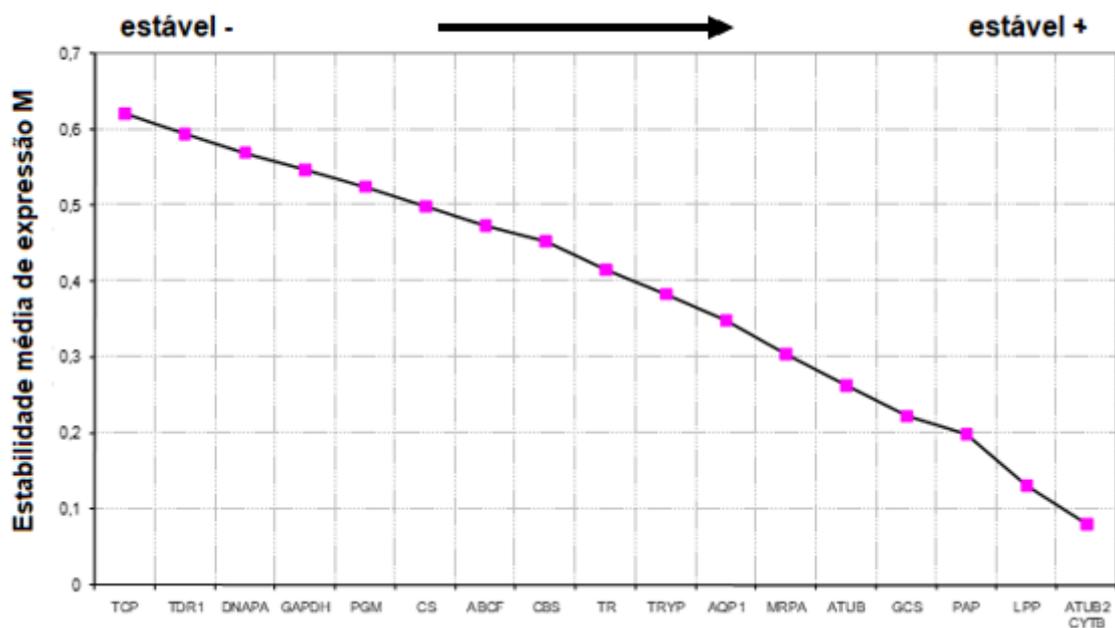
Para avaliar o perfil de expressão gênica entre os promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os diferentes anti-histamínicos foi utilizado o método do Cq comparativo ( $\Delta\Delta Cq$ ). Para o uso deste método, a eficiência dos ensaios dos genes alvo e referência devem ser semelhantes. Do painel de 30 genes estudados, 18 genes foram selecionados como possíveis candidatos a genes referência, por apresentarem características favoráveis a análise, tal como eficiência de 100% ( $\pm 10\%$ ), alta especificidade e sensibilidade de amplificação. O gene referência ideal deve apresentar expressão estável entre as diferentes amostras e tempos avaliados. Ele é usado para normalizar o dado e corrigir as diferenças entre a quantidade de cDNA das amostras.

Os genes selecionados foram analisados no programa geNorm. Os valores de estabilidade gênica foram medidos com base nos níveis de expressão não normalizados. O programa calcula a variação aos pares para todos os genes, definindo como valor M a média da variação de um gene em relação a todos os outros. Para todos os genes candidatos foram determinados os valores M, e o gene referência, com maior estabilidade, é o que possui o menor valor M. Na Tabela 12 estão apresentados os valores médios de estabilidade de expressão (M) dos candidatos a genes referência. O gene ATUB2 foi considerado o mais estável com valor M igual a 0,452. Já o gene menos estável e menos adequado para os estudos foi o gene TCP com valor M igual a 0,836.

Quando se considerou o par de genes com maior estabilidade, os genes ATUB2 e CYTB foram identificados como os mais estáveis para serem usados como genes referências. Na Figura 40, os genes estão classificados de acordo com o aumento da estabilidade de expressão, iniciando com genes menos estáveis (à esquerda) terminando com os dois genes mais estáveis à direita.

**Tabela 12:** Candidatos a gene referência de promastigotas de *L. (L.) infantum* analisados pelo programa geNorm.

<b>Gene</b>	<b>Valor de estabilidade (M)</b>		
ATUB2	0,452		
LPP	0,455	<b>Estável</b>	
CYTB	0,467		
PAP	0,476		
GCS	0,489		
ATUB	0,529		
MRPA	0,544		
TR	0,632		
CS	0,633		
TRYP	0,635		
AQP1	0,657		
PGM	0,663		
GAPDH	0,672		
DNAPA	0,731		
CBS	0,747		<b>Instável</b>
ABCF	0,748		
TDR1	0,81		
TCP	0,836		



**Figura 40:** Valor médio de estabilidade de expressão (M) dos genes referência obtido pelo programa geNorm. Os genes estão classificados de acordo com o aumento da estabilidade de expressão, iniciando com genes menos estáveis (à esquerda) terminando com os dois genes mais estáveis à direita.

#### 4.3.5. Comparação da eficiência de amplificação: gene referência versus gene alvo

Após a determinação do gene referência, o gene ATUB2 foi selecionado por apresentar maior estabilidade de expressão entre as amostras teste e calibradora. Depois o gene referência foi comparado aos genes alvos. Somente quando a eficiência de ambos os ensaios é similar pode utilizar o método do Cq comparativo. Para isso, utilizando a curva-padrão de *Leishmania*, foi calculada a diferença dos valores de Cq do gene alvo do Cq do gene de referência ( $\Delta Cq$ ). Os valores de  $\Delta Cq$  foram plotados contra o logaritmo da concentração de parasitos e realizada uma regressão linear. Os valores de slope  $> -0,1$  a  $< 0,1$  foram considerados com eficiências comparáveis. Na Tabela 13, estão representados os valores de slope da determinação da eficiência de amplificação dos genes avaliados. Dos 18 genes analisados, 11 apresentaram eficiência comparável à eficiência do gene referência.

**Tabela 13:** Comparação da eficiência de amplificação entre gene referência ATUB2 e genes alvo em promastigotas de *L. (L.) infantum* não tratados. A diferença na eficiência da qPCR foi determinada pelo valor de slope calculado na regressão linear.

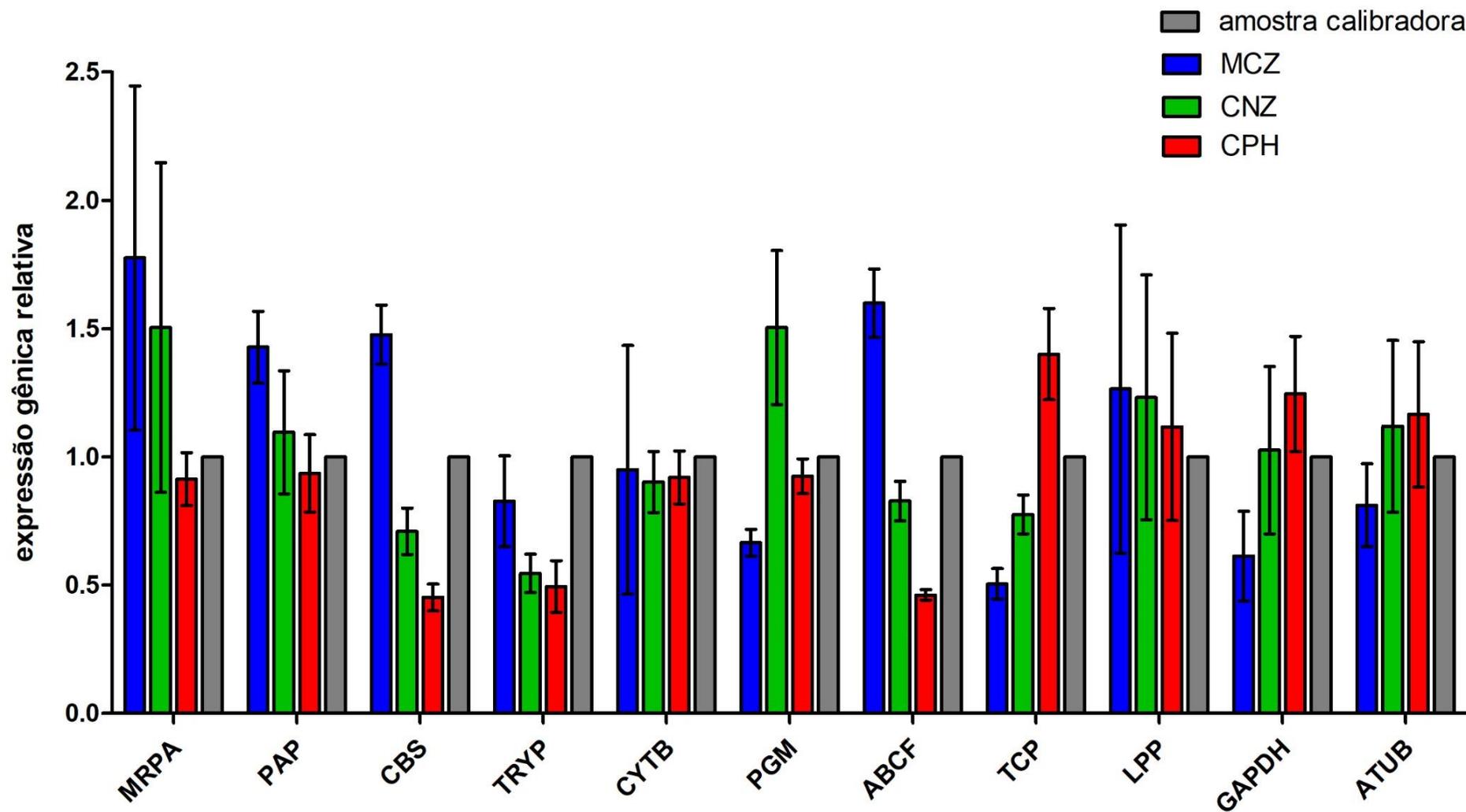
<b>Gene</b>	<b>Valor de slope</b>
Validados	
CBS	-0,105
MRPA	-0,0975
TRYP	-0,07667
ABCF	-0,0675
CYTB	-0,05834
LPP	-0,05383
TCP	-0,051
ATUB	-0,03117
PGM	0,07167
PAP	0,0875
GAPDH	0,105
Não validados	
TR	0,1223
GCS	0,1647
AQP1	0,1998
DNAPA	0,2252
CS	0,2693
TDR	0,2933

#### **4.4. Perfil de expressão gênica de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com fármacos anti-histamínicos**

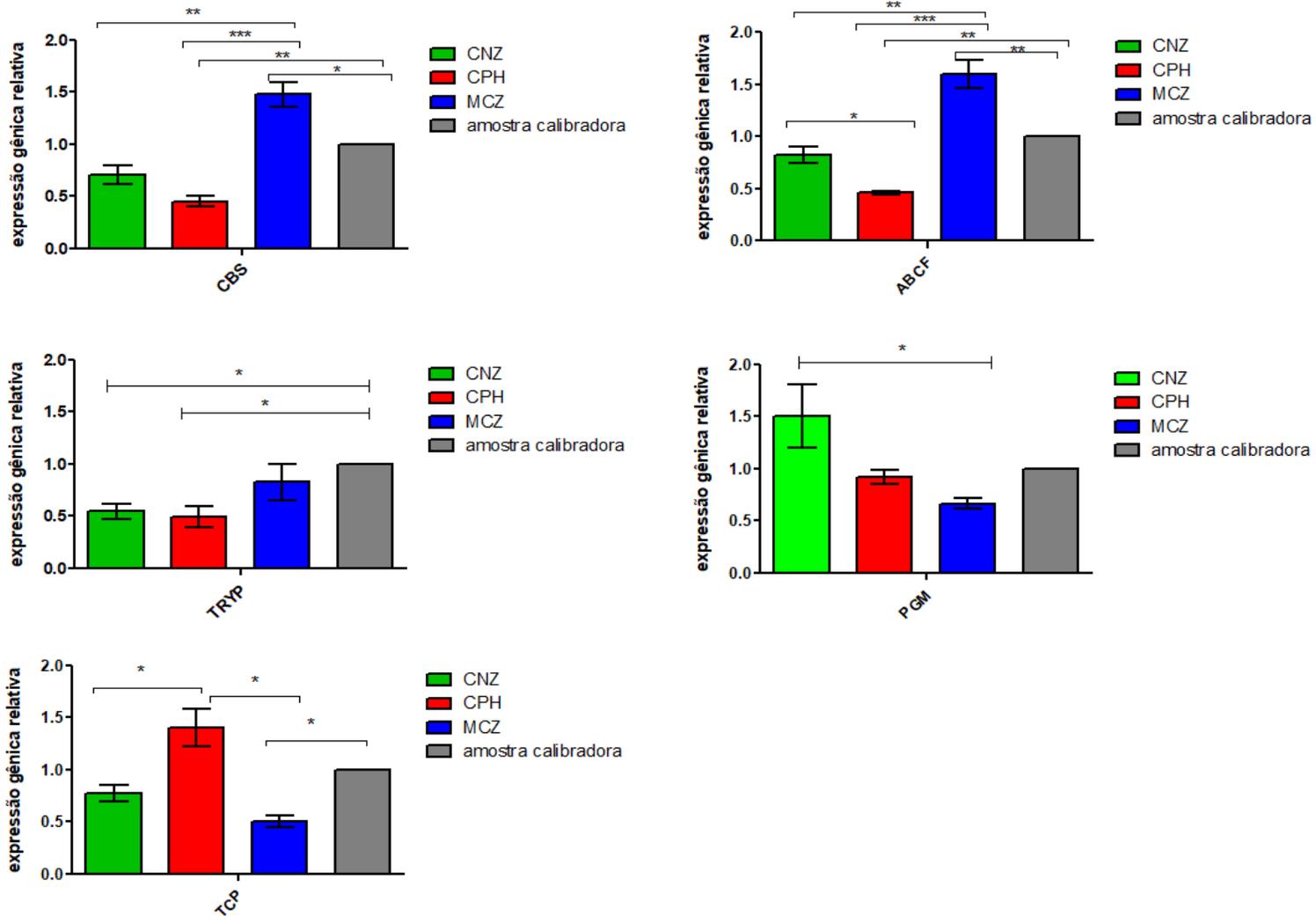
A normalização dos dados foi feita levando em consideração o gene referência proposto pelo geNorm, que além de fornecer os genes mais estáveis e mais adequados, informa o par de genes com menores variações. Assim, os dados de expressão gênica foram calculados por quantificação relativa, que necessita além do gene referência, uma amostra calibradora, a qual todas as outras amostras são comparadas para determinar o nível de expressão relativa para um dado gene. Para isso, como amostra calibradora foi utilizada a amostra de promastigota de *L. (L.) infantum* não tratada.

Para a análise de expressão gênica pelo método comparativo foram selecionados 11 genes por apresentarem eficiência semelhante. Foi analisada a variação na expressão dos genes alvos MRPA, PAP, CBS, TRYP, CYTB, PGM, ABCF, TCP, LPP, GAPDH e ATUB (Figura 41) normalizados pelo gene referência ATUB2 entre as amostras de promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os anti-histamínicos CNZ, CPH e MCZ e, então comparada à expressão medida nos parasitos não tratados.

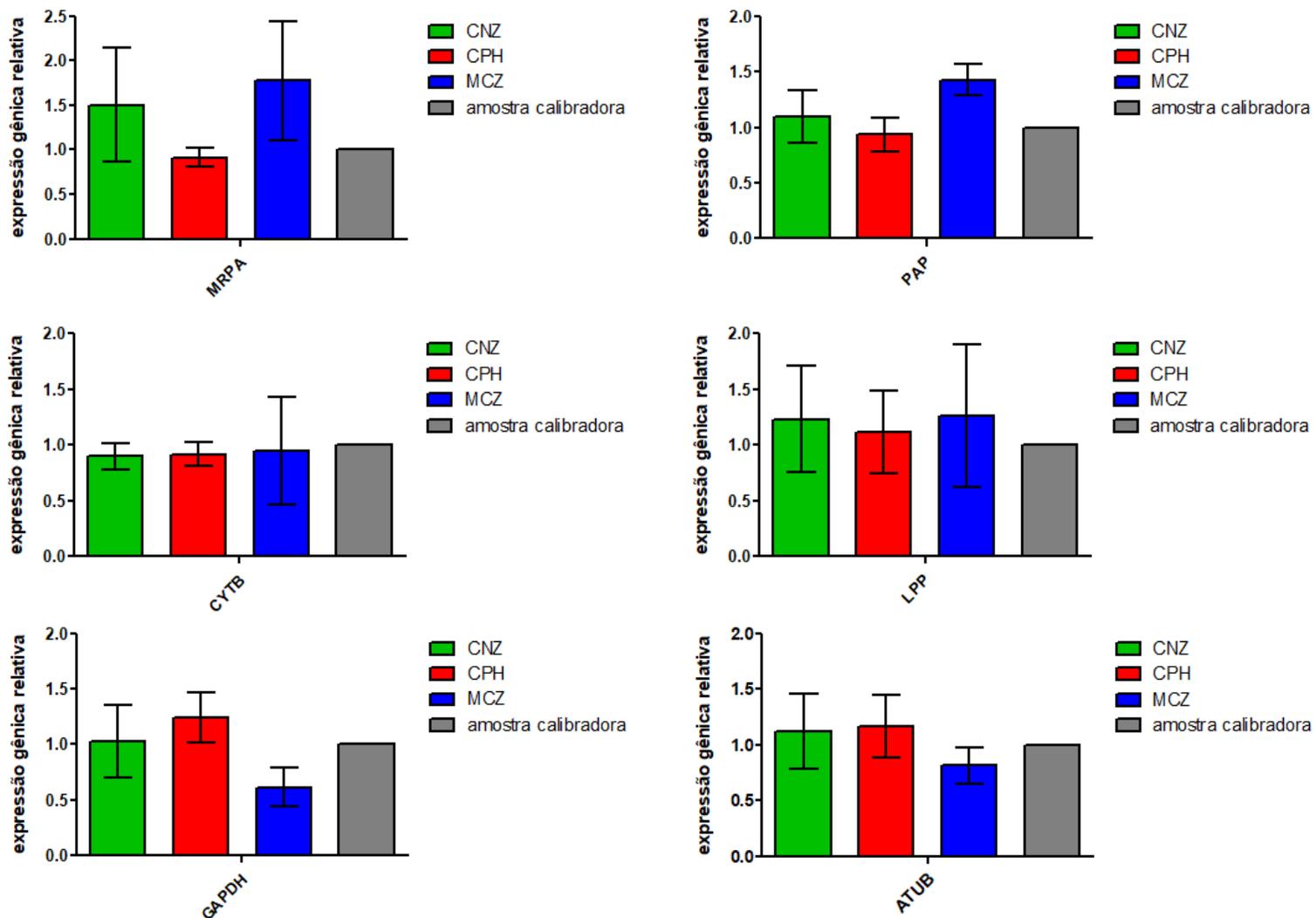
O tratamento com os fármacos CNZ e CPH diminuíram a expressão do gene CBS e MCZ provocou um aumento, com variação na expressão gênica relativa estatisticamente significativa. Efeito similar, foi observado na expressão do gene ABCF, os fármacos CNZ e CPH reduziram a expressão e MCZ aumentou. Comparativamente entre os tratamentos, o fármaco CPH provocou maior decréscimo. Também foi identificado redução na expressão do gene TRYP após o tratamento com fármacos CNZ e CPH, no entanto, MCZ não causou alteração estatisticamente significativa. Com relação ao gene PGM, o fármaco CNZ aumentou a expressão quando comparado ao tratamento com MCZ. O gene TCP sofreu redução na sua expressão quando o parasito foi tratado com o fármaco MCZ (Figura. 42). Comparativamente entre os tratamentos, o fármaco CPH provocou maior elevação, com diferença estatisticamente significativa. O tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ não causou alteração estatisticamente significativa na expressão relativa dos genes MRPA, PAP, CYTB, LPP, GAPDH e ATUB (Figura 43).



**Figura 41:** Expressão relativa dos genes alvo MRPA, PAP, CBS, TRYP, CYTB, PGM, ABCF, TCP, LPP, GAPDH e ATUB em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ na CE<sub>50</sub> por 1 h. O nível de expressão foi redimensionado baseado na amostra calibradora (promastigotas não tratados).



**Figura 42:** Expressão relativa dos genes alvo CBS, ABCF, TRYP, PGM e TCP em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ na CE<sub>50</sub> por 1 h. O nível de expressão foi redimensionado baseado na amostra calibradora (promastigotas não tratados).



**Figura 43:** Expressão relativa dos genes alvo MRPA, PAP, CYTB, LPP, GAPDH e ATUB em relação ao gene de referência ATUB2, analisados em promastigotas de *L. (L.) infantum* submetidos ao tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ na  $CE_{50}$  por 1 h. O nível de expressão foi redimensionado baseado na amostra calibradora (promastigotas não tratados).

## 5. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral ainda é uma doença negligenciada que acomete milhões de pessoas em mais de 100 países (Burza *et al.*, 2018). Infelizmente, a terapêutica atualmente disponível é demasiadamente custosa, sobretudo para famílias de baixa renda, requerendo em muitos casos a hospitalização e devido ao alto índice de toxicidade há longas descrições de comprometimento de órgão vitais durante os tratamentos, bem como deformidade fetal em gestantes. Diante dessa realidade, fica evidenciada a extrema necessidade de pesquisas que tragam novas opções medicamentosas no tratamento das leishmanioses (Nagle *et al.*, 2014).

O reposicionamento de fármacos é considerado uma viável alternativa na busca de novas indicações para medicamentos que estão no mercado para um determinado uso terapêutico, por tratar-se de um composto conhecido em uso clínico, seus efeitos adversos, interação com o organismo e composição química são bem elucidados o que faz a disposição dessas novas descobertas serem mais rápidas e efetivas (Andrews *et al.*, 2014). Esta abordagem tem sido bem-sucedida visto que a maioria dos medicamentos antiparasitários em uso atualmente foram originalmente desenvolvidos para outras indicações (Pink *et al.*, 2005). Todos os medicamentos usados na terapêutica das leishmanioses são de reposicionamento, como é o caso dos antimoniais, inicialmente indicados para tratar outras doenças parasitárias; o fármaco miltefosina, originalmente indicado para o tratamento de câncer; o fármaco anfotericina B, usado como antifúngico; a pentamidina, indicada para tratar doença do sono; a paromomicina, um antibiótico de amplo espectro (Nagle *et al.*, 2014).

Os fármacos com ação anti-histamínica estão entre as medicações mais comumente prescritas na prática dermatológica diária, tanto em adultos como em crianças (Criado *et al.*, 2010). Neste estudo avaliamos fármacos pertencentes à classe farmacológica de anti-histamínicos, agonistas inversos de receptores de histamina do tipo H1. Os anti-histamínicos H1 regulam negativamente o processo inflamatório alérgico interferindo com a ação de histamina nos receptores H1 em neurônios sensoriais e vasos sanguíneos. Estes receptores também são expressos em outros tecidos e células, tais como do

sistema nervoso central, músculo liso, neutrófilos, eosinófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B e T, células endoteliais e epiteliais (Simons e Simons, 2011).

Estudamos cinco fármacos anti-histamínicos H1, tais como cetirizina (CTZ), ciproheptadina (CPH), fexofenadina (FXF) e meclizina (MCZ), ainda sem descrição na literatura sobre sua atividade antitripanosomatídeos e cinarizina (CNZ), com atividade antileishmania conhecida. A CPH, CNZ e MCZ apresentaram atividade contra ambas as formas de *L. (L.) infantum*, sendo tempo-concentração-dependente. No entanto, os fármacos anti-histamínicos FXF e CTZ não demonstraram efetividade contra ambas as formas dos parasitos nas concentrações máxima avaliadas. Neste trabalho, descrevemos pela primeira vez a atividade antileishmania de dois anti-histamínicos, CPH e MCZ.

Nossos dados corroboram com os relatos descritos para outros fármacos anti-histamínicos, tais como clorfeniramina, cinarizina, hidroxizina, cetotifeno, loratadina, quetiapina e risperidona, os quais apresentaram atividade contra promastigotas de *L. (L.) infantum* com valor de CE<sub>50</sub> de 13 a 84 µM, dentre eles a cinarizina (CNZ) foi o único fármaco efetivo contra amastigotas com valor de CE<sub>50</sub> de 21 µM (Pinto *et al.*, 2014).

Outros anti-histamínicos também demonstraram efeitos antitripanosomatídeos. Em uma triagem de fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), dois anti-histamínicos foram encontrados efetivos contra o *Trypanosoma cruzi*, a azelastina (CE<sub>50</sub> = 2,2 µM) e a clemastina (CE<sub>50</sub> = 0,4 µM). Quando esses fármacos foram combinados *in vitro* com fármacos de diferentes classes farmacológicas, a clemastina mostrou um efeito sinérgico. Os autores também relataram em estudo experimental *in vivo* a combinação entre clemastina e posaconazol, suprimiu a parasitemia em um modelo de fase aguda (Planer *et al.*, 2014).

A CNZ, CPH e MCZ são anti-histamínicos de primeira geração, que cruzam a barreira hematoencefálica (BHE), são bastante lipossolúveis, têm baixo peso molecular e alta afinidade pelos receptores H1 cerebrais. Por outro lado, a CTZ e FXF, pertencem à categoria de anti-histamínicos de segunda-geração, que não cruzam a BHE, têm maior peso molecular, baixa lipossolubilidade e baixa afinidade pelos receptores H1 cerebrais. Neste estudo,

observamos que os anti-histamínicos de primeira geração mostraram efeito antileishmania contra ambas as formas dos parasitos e os de segunda geração não apresentaram atividade. Estes dados corroboram com os achados de Pinto e colaboradores (2014), aonde demonstraram que os anti-histamínicos de segunda geração avaliados não foram ativos contra a forma amastigota de *L. (L.) infantum*, considerando ser a forma encontrada no hospedeiro vertebrado, a mais relevante do ponto de vista clínico.

Uma vez conhecida a atividade antileishmania dos anti-histamínicos, torna-se necessário identificar o mecanismo de ação destes fármacos nos parasitos. Em 2014, Pinto e colaboradores descobriram a efetividade da CNZ contra ambas as formas de *Leishmania*, mas ainda não havia estudos relacionando sua ação letal. Assim, para identificarmos as alterações celulares e moleculares provocadas pelos fármacos anti-histamínicos ativos em promastigotas de *L. (L.) infantum*, utilizamos diferentes abordagens visando avaliar: permeabilidade de membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, produção de espécies reativas de oxigênio, produção de tióis intracelulares, ultraestruturas celulares e expressão de genes específicos.

### **Marcadores de alterações celulares**

Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com anti-histamínicos H1 foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão, que continua sendo uma ferramenta valiosa em estudos de quimioterapia (Vannier-Santos e De Castro, 2009). Nossas observações revelaram inchaço celular após tratamento com os fármacos CNZ, CPH e MCZ, além de vacuolização citoplasmática intensa, deslocamento da membrana nuclear, desorganização do conteúdo nuclear e, uma alteração significativa das mitocôndrias em comparação com as células não tratadas. Observações semelhantes também foram relatadas em *L. (L.) infantum* após tratamento com sertralina (Lima *et al.*, 2018), *L. (L.) amazonensis* tratados com inibidores de metenil transferase de esterol (Rodrigues *et al.*, 2007) e *L. (L.) donovani* com diterpeno de clerodano (Kathuria *et al.*, 2007). Além disso, o rompimento da integridade estrutural das mitocôndrias através de danos à sua membrana

interna pode também alterar a rede de DNA do cinetoplasto, uma vez que a membrana interna contém o cinetoplasto (de Souza e Rodrigues, 2009).

Compostos que afetam a via de biossíntese ou a permeabilidade da membrana plasmática em *Leishmania* têm sido estudados como alvos interessantes para a descoberta de novos fármacos (Lage *et al.*, 2015; Rea *et al.*, 2013). Nossos dados demonstraram que a CNZ e MCZ alteram a permeabilidade da membrana plasmática, numa relação tempo-concentração dependente. Já a CPH no valor de  $CE_{50}$  não altera significativamente a permeabilidade da membrana plasmática. Como conhecido na literatura, os fármacos anfotericina B e miltefosina se ligam a proteínas da membrana de *Leishmania*, com consequente alteração da permeabilidade celular, indução de poros e consequente morte do parasito (Chattopadhyay e Jafurulla, 2011; Fernandes *et al.*, 2017).

A mitocôndria de protozoários é considerada um importante alvo para descoberta de fármacos, por ser uma estrutura única, essencial para a sobrevivência dos parasitos e com função bastante peculiar a esta organela. A função fisiológica predominante da mitocôndria é a geração de ATP pela fosforilação oxidativa. Outras funções adicionais incluem a geração e desintoxicação de ERO, envolvimento na apoptose e regulação de cálcio intracelular (Brand e Nicholls, 2011). Além disso, a manutenção do potencial da membrana mitocondrial é essencial para a sobrevivência da célula e alterações podem inibir a cadeia de transporte de elétrons, a síntese de ATP, o desacoplamento proteínas ou a permeabilidade da membrana interna (Fidalgo e Gille, 2011).

Uma vez que parasitos cinetoplastídeos apresentam uma única mitocôndria, constitui um bom indicador de disfunção celular e a sobrevivência depende da função adequada desta organela (Mehta e Shaha, 2004). Desta forma, avaliamos as alterações na mitocôndria induzidas pelos fármacos anti-histamínicos. CNZ, CPH e MCZ alteram o potencial de membrana mitocondrial. Adicionalmente, os estudos de microscopia eletrônica de transmissão também demonstraram alterações morfológicas na mitocôndria – inchaço e desorganização das cristas. Este efeito pode ter contribuído para danos celulares deletérios associados com o sistema bioenergético.

Em estudos anteriores, foi observado que a CNZ altera o potencial de membrana mitocondrial em células cardíacas, correlacionado com efeito no transporte de  $\text{Ca}^{2+}$ . A CNZ também é considerada um antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$  usada no tratamento de doenças cardiovasculares (Fox et al., 1993). Promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com melatonina, um neuro-hormônio, apresentaram alteração na homeostase do cálcio mitocondrial resultando na morte do parasito (Elmahallawy e colaboradores 2014). Com isso, futuros estudos são necessários para avaliar se a alteração mitocondrial causada em *Leishmania* tratada com os anti-histaminicos pode estar relacionada com modificação na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$ .

Nos organismos vivos, a homeostasia celular é afetada por vários fatores, um deles é o excesso de espécies reativas de oxigênio (ERO), através de seus intermediários oxigenados tóxicos, como ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ). *Leishmania spp.* internalizada em macrófagos são expostos a esses agentes, porém a capacidade dos cinetoplastídeos para resistir a danos por oxidação por ERO é essencial para a sobrevivência desses parasitas em seus hospedeiros (Levick et al., 1998).

Para investigar uma possível causa na disfunção mitocondrial induzida pelos anti-histamínicos em *L. (L.) infantum* avaliamos a produção de ERO. Em condições fisiológicas, a produção de ATP através da fosforilação oxidativa gera entre 3 - 5% de ERO da quantidade de oxigênio total consumido (Boonstra e Post, 2004). Em condições patológicas, algumas vias resultam numa produção excessiva de ERO, o que causa se não eliminado pelo sistema antioxidante, o estresse oxidativo. Proteínas, lipídeos e DNA são rapidamente oxidados por ERO, resultando em disfunção do processo fisiológico vital, dano oxidativo e morte celular (Gupta et al., 2009). Em nossos ensaios, apesar da substancial despolarização da membrana mitocondrial dos promastigotas de *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos CNZ, CPH e MCZ, não houve regulação positiva das ERO em comparação com os parasitos não tratados. Rea e colaboradores (2013) obtiveram resultados similares com *Trypanosoma cruzi* tratados com composto isolado de *Calophyllum brasiliense*. Dentro das mitocôndrias, o principal local da produção de ERO é a cadeia de transporte de elétrons, que

envolve quatro complexos associados à proteína (Zhang e Gutterman, 2007). Vários sistemas enzimáticos celulares são fontes potenciais de ERO: NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, óxido nítrico sintase endotelial desacoplada (eNOS), bem como as enzimas da cadeia respiratória. Considerando que muitos fármacos, que afetam as mitocôndrias, também contribui para uma regulação positiva das ERO (Roy *et al.*, 2008; Carvalho *et al.*, 2010), propomos que os anti-histamínicos tem como alvo a mitocôndria de promastigotas de *L. (L.) infantum* mas não afetam enzimas que são potencialmente formadoras de ERO.

Os tripanosomatídeos apresentam um sistema de defesa antioxidante constituído de tióis, que permite sua sobrevivência na célula hospedeira, exercem papel na homeostase de tiol, na detoxificação de produtos, na defesa contra dano oxidativo e nitrosativo (Castro-Pinto *et al.*, 2014; Steenkamp, 2002). Eles produzem quatro principais tióis de baixo massa molecular: tripanotiona, glutathiona, glutathionilpermidina e ovotiol A (Steenkamp, 2002). Em *Trypanosoma* e *Leishmania*, a L-cisteína está envolvida na síntese de glutathiona e tripanotiona que desempenham papéis importantes na proteção contra o estresse oxidativo (Oza *et al.*, 2002). Complementar aos estudos de ERO, foi quantificado os níveis intracelulares de tióis livres, resíduos de glutathiona e cisteína de *L. (L.) infantum* tratados com os anti-histamínicos. Não houve alteração na quantidade de tióis comparado aos parasitos não tratados. Em nossos estudos, a manutenção do metabolismo de tiol corrobora com a estabilidade na produção de espécies reativas de oxigênio. Uma vez que como a produção de ERO não foi afetada, as enzimas do metabolismo de tiol também não alteraram, para exercer a regulação do estresse oxidativo. O aumento do tiol intracelular mantém a homeostase redox (Deep *et al.*, 2017). Magalhães e colaboradores (2018) demonstrou que em cepas de isolados clínicos de promastigotas de *L. (L.) infantum* resistentes ao antimonial, os níveis de ERO são controlados com o aumento do metabolismo de tióis na tentativa de controlar o estresse oxidativo no parasito.

A lipossolubilidade é um dos principais fatores que pode influenciar na absorção de um fármaco já que este, para que exerça sua função, deve atravessar membrana plasmática. Dessa forma, para que as substâncias transponham membranas com facilidade devem apresentar certa

lipossolubilidade (Monteiro e Garret, 2001). Em nossos estudos, os anti-histamínicos de primeira geração (CNZ, CPH e MCZ) são mais lipofílicos que os de segunda (FXF e CTZ) e apresentaram efetividade em ambas formas de *L. (L.) infantum*. CNZ, CPH e MCZ demonstraram ser incorporados pelas biomembranas, alterando a permeabilidade da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial. Esses achados podem estar correlacionados com o coeficiente de partição (logP), parâmetro de medida quantitativa da lipofilicidade de compostos bioativos, apresentando valores de logP 4,69; 5,77 e 5,8, respectivamente.

### **Alterações moleculares**

A determinação do perfil de expressão gênica permite a caracterização molecular da resposta celular do hospedeiro bem como dos parasitos, além de verificar se as várias funções celulares são afetadas em diferente extensão pelas condições experimentais. O painel de marcadores moleculares possibilita inferir de maneira rápida e precisa qual função biológica o fármaco provocou alteração. Observamos o perfil de expressão gênica de 11 genes que codificam para diferentes funções celulares frente ao tratamento com os diferentes fármacos anti-histamínicos.

A utilização de genes referência nas análises de expressão relativa é essencial para a normalização dos dados, tornando-se um método importante para corrigir diferenças entre as amostras e os critérios de escolha desse gene podem determinar a confiabilidade dos resultados (Bustin *et al.*, 2009). O uso de genes referência como controles internos é o método mais comum para normalizar os dados do mRNA celular; entretanto, embora o uso de genes referência seja comumente aceito como a estratégia de normalização mais apropriada, sua utilidade deve ser validada experimentalmente para determinados tecidos ou tipos de células e delineamentos experimentais específicos, porque não existe um gene de referência universal (Huggett *et al.*, 2005; Kozera e Rapacz 2013). Os genes CYCL, DNAPA, PABP, GAPDH e PAP são comumente usados como genes normalizadores (Deep *et al.*, 2017, Decuypere *et al.*, 2005), no entanto, em nossos estudos apresentaram uma

grande variabilidade entre os diferentes tratamentos experimentais. O gene ATUB2 (alfa-tubulina) foi considerado o mais estável entre todos os genes analisados e utilizado como gene referência para a normalização da expressão gênica de promastigotas *L. (L.) infantum* tratados com os fármacos. O gene ATUB2 é responsável pela forma celular, um componente fundamental do citoesqueleto e, está envolvido na divisão celular, na motilidade ciliar e flagelar e no transporte intracelular (Ramírez *et al.*, 2013). Ele também foi proposto como referência para normalizar os dados de expressão gênica em *L. (L.) donovani* por Deep e colaboradores (2017).

Os genes CBS (cistationa  $\beta$ -sintase) e TRYP (triparedoxina peroxidase) desempenham importante papel na defesa antioxidante e no combate contra o estresse oxidativo induzido por drogas (Giordana *et al.*, 2014; Deep *et al.*; 2017). O tratamento com os fármacos anti-histamínicos alterou a expressão do gene CBS; CPH diminuiu e MCZ aumentou a expressão. Para o gene TRYP; CNZ e CPH reduziram a expressão relativa. Em cepas de *Leishmania spp.* resistentes aos antimoniais foi observado um aumento na expressão dos genes envolvidos na biossíntese de tióis (CBS, GCS, ODC, TRYP, TR) aumentando a capacidade de detoxificar antimônio (Decuyper *et al.*, 2012). O aumento na expressão das proteínas CBS e CS foi associado com o aumento nos níveis de tióis em resposta ao estresse oxidativo (Romero *et al.*, 2015). No entanto, em nosso estudo não observamos alterações nos níveis de tióis. Cabe ressaltar, que a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos ocorre após a transcrição, isto é, a produção de proteínas não está diretamente relacionada com o nível de expressão do gene (Gaudenzi *et al.*, 2011). Futuros estudos são necessários para identificar outros genes relacionados ao metabolismo oxidativo e elucidar a associação com os anti-histamínicos.

Os genes ABCF (cassete de ligação de ATP subfamília F) estão relacionados a proteínas integrais de membrana envolvidas no transporte dependente de energia de uma variedade de moléculas através de membranas biológicas, incluindo aminoácidos, açúcares, peptídeos, lipídios, íons e quimioterápicos (Higgins, 1992). Em nosso estudo, o fármaco CPH reduziu e MCZ aumentou a expressão do gene ABCF. Castanys-Muñoz e colaboradores (2008) observaram que o aumento na expressão da proteína ABC da subfamília

G em promastigotas de *L. infantum* está relacionado com alteração no tráfego de fosfolípidios e contribui para a resistência ao fármaco miltefosina. Futuros estudos são necessários para esclarecer o papel deste gene e correlacionar com as alterações causadas pelos anti-histamínicos.

O gene PGM (fosfoglucomutase putativa) desempenha um papel fundamental no metabolismo de carboidratos catalisando reversivelmente a conversão de glicose-1-fosfato (G1P) a glicose-6-fosfato (G6P) pela transferência de um fosfato entre os grupos hidroxila C6 e C1 de glicose. Em tripanosomatídeos, desempenha um papel fundamental no metabolismo associado à síntese de carboidratos da superfície celular (Waugh *et al.*, 2016). Em nossos estudos, CNZ induziu aumento na expressão do gene PGM. De acordo com Penha e colaboradores (2005) há indicações de que o gene PGM tem relação na homeostase de  $Ca^{2+}$  celular, *Saccharomyces cerevisiae* deficiente neste gene exibia um aumento de 9 vezes no teor total de  $Ca^{2+}$ . O aumento na expressão do gene PGM induzida pela CNZ pode ter relação com a diminuição dos níveis de  $Ca^{2+}$ , devido ao efeito antagonista mostrado por Fox e colaboradores (1993). Entretanto futuros estudos serão necessários para corroborar essa hipótese e relacionar esses achados com níveis de  $Ca^{2+}$  intracelular em *L. (L.) infantum* tratados com os anti-histamínicos.

O gene TCP (chaperonina TCP20) desempenha função essencial na conformação e estabilidade de proteínas (Sternlicht *et al.* 1993, Young *et al.*, 2004). Em nossos estudos o fármaco MCZ reduziu expressão do gene TCP. Outros pesquisadores observaram que *L. (L.) donovani* resistentes a miltefosina apresentam a diminuição na expressão desse gene (Kulshrestha *et al.* 2014; Deep *et al.*, 2017). No entanto, estudos mais aprofundados são necessários para compreender os danos celulares relacionadas com a diminuição na expressão do gene TCP.

Por afetarem as populações mais empobrecidas nos países menos desenvolvidos, as leishmanioses não constituem um mercado lucrativo para as indústrias farmacêuticas. Em 2006, apenas 1,3% dos medicamentos disponibilizados entre os anos de 1975 e 2004 foram para as doenças negligenciadas, apesar de representarem 12% da carga global de doenças

(Trouiller *et al.*, 2002). Assim torna-se imperativo a busca por novos fármacos com redução de custos na fase de pesquisa e desenvolvimento. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os fármacos anti-histamínicos podem ser usados para determinação de novas rotas de morte celular e de alvos moleculares no parasito, contribuindo para o conhecimento do seu potencial como candidatos a agentes antileishmania, podendo ser explorados como compostos líderes e protótipos de fármacos.

## 6. CONCLUSÃO

Assim, podemos concluir que:

1. Identificamos pela primeira vez, a atividade antileishmania, contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) infantum*, de dois fármacos anti-histamínicos; ciproeptadina e meclizina;

2. Os fármacos anti-histamínicos cinarizina, ciproeptadina e meclizina foram ativos contra ambas as formas de *L. (L.) infantum*, com concentração efetiva similar ao fármaco miltefosina, usado no tratamento clínico da leishmaniose;

3. Os fármacos anti-histamínicos cetirizina e fexofenadina não demonstraram atividade antileishmania contra ambas as formas de *Leishmania*, na concentração máxima avaliada;

4. Os fármacos anti-histamínicos apresentaram citotoxicidade similar ao fármaco miltefosina, mostrando um índice de seletividade próximo ao fármaco padrão;

5. Estabelecemos um painel com 30 genes para identificar alterações moleculares em promastigotas de *L. (L.) infantum*, potenciais para avaliação de resposta terapêutica;

6. A atividade antileishmania de cinarizina, ciproeptadina e meclizina está relacionada com alteração: na permeabilidade da membrana plasmática, disfunção mitocondrial, expressão de genes responsáveis pelo metabolismo antioxidante, proteínas integrais de membrana e estabilidade de proteínas;

7. Os fármacos anti-histamínicos podem ser avaliados a fim de se identificar novas rotas de morte celular e de alvos moleculares no parasito, contribuindo para o conhecimento do seu potencial como candidatos a agentes

antileishmania, podendo ser explorados como compostos líderes e protótipos de fármacos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Ve'lez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One*, 7(5):35671, 2012.

Andrews KT, Fisher G, Skinner-Adams TS. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 4(2):95-111, 2014.

Barret MP, Mottram JC, Coombs GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. *Trends Microbiol.* 7(2):82-8, 1999.

Bartra J, Velero AL, del Curvillo A, Dávila I, Jáuregui I, Montoro J, *et al.* Interactions of the H1 antihistamines. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 16(1):29-36, 2006.

Bennett MC, Mlady GW, Kwon YH, Rose GM. Chronic in vivo sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J Neurochem.* 66(6):2606-11, 1996.

Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev. Infect. Dis.*, v.10, p. 560-586, 1988.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.* 24(4):684-703, 1997.

Besteiro S, Williams RAM, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int. J. Parasitol.* 37(10):1063-75, 2007.

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

Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal* 435: 297–312, 2011.

Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 15;392(10151):951-970, 2018.

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 55(4):611-22, 2009.

Campbell MK. Inibidores da respiração bloqueiam o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. *Bioquímica. Artmed.* 3ª edição, 537,2006.

Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castanys S, Rivas L, *et al.* Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 54: 5344–5351, 2010.

Castro-Pinto DB, Fabrino DL, Leon LA. importância de radicais livres durante a infecção por protozoários do gênero *Leishmania*. In: Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmaniose do continente americano.* Rio de Janeiro, Ed Fiocruz, 2014.

Cavazzuti A, Paglietti G, Hunter WN, Gamarro F, Piras S, Loriga M, *et al.* Discovery of potent pteridine reductase inhibitors to guide antiparasite drug development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(5):1448-53, 2008.

Chappuis F, Sundar S, Halui A, Ghalib H, Rijal S, Peeling, RW, *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* 5(11):873-82, 2007.

Chattopadhyay A, Jafurulla M. A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 416:7-12, 2011.

Chawla B, Madhubala R. Drug targets in *Leishmania*. *J. Parasit. Dis.* 4(1):1–13, 2010.

Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 15;48(6):749-62, 2010.

Conceição-Silva F, Alves CR. *Leishmanioses do continente americano.* 1ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 512p, 2014.

Coura JR. *Síntese das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Criado PR, Criado RFFJ, Maruta CW, Machado-Filho CAM. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos coceitos. *Na. Bras. Dermatol.* 85(2):195-210, 2010.

Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in Parasitology*. 19(11):502-8, 2003.

CVE. Centro de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde. Dados Estatísticos. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral segundo LPI e ano de notificação, Estado de São Paulo. Disponível em: (<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/zoonoses/leishmaniose-visceral/dados-estatisticos>)  
Acessado em: 27/02/2019.

de Benedictis FM, de Benedictis D, Canonica GW. New oral H1 antihistamines in children: facts and unmet needs. *Allergy*. 63:1395-1404, 2008.

Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, *et al*. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 49(11):4616-21, 2005.

Decuypere S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Müller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC, Coombs GH. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(2):e1514, 2012.

Decuypere S, Vanaerschot M, Rijal S, Yardley V, Maes L, De Doncker S, *et al*. Gene expression profiling of *Leishmania (Leishmania) donovani*: overcoming technical variation and exploiting biological variation. *Parasitology*. 135(2):183-94, 2008.

De Macedo-Silva ST, De Oliveira Silva TL, Urbina JA, De Souza W, Rodrigues JC. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biol Int*. 876021, 2011.

de Souza, W., Rodrigues, J.C.F., 2009. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis*. 1–19, 2009.

Deep DK, Singh R, Bhandari V, Verma A, Sharma V, Wajid S, *et al*. Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 2017.

Derveaux S, Vandesomepele J, Hellemans J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods*. 50(4):227-30, 2010.

Dorlo TP, Van Thiel PP, Huitema AD, Keizer RJ, De Vries HJ, Beijnen JH, De Vries PJ. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 2855–2860, 2008.

DrugBank. Drug. 2018. Disponível em: (<https://www.drugbank.ca/>).  
Acessado em: 02/11/2018.

Dumas C, Ouellette M, Tovar J, Cunningham ML, Fairlamb AH, Tamar S, Olivier M, Papadopoulou B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. *EMBO J.* 16:2590–2598, 1997.

Elmahallawy EK, Jiménez-Aranda A, Martínez AS, Rodríguez-Granger J, Navarro-Alarcón M, Gutiérrez-Fernández J, Agil A. Activity of melatonin against *Leishmania infantum* promastigotes by mitochondrial dependent pathway. *Chem Biol Interact.* 5;220:84-93, 2014.

Ephros M, Bitnun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 278-282, 1999.

Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: A Novel Bis(Glutathionyl)Spermidine Cofactor For Glutathione Reductase In Trypanosomatids. *Science.* 227:1485–1487,1985.

Fernandes KS, de Souza PE, Dorta ML, Alonso A. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes in plasma membrane proteins. *Biochim Biophys Acta Biomembr.*1859(1):1-9, 2017.

Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res.* 28(11):2758-70, 2011.

Filho AVC, Lucas IC, Sampaio RNR. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41(4):424-427, 2008.

Filippin F, Souza L. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 42(2):167-183, 2006.

Fiocruz. Fundação Oswaldo Cruz. As leishmanioses. Laboratório de imunomodulação. Tratamento. 1997. Disponível em:  
(<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm>).  
Visualizado em: 31/10/2018.

Flohe L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic. Bio. Med.* 27(9-10):966-84, 1999.

Fox RM, Morgan RM, Markham A. Calcium antagonists and Bay K8644 promote depolarization of the rat heart mitochondrial membrane potential. *Biochem. Pharmacol.* 45, 1995–2001, 1993.

Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HÁ, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 28(2):11-9, 2012.

Freitas VC, Parreiras KP, Duarte APM, Secundino NF, Pimenta PF. Development of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in its natural sandfly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Am J Trop Med Hyg.* 86(4): 606-12, 2012.

Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch, AC, Cassola A. Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem.* 51, 31–46, 2011.

Giordana L, Mantilla BS, Santana M, Silber AM, Nowicki C. Cystathionine  $\gamma$ -lyase, an enzyme related to the reverse transsulfuration pathway, is functional in *Leishmania* spp. *J Eukaryot Microbiol.* 61(2):204-13, 2014.

Gontijo B, Carvalho MLR. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc. Bras. Med. Trop.* 36(1):71-80, 2003.

Gupta S, Bhatia V, Wen JJ, Wu Y, Huang MH, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. *Free Radical Biology e Medicine* 47: 1414–1421, 2009.

Hassan P, Fergusson D, Grant KM, Mottram JC. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana* *Mol. Biochem. Parasitol.* 6;113(2):189-98, 2001.

Heller A, Brockhoff G, Goepferich A. Targeting drugs to mitochondria. *Eur J Pharm Biopharm.* 82(1):1-18, 2012.

Higgins, C.F. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67–113, 1992.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279 –84, 2005.

Johnson I, Spence MTZ, editores. *The molecular probes handbook: a guide to fluorescent probes and labeling technologies.* 11° ed. Carlsbad: Life Technologies, 2010.

Kathuria M, Bhattacharjee A, Sashidhara KV, Singh SP, Mitra K. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 5916–5928, 2014.

Keenan M, Alexander PW, Diao H, Best WM, Khong AK, Thompson RC, *et al.* Design, structure-activity relationship and in vivo efficacy of piperazine analogues of fenarimol as inhibitors of *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Med Chem.* 21(7):1756-63, 2013.

Kozera B, Rapacz M. Reference genes in real-time PCR. *J Appl Genet.* 54(4): 391–406, 2013.

Lage PS, Chávez-Fumagalli MA, Mesquita JT, Mata LM, Fernandes SOA, Cardoso VN, *et al.* Antileishmanial activity and evaluation of the mechanism of action of strychnobiflavone flavonoid isolated from *Strychnos pseudoquina* against *Leishmania infantum*. *Parasitology Research.* 114(12):4625–4635, 2015.

Lejay A, Charles AL, Zoll J, Bouitbir J, Thaveau F, Piquard F, Geny B. Skeletal muscle mitochondrial function in peripheral arterial disease: usefulness of muscle biopsy. *Muscle Biopsy.* 2012:133–54, 2012.

Levick MP, Tetaud E, Fairlamb AH, Blackwell JM. Identification and characterisation of a functional peroxidoxin from *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol.* 30;96(1-2):125-371, 1998.

LHSC, London Health Sciences Centre. All about mitochondria. [acesso em 11 de agosto de 2012]. Disponível em: ([http://www.lhsc.on.ca/Patients\\_Families\\_Visitors/Genetics/Inherited\\_Metabolic/Mitochondria/AllAboutMitochondria.htm](http://www.lhsc.on.ca/Patients_Families_Visitors/Genetics/Inherited_Metabolic/Mitochondria/AllAboutMitochondria.htm)). Visualizado em: 07/01/2019.

Lima ML, Abengózar MA, Nácher-Vázquez M, Martínez-Alcázar MP, Barbas C, Tempone AG *et al.* Molecular Basis of the Leishmanicidal Activity of the Antidepressant Sertraline as a Drug Repurposing Candidate. *Antimicrob. Agents Chemother.* 62, AAC.01928-18, 2018.

Lukes J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT. Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell.* 1(4):495-502, 2002.

Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M. In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell* 1;232(2):339-48, 1997.

Magalhães LS, Bomfim LGS, Mota SG, Cruz GS, Corrêa CB, Tanajura DM, Lipscomb MW *et al.* Increased thiol levels in antimony-resistant *Leishmania infantum* isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 113(2):119-125, 2018.

Mayence A, Vanden EJJ, Lecour LJR, Walker LA, Tekwani BL. Piperazine-linked bisbenzamidines: a novel class of antileishmanial agents. *Eur J Med Chem.* 39(6):547-53, 2004.

McGwire BS, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 107(1):7-14, 2014.

Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem.* 279:11798–813, 2004.

Melos JLR, Echevarria A. Sistemas Enzimáticos de Tripanossomatídeos como Potenciais Alvos Quimioterápicos. *Ver. Virtual Quim.* 4(4),374-392, 2012.

Menezes JPB, Guedes CES, Petersen ALOA, Fraga DBM, Veras PST. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *BioMed Research International*, v. 2015, p. 1–11, 2015.

Mesquita JT, Pinto EG, Taniwaki NN, Galisteo AJR, Tempone AG. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. *Acta Trop.* 128(3):666-73, 2013.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2005.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília; 2014.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Brasília; 2017.

Ministério da Saúde. Situação Epidemiológica – Dados, 2018.  
Disponível em: (<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral/11334-situacao-epidemiologica-dados>).  
Visualizado em: 03/01/2019.

Monteiro JG, Garrett J. Farmacocinética - Passagem de fármacos através das membranas biológicas. Em P. Editora (Ed.), *Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas 4a Edição.*, pp. 36–45, 2001.

Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* 59(2):204-11, 2007.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561–1577, 2005.

Nagle AN, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJN, *et al.* Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. *Chem. Rev.*, 114(22):11305-11347, 2014.

Neves DN. *Parasitologia Humana*. 11ªed. São Paulo: Atheneu; 2010.  
Novac N. Challenges and opportunities of drug repositioning. *Trends Pharmacol Sci.* 34(5):267-72, 2013.

Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLOS Pathogens*, 2013.

Omollo, R., Alexander, N., Edwards, T., Khalil, E. A., Younis, B. M., Abuzaid, A. A. *et al.* Safety and efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 12, 166, 2011.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Controle das Leishmanioses. 2010.  
Disponível em:  
([http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf)).  
Visualizado em: 23/10/2018.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Leishmanioses, 2018.  
Disponível em:(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>)  
Visualizado em: 22/10/2018.

Oprea TI, Mestres J. Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. *AAPS J.* 14(4):759-63, 2012.

Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warnon SS & Fairlamb AH. A single enzyme catalyses formation of trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 277: 35853–35861, 2002.

Padhy BM, Gupta YK. Drug repositioning: re-investigating existing drugs for new therapeutic indications. *J Postgrad Med.* 57(2):153-60, 2011.

Patterson S, Jones DC, Shanks EJ, Frearson JA, Gilbert IH, Wyatt PG, *et al.* Synthesis and evaluation of 1-(1-(Benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *Chem Med Chem.* 4(8):1341-53, 2009.

Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. PLoS Neglected Tropical Diseases. 8(7):2977, 2014.

Pelissari DM, Cechinel MP, Souza-Gomes ML, Lima Júnior FEF. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. Epidemiol. Serv. Saúde. 20(1):107-10, 2011.

Penha LL, Mendonça-Previato L, Previato JO, Scharfstein J, Heise N, Lima AP. Cloning and characterization of the phosphoglucomutase of *Trypanosoma cruzi* and functional complementation of a *Saccharomyces cerevisiae* PGM null mutant. Glycobiology. 15(12):1359-67, 2005.

Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide. Biotechniques. 50(2):98-115, 2011.

Pink R, Hudson A, Mouriés M, Bendig M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. Nat. Publ. Group. 4(9):727-740, 2005.

Pinto EG, Costa-Silva T, Tempone AG. Histamine H1-receptor antagonists against *Leishmania (L.) infantum*: an *in vitro* and *in vivo* evaluation using phosphatidylserine-liposomes. Acta Tropica 137:206-210, 2014.

Prata, A. Treatment of kala-azar with amphotericin B. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 57, 266–268, 1963.

PubChem. Explore Chemistry, 2019.

Disponível em: (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>)

Visualizado em: 03/01/2019.

Ramírez CA, Requena JM, Puerta CJ. Alpha tubulin genes from *Leishmania braziliensis*: genomic organization, gene structure and insights on their expression. BMC Genomics. 6;14:454, 2013.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, Jésus MN, Marzal PC, *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Quím. Nova; 26:550-555, 2003.

Rea A, Tempone AG, Pinto EG, Mesquita JT, Rodrigues E, Silva LGM, *et al.* Soulmamarin Isolated from *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae) Induces Plasma Membrane Permeabilization of *Trypanosoma cruzi* and Mitochondrial Dysfunction. PLoS Neglected Tropical Diseases. 7(12):2556, 2013.

Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chiocola VL, Tempone AG. Effectiveness of liposomal buparvaquome in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Exp Parasitol* 130: 195-199, 2012.

Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chiocola VL, Tempone AG. In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. *Exper. Parasitol*. 128:111–115, 2011.

Reimão JQ, Taniwaki NN, Tempone AG. Furazolidone is a selective in vitro candidate against *Leishmania (L.) chagasi*: an ultrastructural study. *Parasitol Res.* 106(6):1465-9, 2010.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 7(9):581-96, 2007.

Rey L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001.

Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TP, Beijnen JH, *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clinical Infectious Diseases* 56, 1530–1538, 2013.

Ritmeijer K, Veeken H, Melaku Y, *et al.* Ethiopian visceral leishmaniasis: generic and proprietary sodium stibogluconate are equivalent; HIV co-infected patients have a poor outcome. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95: 668–72, 2001.

Rodrigues JCF, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, de Souza W. Sterol Methenyl Transferase Inhibitors Alter the Ultrastructure and Function of the *Leishmania amazonensis* Mitochondrion Leading to Potent Growth Inhibition. *Protist* 158, 447–456, 2007.

Romero I, Téllez J, Romanha AJ, Steindel M, Grisard EC. Upregulation of Cysteine Synthase and Cystathionine  $\beta$ -Synthase Contributes to *Leishmania braziliensis* Survival under Oxidative Stress. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(8):4770-81, 2015.

Roy A, Ganguly A, Bose-Dasgupta S, Das BB, Pal C, *et al.* Mitochondriaindependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Molecular Pharmacology* 74: 1292–1307, 2008.

Saha, A.K; Mukherjee, J; Bhaduri, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 19, p. 195- 200, 1986.

Sampaio, SA., Godoy JT, Paiva L, Dillon NL, Da LC. The treatment of American (mucocutaneous) leishmaniasis with amphotericin B. *Archives of Dermatology* 82, 627–635, 1960.

Sereno D, Holzmuller P, Mangot I, Cuny G, Ouaiissi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 45: 2064-2069, 2001.

Sies H. Role of metabolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation: redox signaling and oxidative stress. *J Biol Chem.* 28;289(13):8735-41, 2014.

Silva GS, Silva RMM, Diniz VA, Côrte-Real S. *Leishmanioses do continente americano*. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 55p, 2014.

Silva-López. Proteases de *Leishmania*: Novos Alvos Para o Desenvolvimento Racional de Fármacos. *Quim. Nova.* 33(7):1541-1548, 2010.

Simons FER, Simons KJ. Histamine and H<sub>1</sub>-antihistamines: Celebrating a century of progress *J Allergy Clin Immunol.* 128(6):1139-50, 2011.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 5(6):485-97, 2012.

Singh B, Sundar S. Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. *Vaccine.* 30(26):3834-42, 2012.

Sistigu A, Viaud S, Chaput N, Bracci L, Proeitti E. Implementations for vaccine design. *Semin. Immun.* 33:369–383, 2011.

Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 40(2):139-149, 2004.

Soares RO, De A, Leon L. Modelos de estudos para o desenvolvimento de drogas antileishmania. *In: Silva-Conceição, F.; Alves, C. C. Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz. 2014. Cap. 23, p. 413-428.

Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, *et al.* Miltefosine for New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 38(9):1266-72, 2004.

Souza MA. Leishmaniose Visceral Humana: do Diagnóstico ao Tratamento. Rev. Ciên. Saúde Nova Sp. 10:2, 2012.

Stannard JN e Horecker BL. The in vitro inhibition of cytochrome oxidase by azide and cyanide. J. Biol. Chem. 172:599-608, 1948.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An Eight-day Method for Screening Compounds against *Leishmania donovani* in the Golden Hamster. J. Protozoology. 5(4), 269-273, 1958.

Steenkamp DJ. Thiol metabolism of the trypanosomatids as potential drug targets. IUBMB Life. 53(4-5):243-8, 2002.

Sternlicht H, Farr GW, Sternlicht ML, Driscoll JK, Willison K, Yaffe MB. The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 90, 9422–9426, 1993.

Sundar S, Chakravarty J. Antimony toxicity. Int J Environ Res Public Health. 7: 4267–77, 2010.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, *et al.* Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med. 347(22):1739-46, 2002.

Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. N Engl J Med. 21;356(25):2571-81, 2007.

Sundar S, More DK, Singh MK, *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. Clin Infect Dis. 31: 1104–07, 2000.

Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, *et al.* Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. Clinical Infectious Diseases 55, 543–550, 2012.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. J Immunol Methods. 2:157-65, 1986.

Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JC, Crepaldi PH, Pimenta PF, de Souza W. The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. PLoS Pathog. 9(10):e1003594, 2013.

Tempone AG, Mortara RA, Andrade HF, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Intern. Agents.* 36:159-163, 2010.

Tempone AG, Oliveira CM, Berlinck RG. Current approaches to discover marine antileishmanial natural products. *Planta Med.* 77:572-585, 2011.

Tempone AG, Taniwaki NN, Reimão JQ. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res.* 105(2):499-505, 2009.

Tielens AGM, Van Hellemond JJ. The Electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochimica and Biophysica Acta* 1365(1-2):71-78, 1998.

Tiwari N, Gedda MR, Tiwari VK, Singh SP, Singh RK. Limitations of current therapeutic options, possible drug targets and scope of natural products in control of leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem.* 18(1):26-41, 2018.

Torres DC, Adai V, Ribeiro-Alves M, Romero GA, Arévalo J, Cupolillo E, *et al.* Targeted gene expression profiling in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania guyanensis* parasites isolated from Brazilian patients with different antimonial treatment outcomes. *Infect Genet Evol.* 10(6):727-33. 2010.

Trouiller P, Olliaro PL, Tirrele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and public health policy failure. *Lancet.* 359: 2188-2194, 2002.

Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology.* 145(4):464-480, 2016.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002.

van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 26(2):309-22, 2012.

Vannier-Santos, M., De Castro, S. Electron Microscopy in Antiparasitic Chemotherapy: A (Close) View to a Kill. *Curr. Drug Targets* 10, 246–260, 2009.

Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 8(4):297-318, 2002.

Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M, Périé JJ, Fothergill-Gilmore LA, *et al.* Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat.* 4(1):50-65, 2001.

Waugh B, Sen U, Banerjee R. Crystal structure of phosphoglucomutase from *Leishmania major* at 3.5 Å resolution. *Biochimie*. 121:102-11, 2016.

Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, Chang Z, Woolsey J. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res*. 1(34): D668-72, 2006.

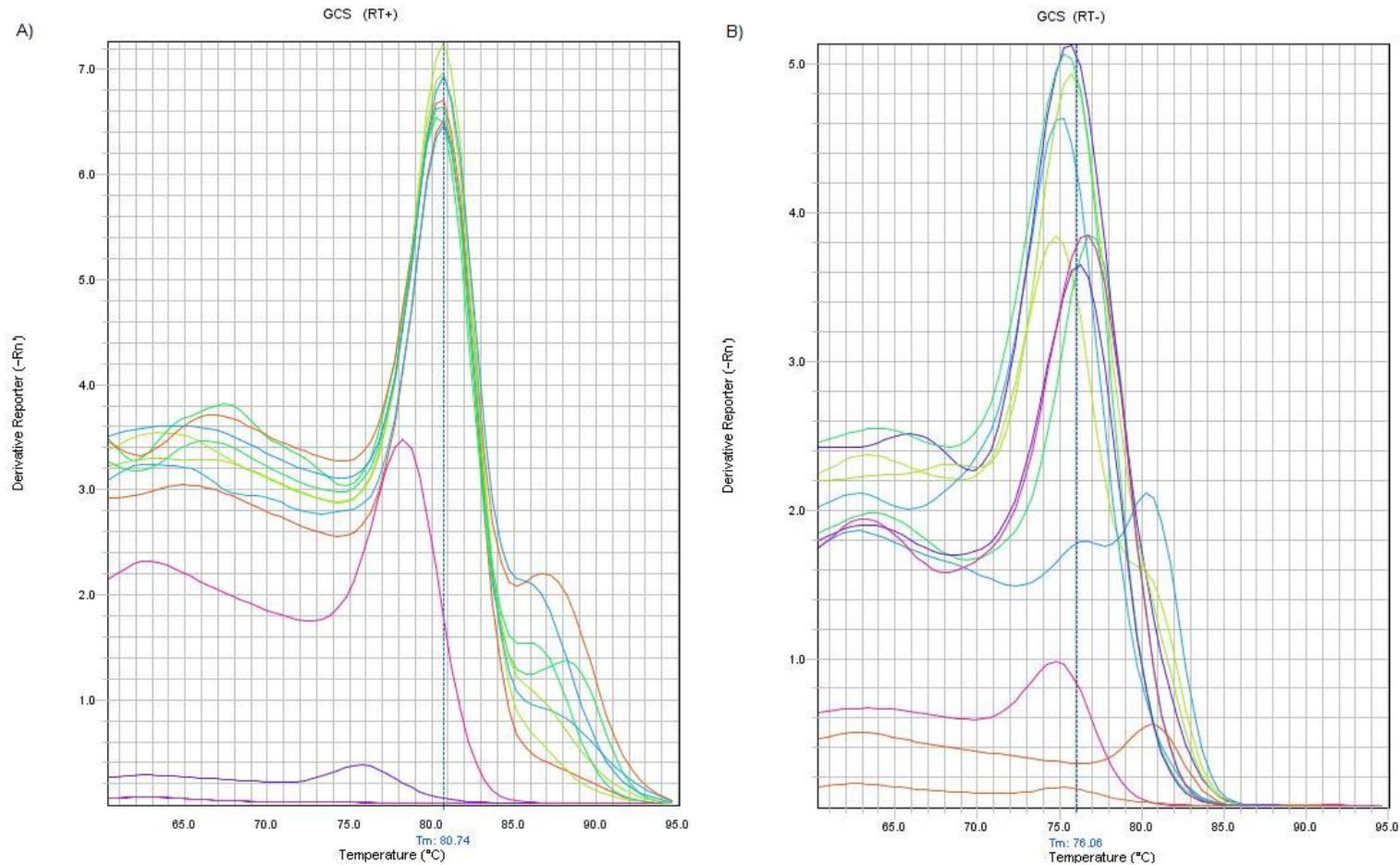
Young JC, Agashe VR, Siegers K, Hartl FU. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781–791, 2004.

Zhang DX, Gutterman DD. Mitochondrial reactive oxygen species mediated signaling in endothelial cells. *Heart and Circulatory Physiology: American Journal of Physiology* 292: H2023–2031, 2007.

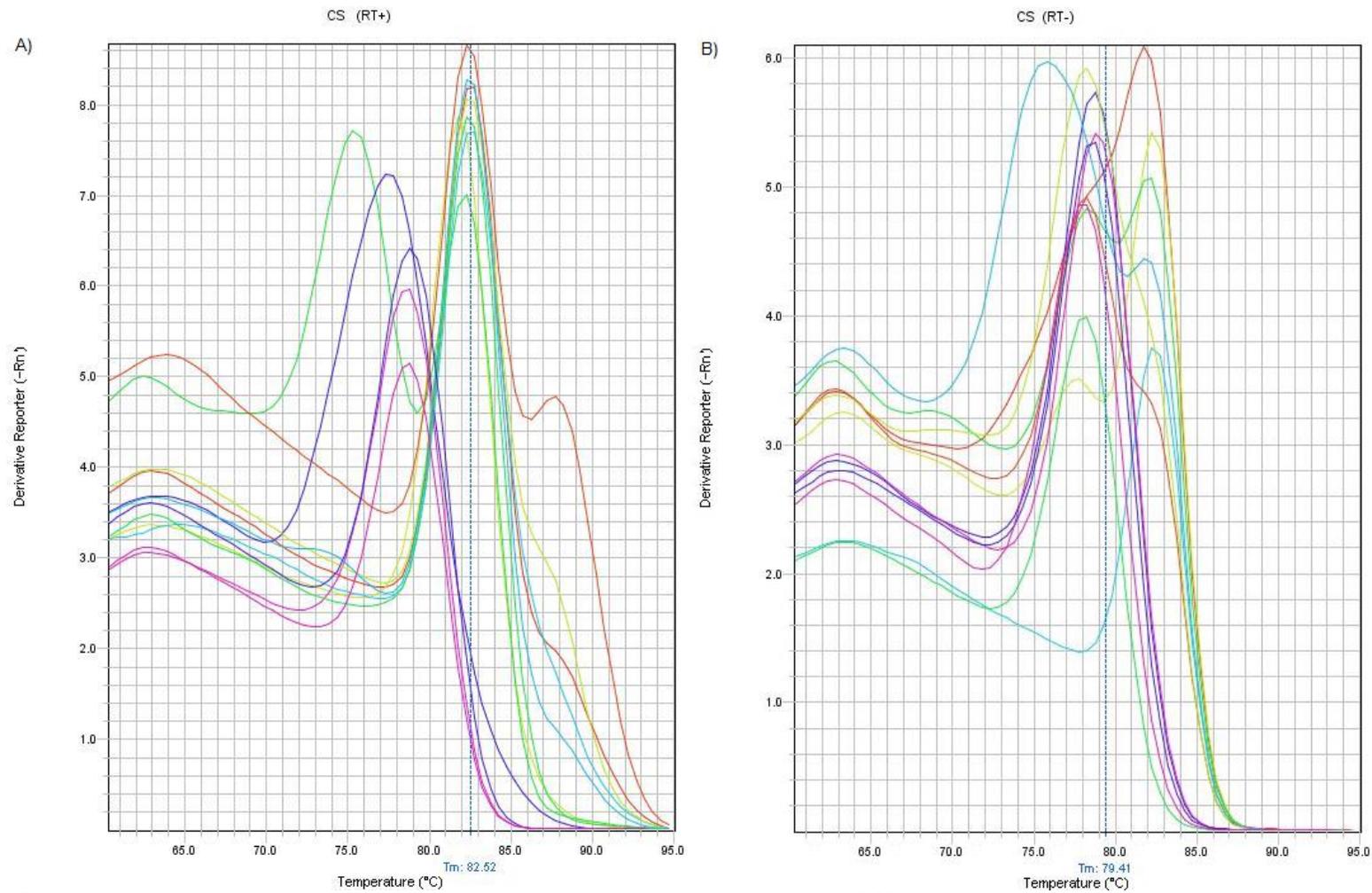
Zijlstra EE. PKDL and other dermal lesions in HIV co-infected patients with Leishmaniasis: review of clinical presentation in relation to immune responses. *PLoS Negl Trop Dis*. 20;8(11): e3258, 2014.

Zilberstein D, Dwyer DM. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem J*. 15;256(1):13-21, 1988.

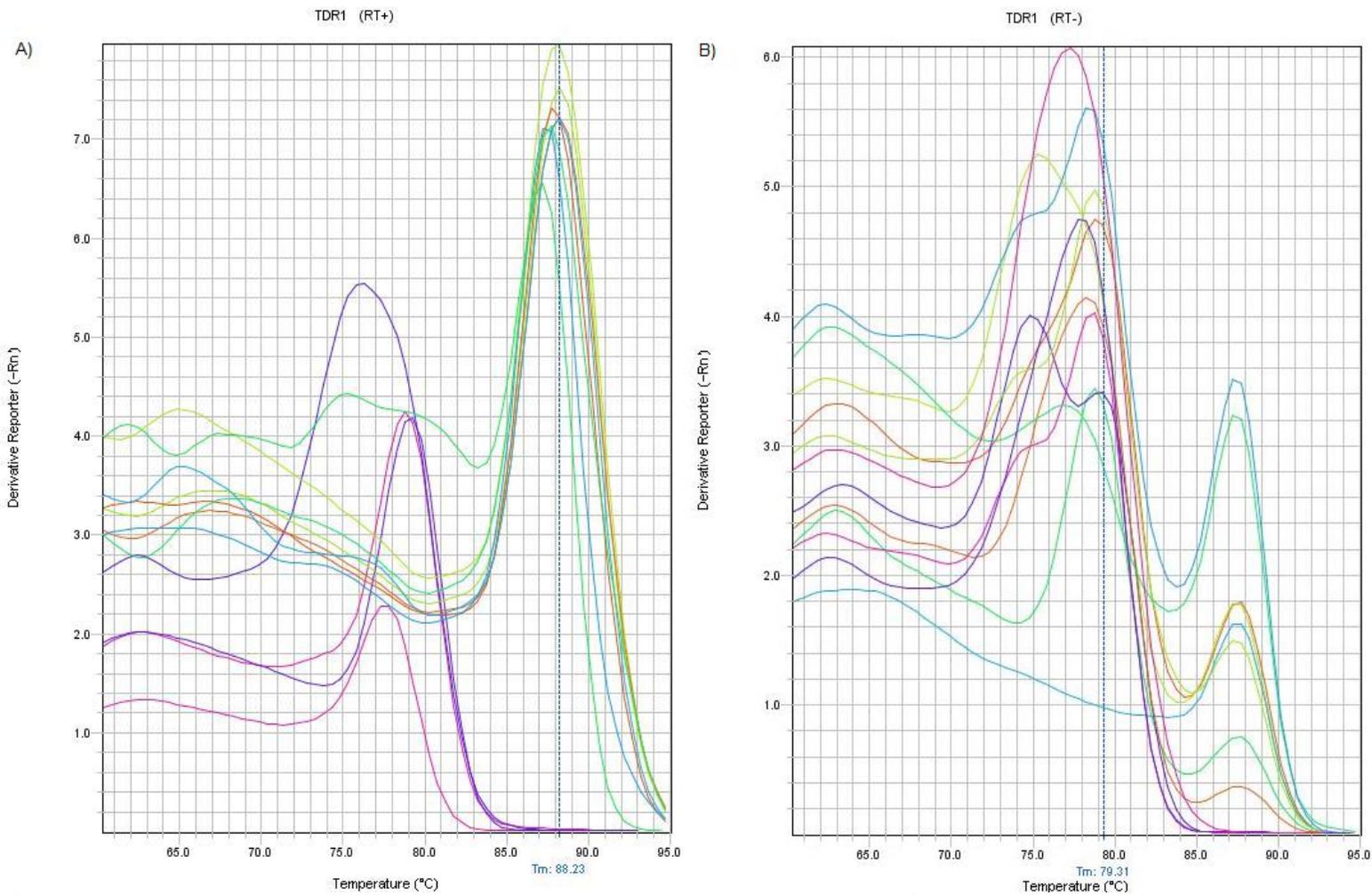
## 8. Apêndices



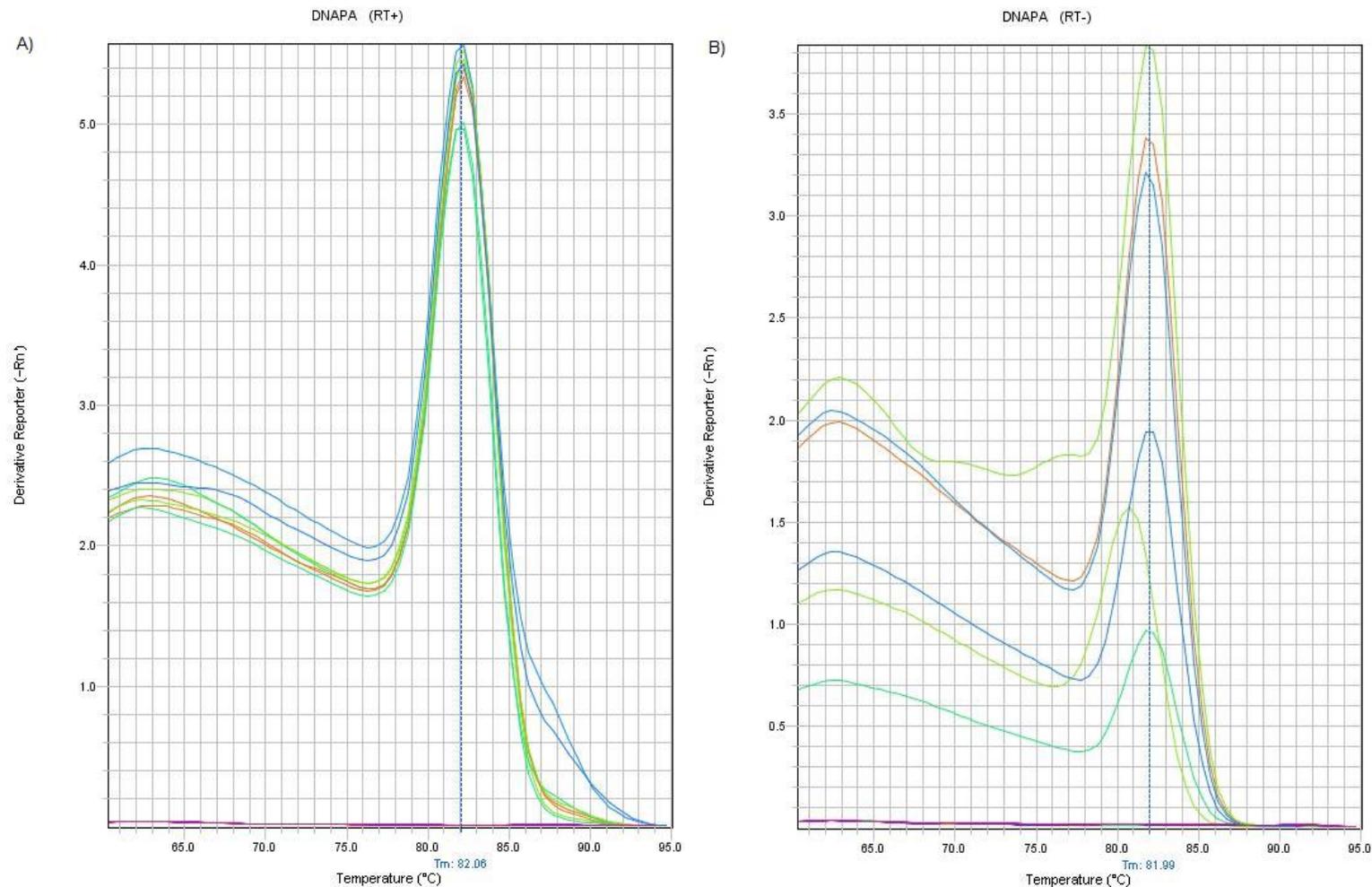
**Apêndice 1.** Curva de dissociação para o gene GCS de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



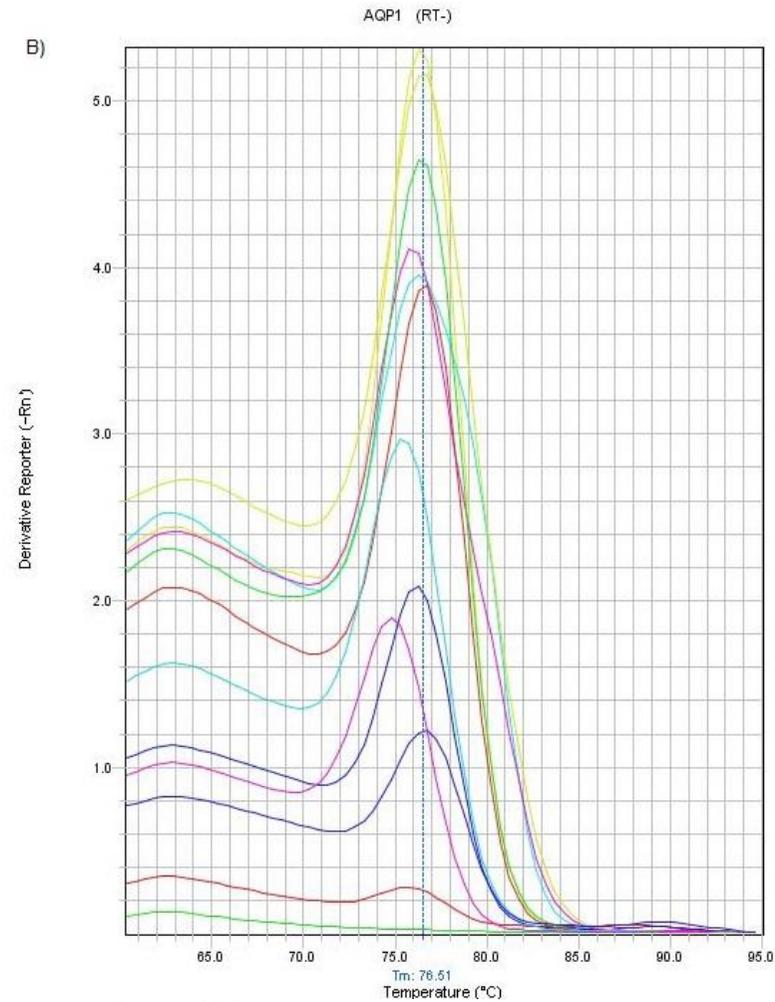
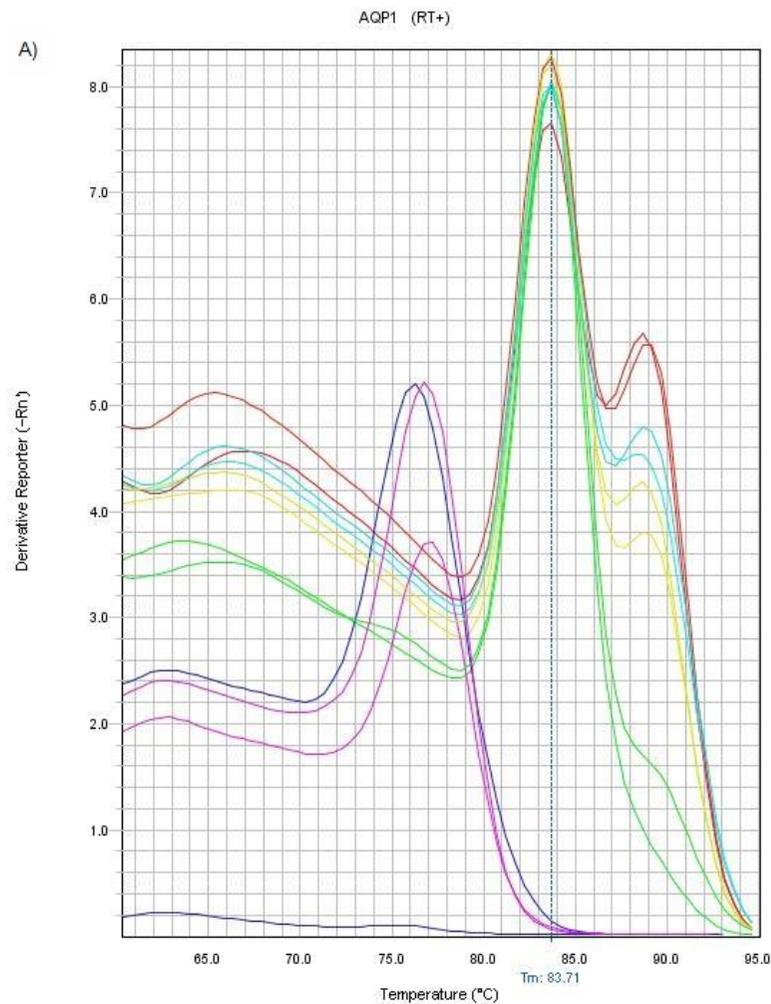
**Apêndice 2.** Curva de dissociação para o gene CS de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



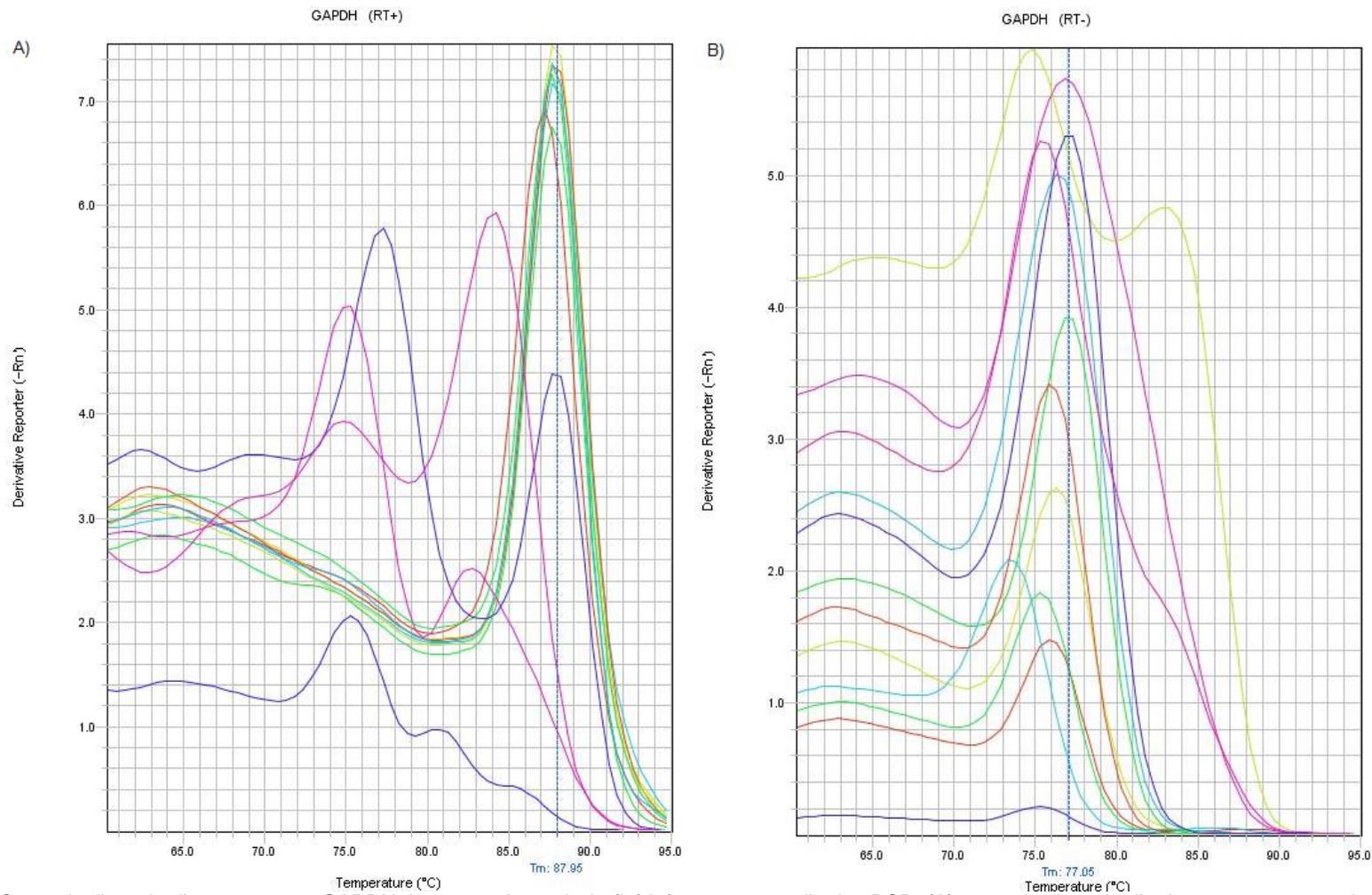
**Apêndice 3.** Curva de dissociação para o gene TDR1 de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



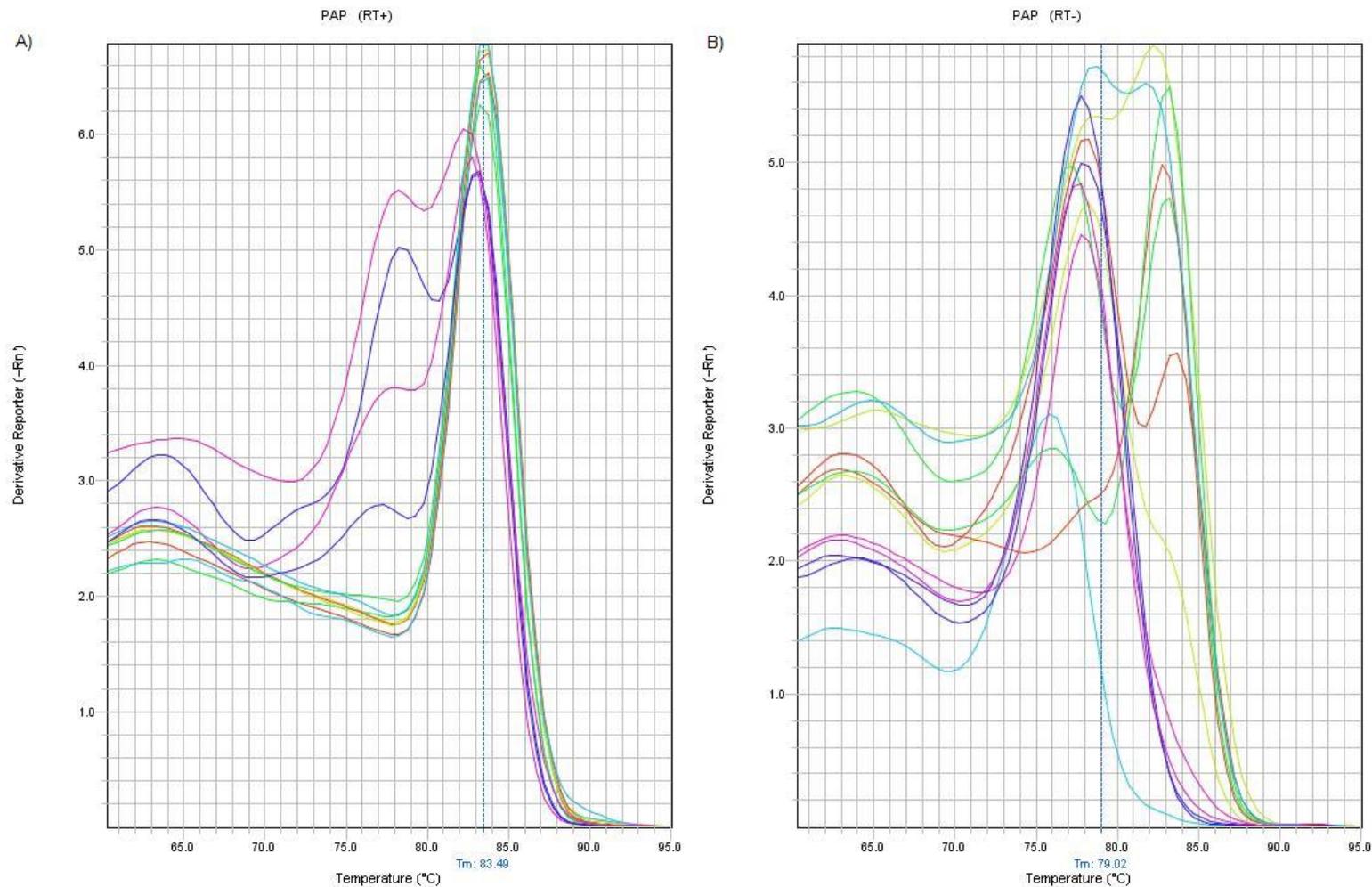
**Apêndice 4.** Curva de dissociação para o gene DNAPA de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



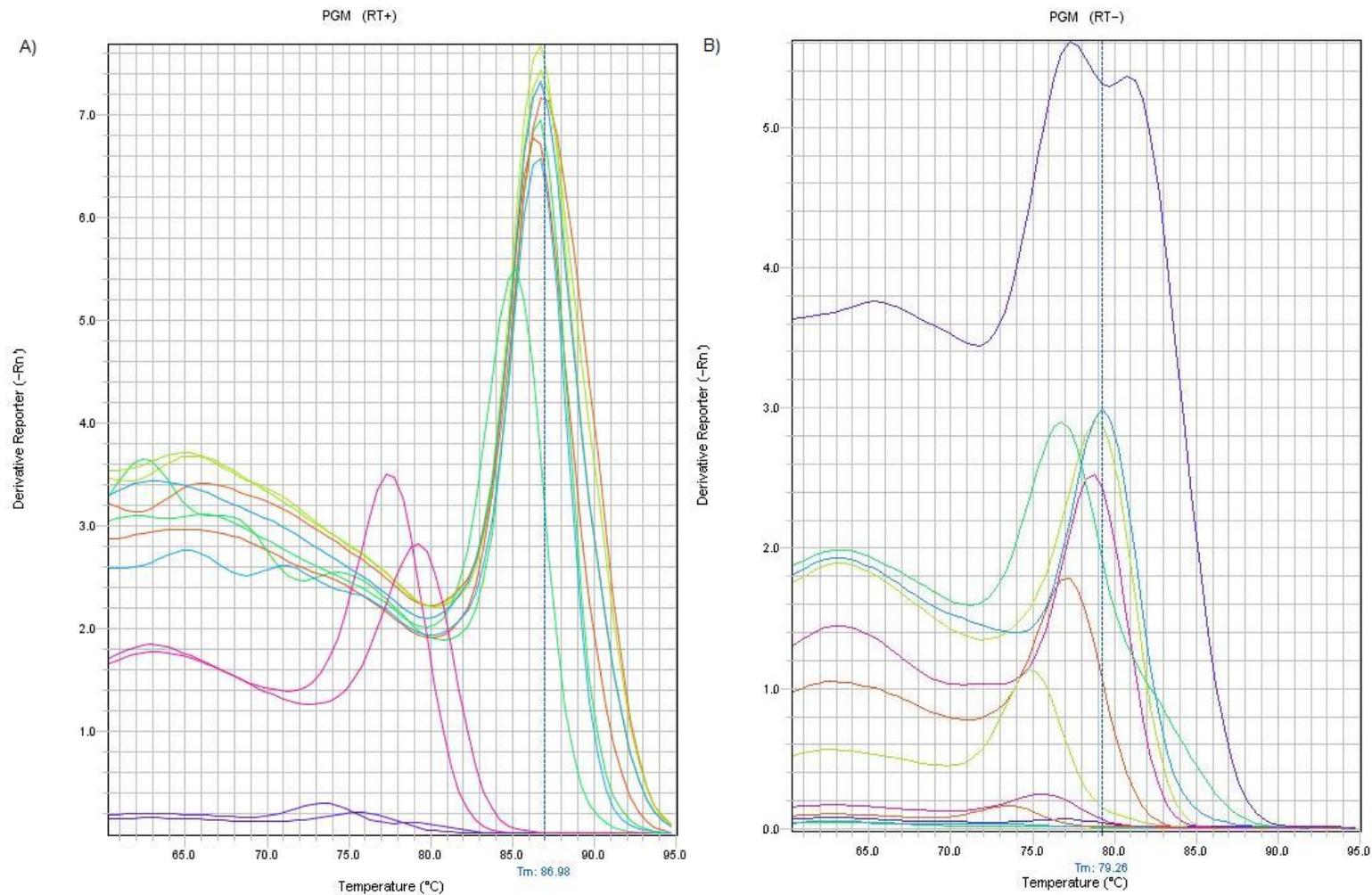
**Apêndice 5.** Curva de dissociação para o gene AQP1 de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



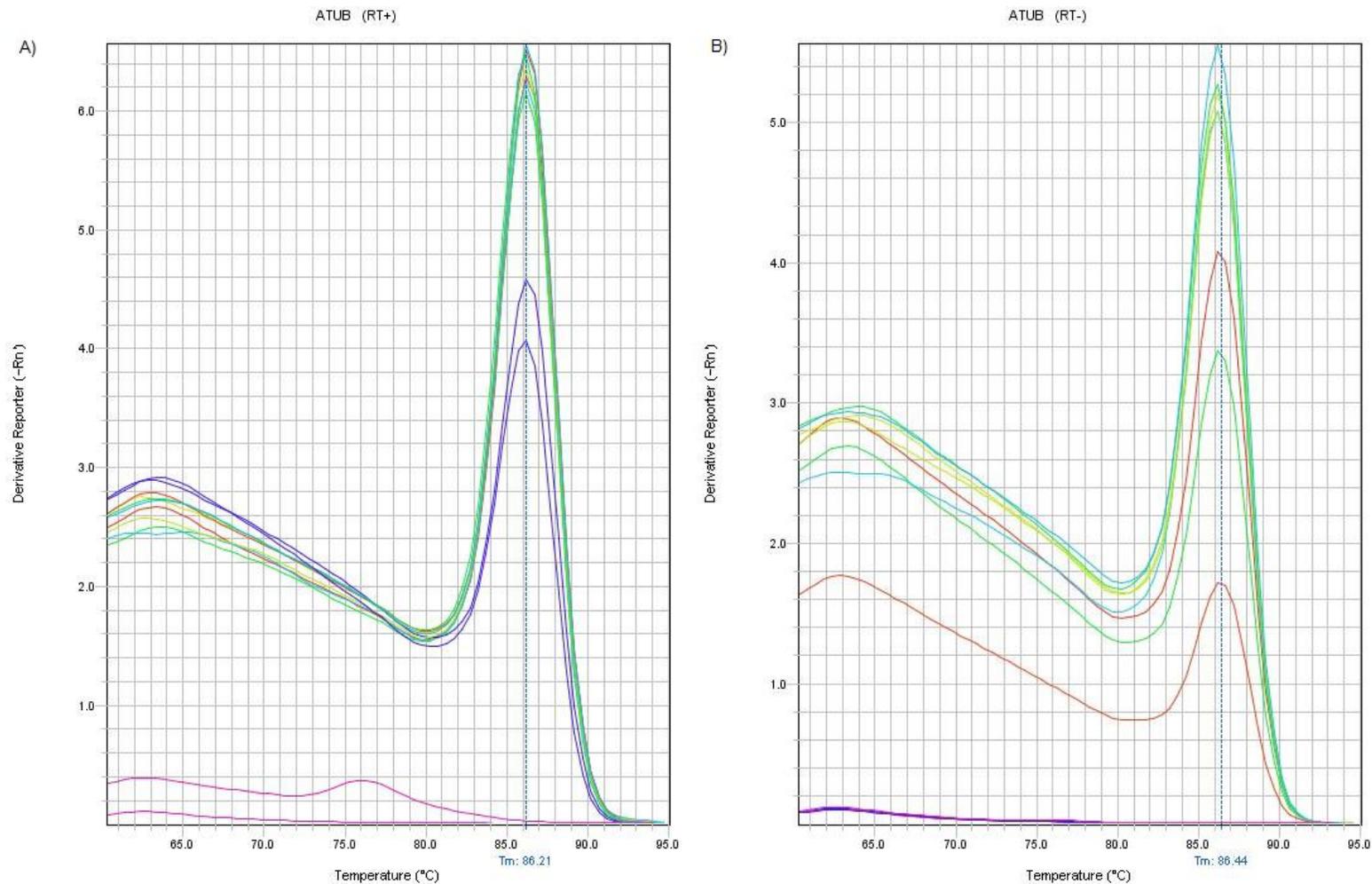
**Apêndice 6.** Curva de dissociação para o gene GAPDH de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



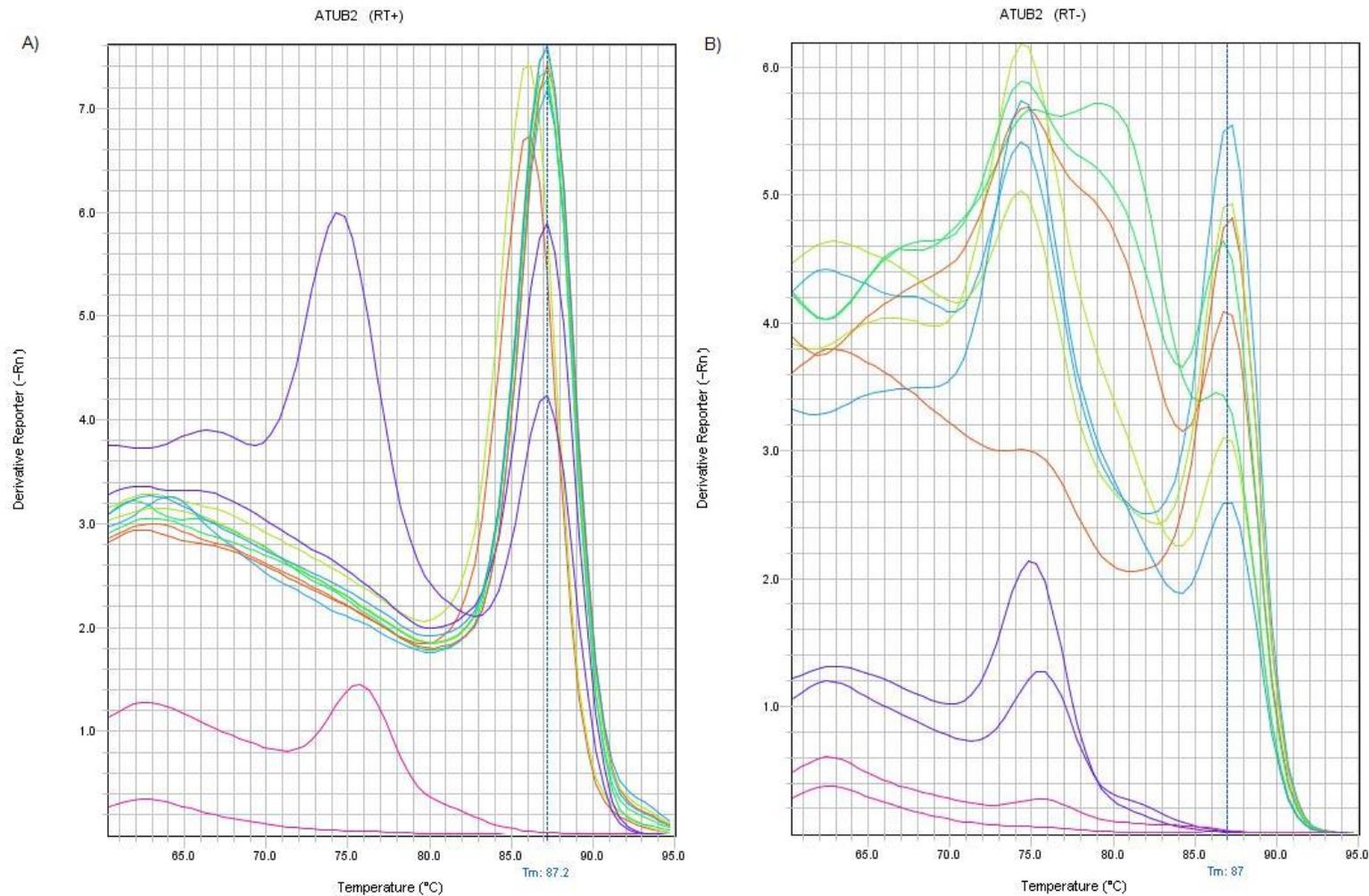
**Apêndice 7.** Curva de dissociação para o gene PAP de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



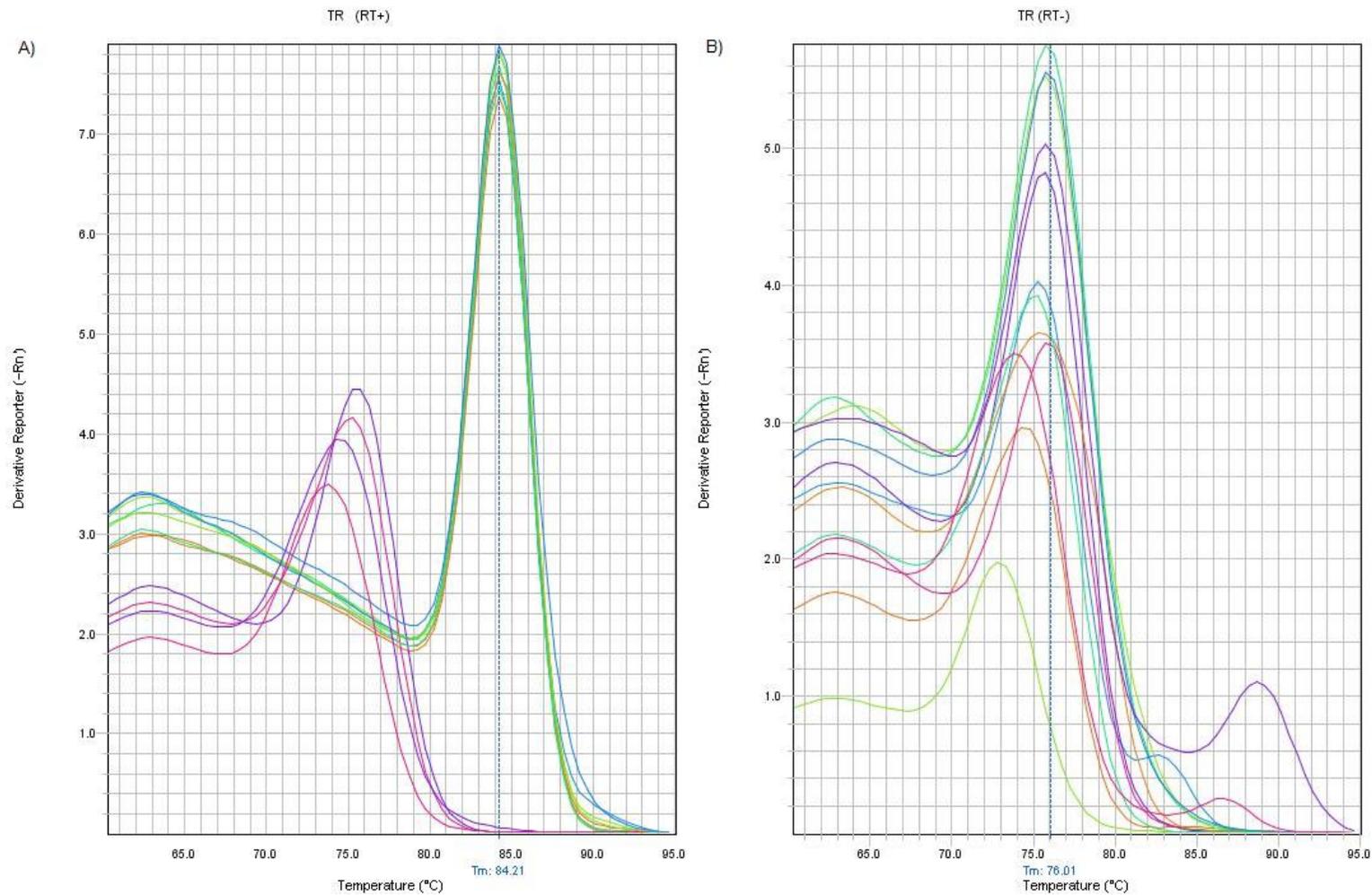
**Apêndice 8.** Curva de dissociação para o gene PGM de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



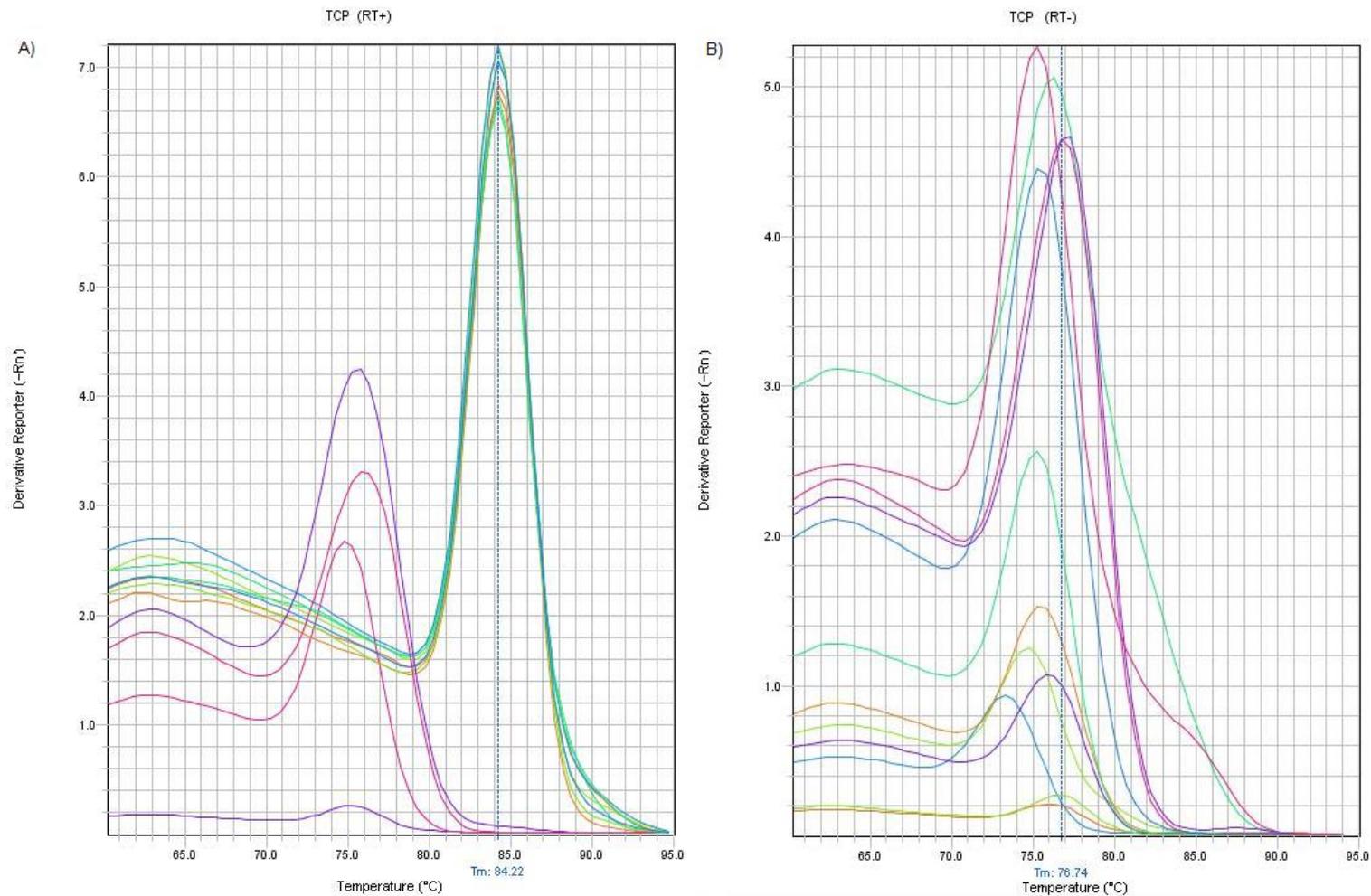
**Apêndice 9.** Curva de dissociação para o gene ATUB de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



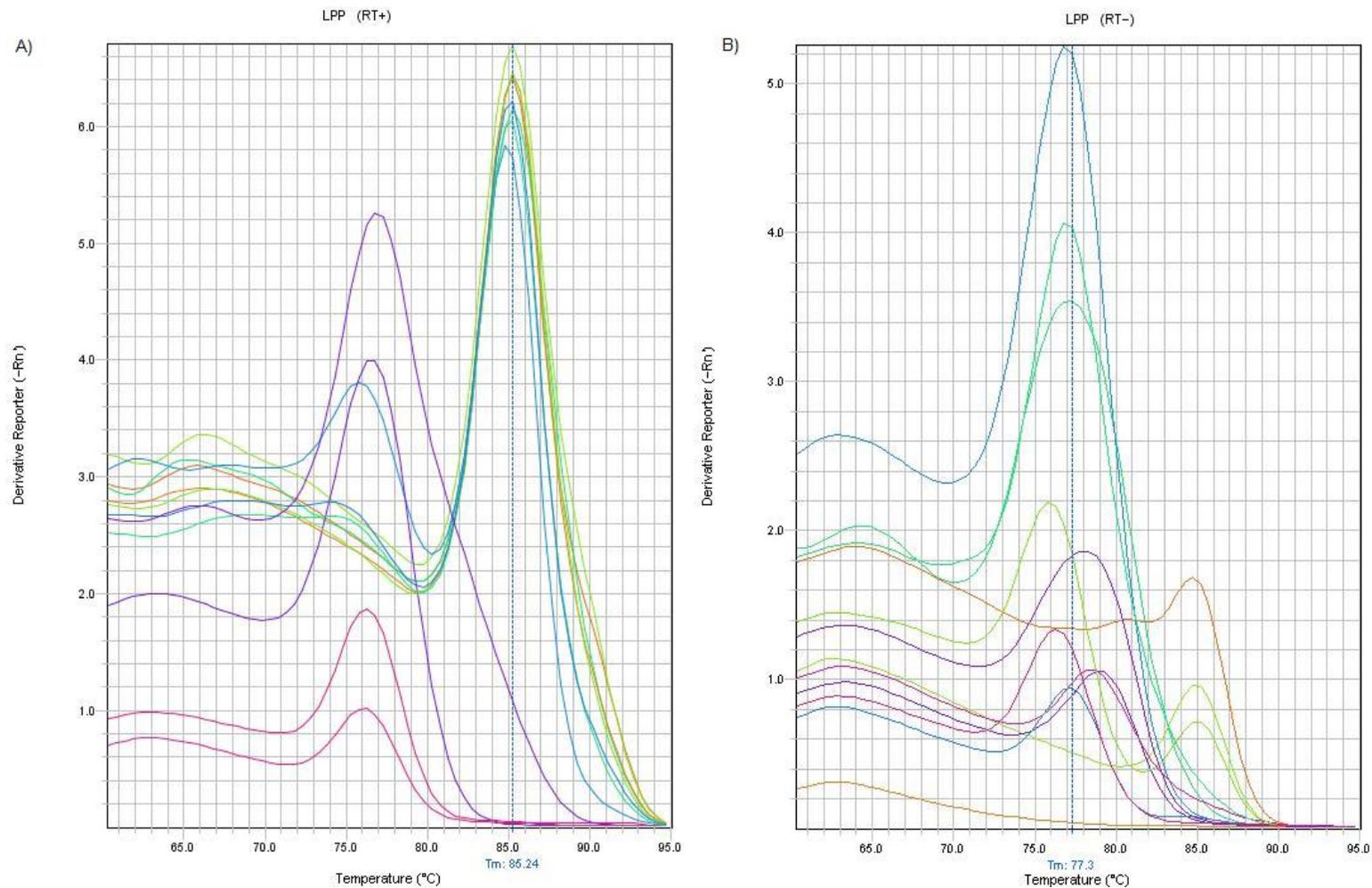
**Apêndice 10.** Curva de dissociação para o gene ATUB2 de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



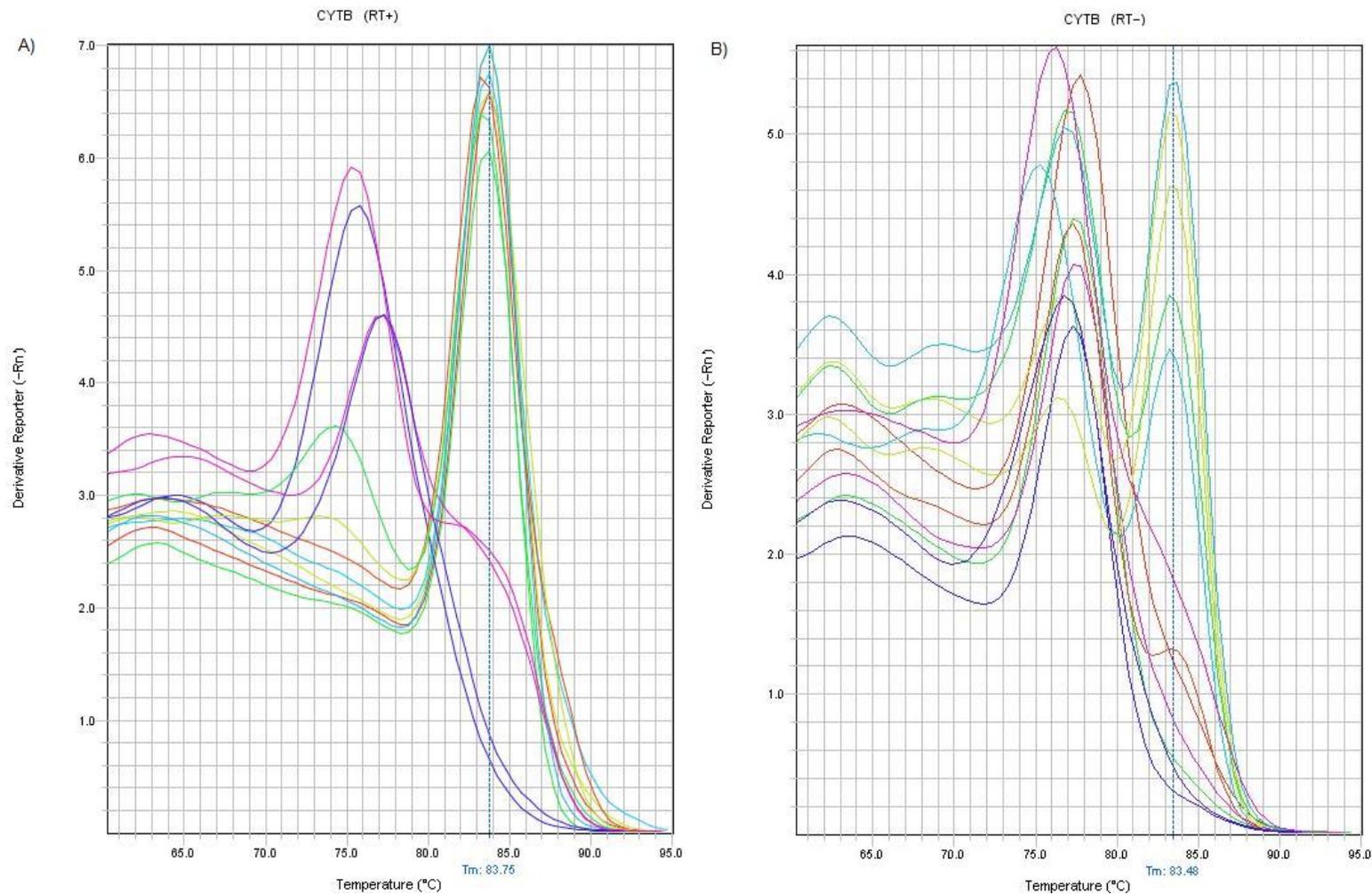
**Apêndice 11.** Curva de dissociação para o gene TR de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



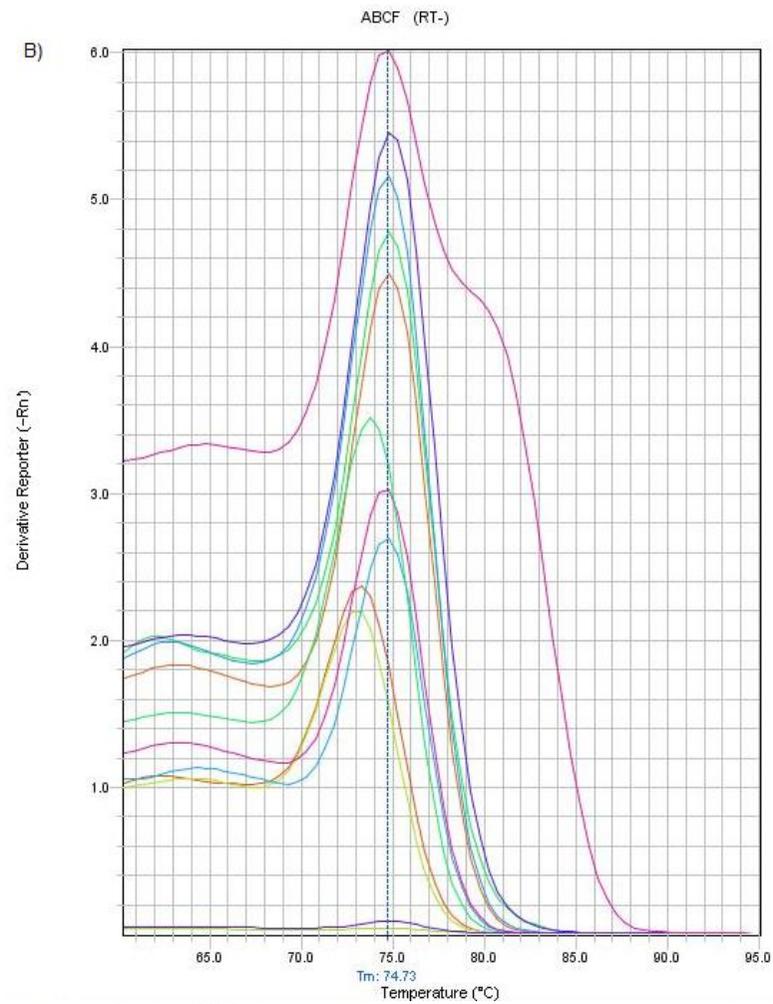
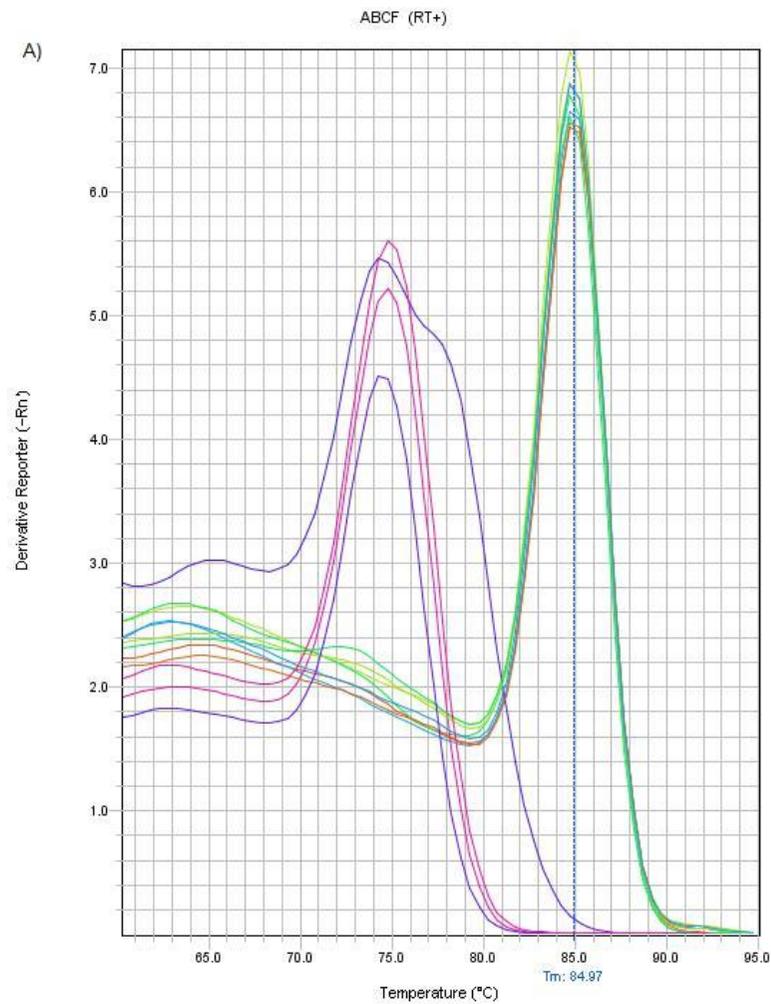
**Apêndice 12.** Curva de dissociação para o gene TCP de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



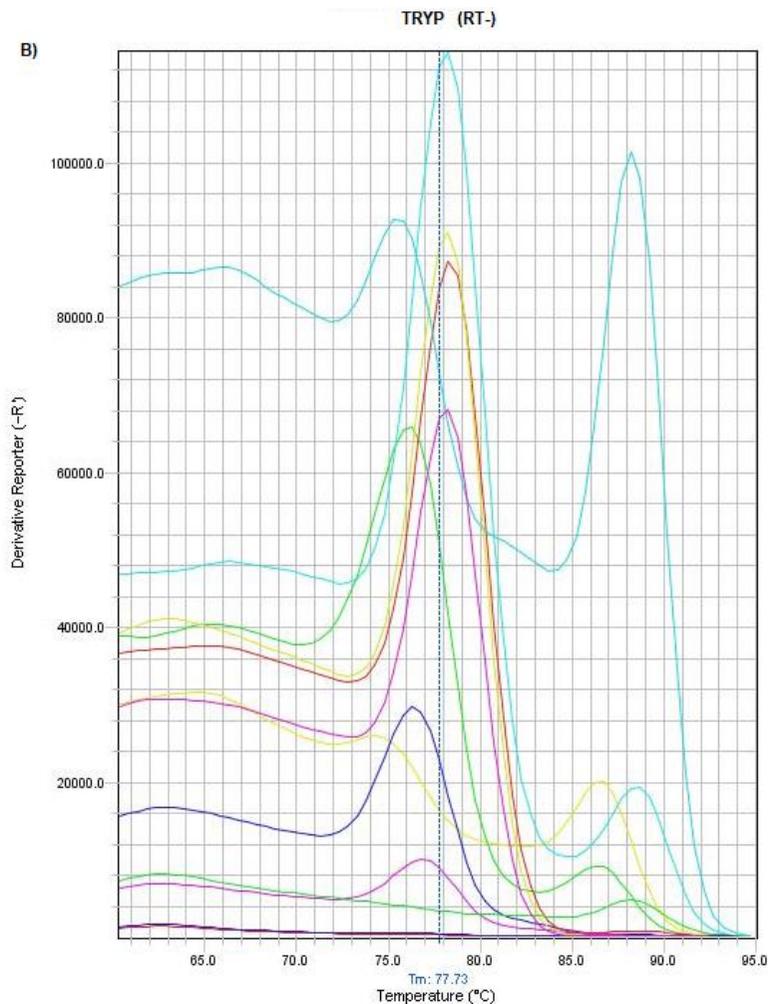
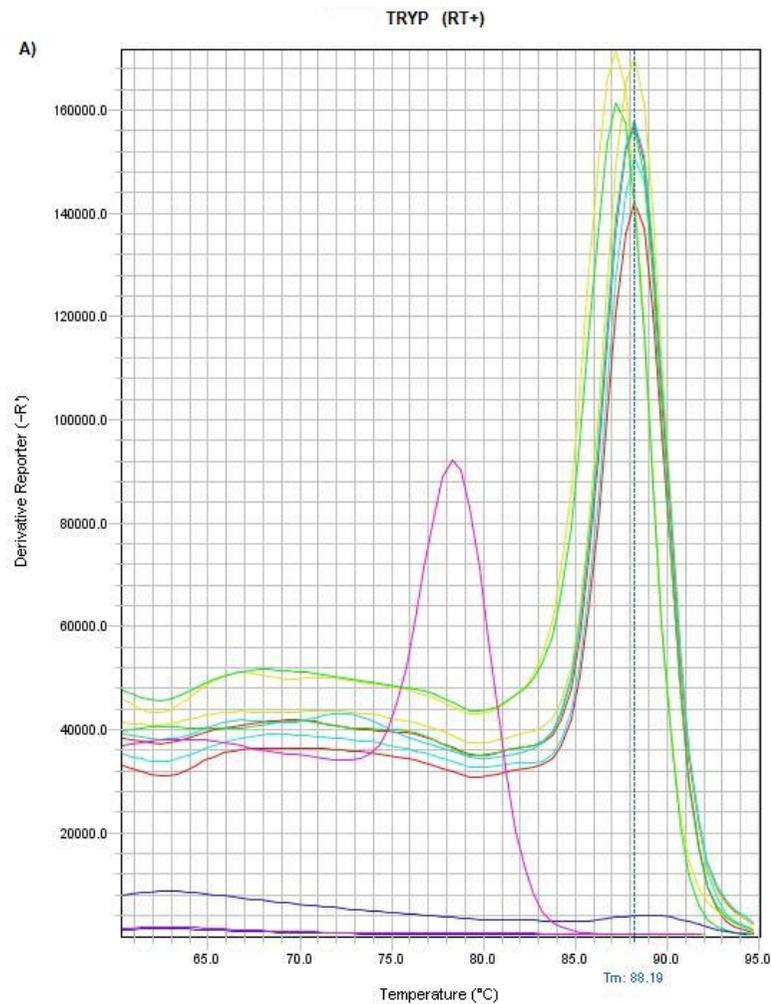
**Apêndice 13.** Curva de dissociação para o gene LPP de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



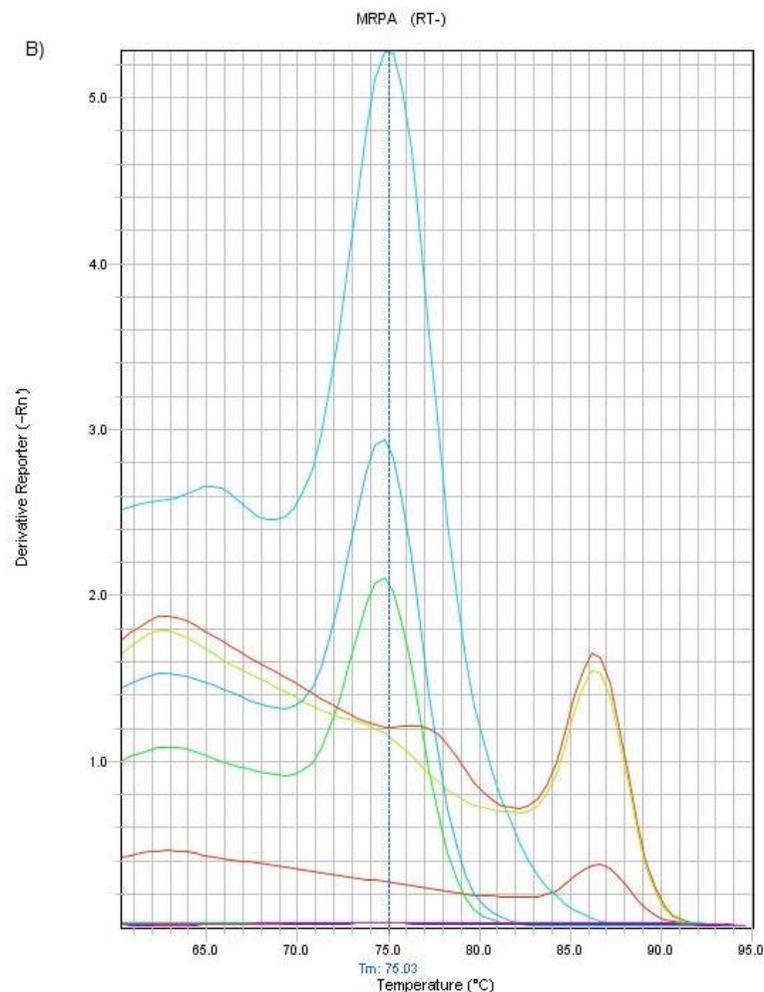
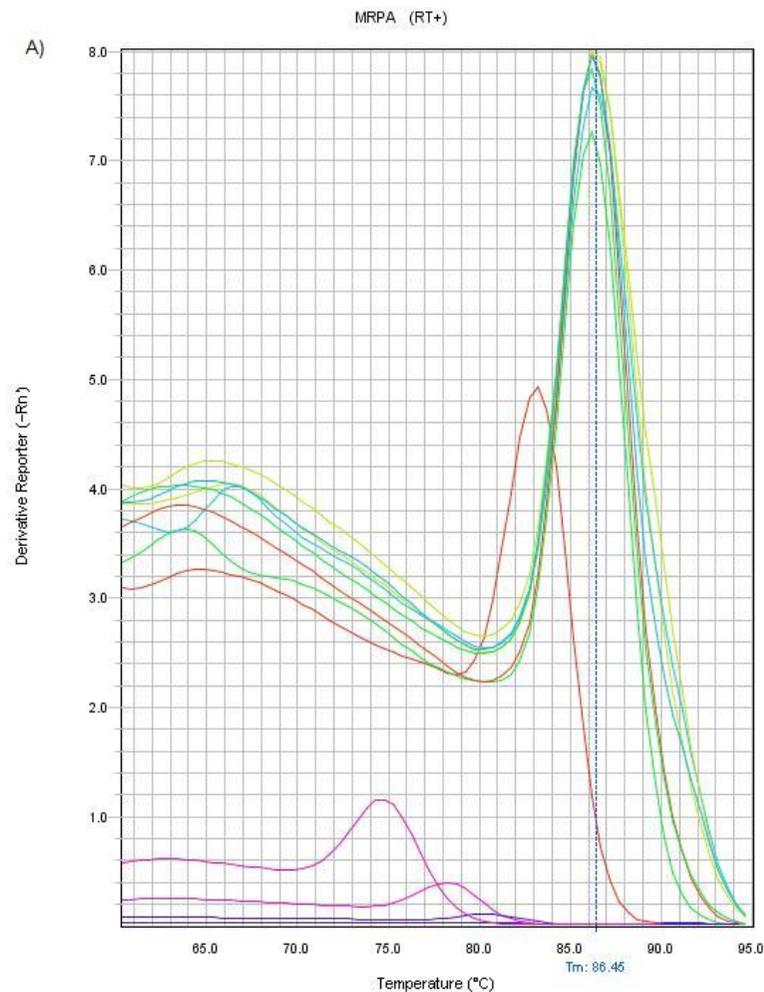
**Apêndice 14.** Curva de dissociação para o gene CYTB de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



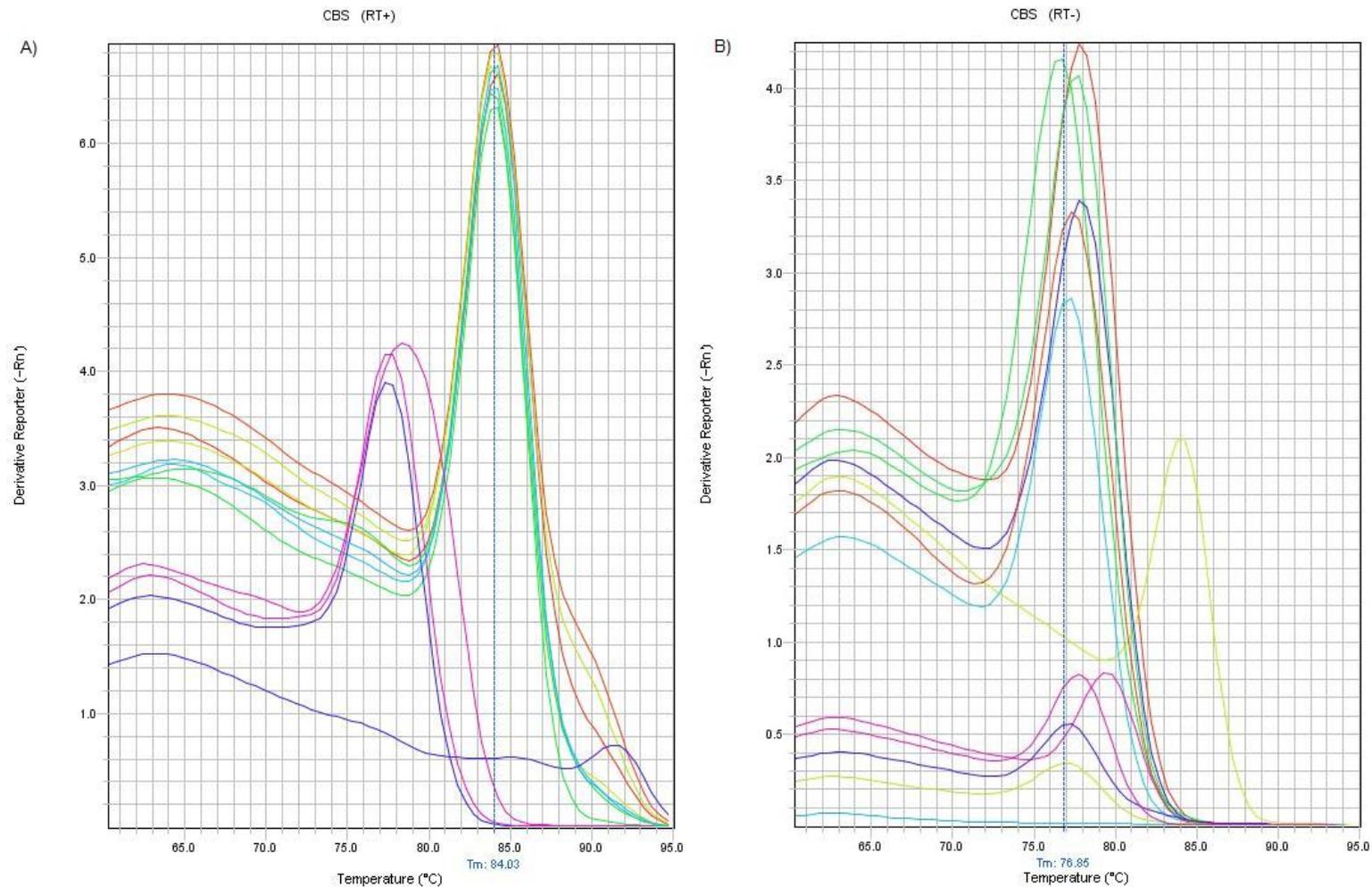
**Apêndice 15.** Curva de dissociação para o gene ABCF de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



**Apêndice 16.** Curva de dissociação para o gene TRYP de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



**Apêndice 17.** Curva de dissociação para o gene MRAPA de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.



**Apêndice 18.** Curva de dissociação para o gene CBS de promastigota de *L. (L.) infantum* na reação da qPCR. (A) curva de dissociação das amostras controle e teste utilizando a enzima transcriptase reversa (RT+) (B) curva de dissociação das amostras controle e teste sem a enzima transcriptase reversa (RT-). Linha vermelha: *L. (L.) infantum* tratada com CNZ; Linha amarela: *L. (L.) infantum* tratada com CPH; Linha verde: *L. (L.) infantum* tratada com MCZ; Linha azul clara: amostra calibradora; azul escuro: controle Branco e Linha rosa: controle NTC.

## 9. Anexo



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
CEUA-IAL



### ANEXO E

São Paulo, 22 de dezembro de 2014.

Parecer Projeto 08/2014 – CEUA-IAL

Venho pela presente informar que o projeto de pesquisa intitulado “**Identificação de marcadores moleculares e celulares de resposta terapêutica de fármacos com atividade antileishmania**”, sob coordenação da **Dra. Samanta Etel Treiger Borborema**, Pesquisadora Científica do Laboratório de Toxinologia Aplicada à Fármacos Antiparasitários do Centro de Parasitologia e Micologia do Instituto Adolfo Lutz - Central, foi considerado **APROVADO**, e poderá ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O presente projeto utilizará no total 720 animais, sendo 360 Camundongos isogênicos da linhagem Balb/c FÊMEAS (20-25 g) e 360 hamsters (sírio dourado recém desmamados) MACHOS.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios **ANUAIS** à CEUA-IAL, no intuito de acompanharmos os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e sanitários e permitindo também a elaboração de relatórios anuais que são realizados por esta CEUA-IAL e que são encaminhados ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), conforme a Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,

Raquel dos Anjos/Fazoli  
Coordenadora da CEUA-IAL

RAF/raf

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, n° 355  
11° Andar – Salas 1102 – Cerqueira César  
São Paulo – SP – CEP: 01246-902  
Tel: (11) 3068-2887 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br

**Anexo 1.** Parecer de aprovação da Coodenadoria da Comissão Ética no Uso de Animais – Instituto Adolfo Lutz (CEUA-IAL) no projeto 08/2014: Identificação de marcadores moleculares e celulares de resposta terapêutica de fármacos com atividade antileishmania.