

MAIKO LUIS TONINI

**DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE COLORIMÉTRICO
PARA TRIAGEM DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE
COMPOSTOS UTILIZANDO *Leishmania amazonensis*
EXPRESSANDO A ENZIMA BETA-GALACTOSIDASE.**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau
de mestre em Biotecnologia e
Biociências.

Orientador: Mario Steindel

Florianópolis

2013

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Tonini, Maiko Luis

Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade leishmanicida de compostos utilizando *Leishmania amazonensis* expressando a enzima beta-galactosidase. / Maiko Luis Tonini ; orientador, Mario Steindel - Florianópolis, SC, 2013.

121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Leishmaniose. 3. Beta-galactosidase. 4. Quimioterapia. 5. Método. I. Steindel, Mario. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III. Título.

Este trabalho é dedicado àqueles que
aguardam o alívio para sua dor.

AGRADECIMENTOS

No caminho que percorri para a conclusão desta etapa aprendi muitas coisas, mas talvez a mais valiosa delas seja que a máxima: “sozinhos não somos nada” é totalmente verdadeira. A presença e ajuda de muitos fez dessa jornada muito mais produtiva e alegre! Então, deixo a estes que de alguma forma contribuíram para esta realização, os meus sinceros agradecimentos:

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

Ao Prof. Mario Steindel, meu orientador, que é exemplo dos mais altos padrões pessoais e profissionais nos quais posso me espelhar. Aos Professores Álvaro J. Romanha e Edmundo C. Grisard pelas dicas, considerações e idéias para soluções naqueles momentos em que tudo parecia dar errado. À Dra. Iriane Eger, pela leitura crítica do projeto inicial.

A Dra. Patrícia Hermes Stoco, que ajudou na transfecção dos parasitos. Aos Doutorandos Jair e a Ibeth que me apresentaram as células THP-1.

Ao Professor Ricardo Nunes e ao Laboratório de Síntese e Atividade da UFSC, pela ajuda com a seleção dos análogos do ácido gálico e fornecimento dos ésteres para teste. Ao doutorando Paulo Feuser, do Laboratório de Controle de Processos da UFSC, que produziu as nanocápsulas de galatos. À professora Leonor Leon da Fundação Oswaldo Cruz, que cedeu a cepa LTB0016 de *L. amazonensis*.

Um obrigado especial ao amigo Gustavo Campagnaro, grande companhia para finais de semana e feriados no laboratório e ótimo auxiliar para infecções de células e animais, e participação em rodízios de pizza. Para a Me. Celina Yamanaka, que me ensinou com paciência quase todas as técnicas que usei nesse trabalho e a Dra. Milene Moraes, cuja ajuda foi crucial na padronização da metodologia de β -gal. Às ICs Gilmara Lemos e Ana Paula Nascimento pela “mãozinha” com tantas coisas que nem consigo especificar.

A todos os demais colegas e amigos do Laboratório de Protozoologia e do Laboratório de Imunologia e Doenças Infecciosas (LIDI) e dos outros laboratórios do MIP, que conviveram comigo nesses anos, pela amizade, conversas de corredor, caravanas ao RU e papos sobre ciência (e outras coisas). A experiência não teria sido completa sem vocês.

Aos colegas e amigos do Laboratório Santa Luzia, que me apoiaram na opção de “virar” pós-graduando. Á Bibiana, Denis e Vanessa do LAMEB, por sempre acharem aquela brecha de horário para as leituras no TECAN. A Fernanda e Everton do Biotério setorial do MIP, pela disponibilidade e ajuda com os animais.

Aos grandes amigos Jota, Max, Sérgio, Dani, Adri e Rita pela força, apoio e pelas festas. Ao Heron, pessoa especial que surgiu na minha vida e deixou tudo muito mais bonito, fácil e certo.

À minha Mãe, Ivonete, meu Pai Luis Carlos, Vó Rosina, Vô Hermes, minhas irmãs Karen e Michely, Tio Hermes e Tia Rita pelo apoio incondicional e por serem a base sólida sobre a qual eu existo.

Finalmente, agradeço ao ser superior que deu inicio a tudo o que é.

EPÍGRAFE

*“Não é na ciência que está a felicidade, mas na
aquisição da ciência”.*

*Edgar Allan Poe
O Poder das Palavras (1845)*

RESUMO

No presente trabalho transfectamos uma cepa de *Leishmania amazonensis* com um plasmídeo contendo o gene da β -galactosidase, visando estabelecer um ensaio colorimétrico para triagem de compostos ativos contra amastigotas intracelulares de leishmania. A transfecção não alterou o crescimento de promastigotas em cultura, a infectividade de células THP-1 e de camundongos Balb/c. A atividade da enzima foi diretamente proporcional ao número de parasitos. A inibição do crescimento dos parasitos intracelulares pelo fármaco de referência Anfotericina B, determinada tanto pelo método colorimétrico quanto por contagem microscópica dos parasitos, produziu resultados semelhantes, validando o ensaio. O teste colorimétrico também foi aplicado com sucesso para avaliar a atividade de uma classe de moléculas análogas e derivadas do ácido gálico. O estudo da correlação estrutura atividade mostrou que estas moléculas possuem uma atividade leishmanicida pouco seletiva. Algumas melhorias como a transfecção integrativa e estável, bem como padronização deste método com outras espécies de *Leishmania* ainda são desejáveis. Contudo, o ensaio com *L. amazonensis* expressando β -galactosidase foi robusto, sensível, reprodutível e rápido na avaliação da atividade leishmanicida de compostos.

Palavras chave: Leishmaniose. *Leishmania amazonensis*. Beta-galactosidase. Quimioterapia. Colorimétrico.

ABSTRACT

In the present work we transfected a strain of *Leishmania amazonensis* with a plasmid containing the gene of the β -galactosidase enzyme, aiming the standardization of a colorimetric assay for screening of compounds active against intracellular amastigotes of leishmania. Transfection did not alter promastigote growth in culture and infectivity on THP-1 cells and Balb/c mice. The activity of the enzyme was directly proportional to the number of parasites. Inhibition of intracellular parasite growth by the reference drug Amphotericin B, assessed either by both colorimetric and microscopic counting methods yielded similar results, thus validating the assay. The colorimetric method was also successfully applied to assess the activity of a class of analogues and derivatives of the gallic acid. A structure-activity relationship study, showed that such molecules possess leishmanicidal activity, but with low selectivity. Despite the fact that future improvements to the method are desirable, such as integrative and stable transfection, as well as the standardization of this method with other species of *Leishmania*, the assay with *L. amazonensis* expressing β -galactosidase was robust, sensitive, reproducible and fast for evaluation of the antileishmanial activity of compounds.

Key words: Leishmaniasis. *Leishmania amazonensis*. Beta-galactosidase. Chemotherapy. Colorimetric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	34
Figura 2 – Resposta Th1 e Th2 na infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	35
Figura 3 – Manifestações clínicas das leishmanioses	37
Figura 4 – Antimoniais Pentavalentes	40
Figura 5 – Anfotericina B e Miltefosina	42
Figura 6 - Biosíntese do ergosterol em <i>Leishmania</i> spp.	45
Figura 7 – Clivagem da CPRG pela β -galactosidase	50
Figura 8 – O ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila	51
Figura 9 – O ensaio colorimétrico para teste de compostos.....	62
Figura 10 – Os compostos testados.....	64
Figura 11 – Os ensaios de atividade antiparasitária e os critérios de progressão para os compostos ativos	66
Figura 12 – Expressão da β -galactosidase em promastigotas	69
Figura 13 – Relação entre a atividade enzimática e o número de parasitos	71
Figura 14 - Curvas de crescimento da cepa selvagem e dos clones transfectados	73
Figura 15 – Infectividade dos parasitos sobre células THP-1	74
Figura 16 – Edema de pata em camundongos infectados com <i>L. amazonensis</i>	74
Figura 17 - Atividade da enzima β -gal em clones de <i>L. amazonensis</i> transfectados e mantidos na ausência de G418.....	76
Figura 18 – Atividade da β -gal no clone C12D9 após passagem em células e em camundongos.....	77

Figura 19 – Atividade da β -gal em células THP-1, RAW 264.7 e J774.G8 não infectadas	79
Figura 20 – Curvas concentração resposta da Anfotericina B.....	82
Figura 21 –Distribuição da densidade óptica média dos controles	84
Figura 22 – Atividade leishmanicida do ácido gálico, seus análogos e derivados ésteres sobre amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> pelo método colorimétrico	86
Figura 23 - Fotomicrografias representativas do efeito de G12 sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> em células THP-1	88
Figura 24 - Relação do comprimento da cadeia n-alquílica e cLogP com a atividade leishmanicida dos ésteres do ácido gálico.....	90
Figura 25 – Efeito leishmanicida e citotóxico dos compostos G8 e G12 livres e nanoencapsulados	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição geográfica das espécies de leishmanias patogênicas e patologia associada.....	36
Tabela 2 – Métodos de Triagem de Compostos ativos contra <i>Leishmania</i> spp.....	48
Tabela 3 – Coeficientes de variação da CI_{50} de Anfotericina B sobre amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> spp. em diversos métodos de avaliação da atividade de compostos.	83
Tabela 4 – Atividade dos GA sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> expressando β -gal (método colorimétrico) e citotoxicidade dos compostos sobre células THP-1.....	87
Tabela 5 – Atividade dos GA contra amastigotas de <i>L. amazonensis</i> da cepa selvagem, determinados por contagem em microscópio óptico. ..	87
Tabela 6 – Atividade Leishmanicida (CI_{50}), Citotóxica (CC_{50}) e Índices de Seletividade (IS) dos compostos G8 e G12 nanoencapsulados.....	94

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Percentual de inibição do crescimento.	61
Equação 2 – Percentual de redução do índice parasitário.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	Adenosina monofosfato
ANFO	Anfotericina B
ANOVA	Análise de variância
APC	Célula apresentadora de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
CC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% dos parasitos
cLogP	Coefficiente de partição octanol-água calculado
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo
CV	Coefficiente de variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EAG	Ésteres de alquila do ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G0	Ácido gálico
G8	Galato de octila
G10	Galato de decila
G11	Galato de undecila
G12	Galato de dodecila
G14	Galato de tetradecila
GA	Galatos de alquila
GFP	Proteína verde fluorescente
GMP	Guanosina monofosfato
GPI	Fosfatidil glicosilinositol
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)1-piperazinil]-etanossulfônico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HTS	<i>Hight throughput screening</i>
IFN-γ	Interferon gama
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4

IP	Índice Parasitário
IS	Índice de seletividade
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
J774.G8	Linhagem celular hematopoiética derivada de retículo-sarcoma murino
LacZ	Gene da β -galactosidase
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCP	Laboratório de controle de processos
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LUC	Gene da luciferase
LV	Leishmaniose visceral
MAP	<i>Mitogen Activated Protein</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NIAID	<i>National institute of allergy and infectious diseases</i>
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Tampão Salino Fosfato
PI	Percentual de inibição
PIR	Pirogalol
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
p-NPP	p-nitrofenilfosfato
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murinos derivados de leucemia monocítica
ResNetNPD	<i>Research Initiative on Natural Products against Neglected Diseases</i>
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i> 1650
SBF	Soro bovino fetal
SbIII	Antimonial trivalente
SbV	Antimonial pentavalente
TCR	Receptor de células T
TcTR	Tripanotona redutase recombinante de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TDR	<i>Special programme for research and training in tropical diseases</i>
Th1	Linfócito T <i>helper</i> 1

Th2	Linfócito T <i>helper</i> 2
THP-1	Linhagem de células humanas de leucemia monocítica aguda
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Tripanotona redutase
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v/v	Volume/volume
WHO	Organização Mundial da Saúde
β -gal	Beta galactosidase

LISTA DE SÍMBOLOS

CO ₂	Dióxido de Carbono
Da	Dalton
g	Gramas
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
mV	Milivolt
pH	Potencial hidrogeniônico
nM	Nanomolar
nm	Nanômetro
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar

SUMARIO

INTRODUÇÃO	28
1 REVISÃO DE LITERATURA	32
1.1 LEISHMANIOSES.....	32
1.1.1 Histórico.....	32
1.1.2 Biologia do parasito	33
1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas das leishmanioses.....	35
1.1.4 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos.....	38
1.1.5 Tratamento das leishmanioses	40
1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS.....	43
1.2.1 Alvos terapêuticos.....	44
1.2.2 Detecção de novas moléculas líder contra leishmaniose.....	47
1.2.3 Ácido gálico, análogos e ésteres derivados.....	50
2 OBJETIVOS.....	54
2.1 OBJETIVO GERAL.....	54
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	56
3.1 PARASITOS E CÉLULAS.....	56
3.1.1 Cultivo de parasitos.....	56
3.1.2 Transfecção de <i>L. amazonensis</i>	56
3.1.3 Clonagem de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	57
3.1.4 Ensaio de atividade da β -galactosidase em promastigotas.....	58
3.1.5 Cultivo de células.....	58

3.1.6	Indução da diferenciação de células THP-1	59
3.1.7	Preparação dos parasitos para a infecção celular	59
3.1.8	Infecção das células THP-1 com <i>L. amazonensis</i>	59
3.1.9	Isolamento de formas amastigotas intracelulares	60
3.1.10	Ensaio de citotoxicidade.....	60
3.2	INFEÇÃO DE CAMUNDONGOS.....	61
3.3	TRIAGEM DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA INTRACELULAR DE COMPOSTOS.....	62
3.3.1	Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas.....	62
3.3.2	Avaliação da atividade leishmanicida pela contagem em microscópio óptico	63
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO GÁLICO E MOLÉCULAS RELACIONADAS.....	63
3.4.1	Produção de Nanocápsulas Poliméricas Contendo G8 e G12.....	66
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1	DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE PARA DETECÇÃO DE AGENTES ATIVOS CONTRA AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i>	68
4.1.1	Expressão da β -galactosidase e seleção de clones dos parasitos transfectados.....	68
4.1.2	Linearidade da atividade da β -galactosidase	70
4.1.3	A transfecção com o plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10 não alterou parâmetros biológicos da cepa.....	72
4.1.4	Estabilidade da transfecção com o plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10.....	75
4.1.5	As células THP-1 possuem menor background de sinal para o teste de atividade da β -galactosidase	78

4.1.6	Otimização do protocolo usado na triagem de compostos.....	80
4.1.7	Comparação do método colorimétrico com a contagem microscópica utilizando a anfotericina B.....	81
4.1.8	Indicadores da qualidade do teste	83
4.2	APLICAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO GÁLICO E ANÁLOGOS.....	86
4.2.1	Derivados ésteres do ácido gálico possuem atividade leishmanicida.....	86
4.2.2	Análise da relação da estrutura com a atividade leishmanicida.....	89
4.2.3	Efeito leishmanicida de formulações nanoencapsuladas contendo galato de octila e galato de dodecila.....	93
5	CONCLUSÕES.....	98
6	EXPECTATIVAS	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

INTRODUÇÃO

As Leishmanioses constituem um grupo de doenças clinicamente diversas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. transmitidas entre hospedeiros vertebrados através da picada de insetos fêmea de flebotomíneos (mosquito palha). A doença está presente em mais de 98 países ou territórios em áreas tropicais e subtropicais, onde estima-se em 12 milhões o número de pessoas infectadas e em 350 milhões, o número de indivíduos que vivem em áreas com risco de contágio. Contudo, a migração e mobilidade crescente de indivíduos de áreas afetadas, bem como mudanças climáticas globais contribuem para a expansão e urbanização da doença (WHO, 2010).

A maioria das comunidades acometidas pela leishmaniose são economicamente carentes e marginalizadas, o que acarretou um descaso histórico da indústria farmacêutica em buscar opções quimioterápicas para o seu tratamento. Nos anos recentes surgiu um interesse renovado pelas chamadas doenças negligenciadas (malária, tuberculose, diarréias, tripanosomoses, leishmanioses, etc) que causam cerca de 35.000 óbitos diários e elevada morbidade (COHEN; DIBNER; WILSON, 2010). Isto é traduzido na forma de parcerias público-privadas para fomento da pesquisa e inovação nestas áreas (DAVIS; MURRAY; HANDMAN., 2004; NWAKA, *et al.*, 2009; CHATELAIN; IOSET, 2011).

Entretanto, o financiamento não foi suficiente para garantir terapias inovadoras. Conforme um relatório conjunto do *Médecins Sans Frontières* e do *Drugs for Neglected Diseases Initiative*, o ritmo de aprovação de compostos ou novas entidades químicas para tratamento destas doenças na última década foi praticamente o mesmo das duas décadas antecedentes. Há uma lacuna a ser preenchida entre a pesquisa básica em doenças negligenciadas, que vem recebendo mais atenção, e a inovação requerida para trazer benefícios deste novo conhecimento para as populações que dela necessitam na forma de novas e melhores alternativas terapêuticas (TROUILLER, *et al.*, 2002; WILLYARD, 2013)

O tratamento atual das leishmanioses está baseado no uso já centenário dos antimoniais, cuja eficácia é limitada e os efeitos adversos ao paciente são amplos e variados. Alternativas como a anfotericina B e a miltefosina também estão disponíveis, mas cada uma apresenta sérias desvantagens como o alto custo, a forma de administração desfavorável (injetável), a toxicidade ou a possibilidade de indução de resistência. Em face do limitado arsenal terapêutico atual, da complexidade epidemiológica da doença e a ausência de uma vacina eficaz, a busca de

novas moléculas ativas contra a parasitose é imperativa e urgente (DAVIS; MURRAY; HANDMAN., 2004; MURRAY, *et al.*, 2005).

A identificação de moléculas líder é um reconhecido gargalo na geração de fármacos inovadores no combate a doenças negligenciadas (NWAKA, *et al.*, 2009). No tocante as leishmanioses, os esforços para este fim baseiam-se majoritariamente na seleção de compostos capazes de inibir o crescimento/multiplicação do patógeno *in vitro*. A triagem de compostos em larga escala requer testes de fácil execução, reproduzíveis, facilmente quantificáveis e que reflitam as condições encontradas pelo parasito na célula hospedeira (SERENO, *et al.*, 2007).

Embora a forma promastigota do parasito seja de fácil manipulação *in vitro*, a validade dos resultados é limitada em virtude da pouca relevância clínica desta forma em relação aos amastigotas intracelulares no contexto da doença humana. As diferenças bioquímicas entre promastigotas e amastigotas, bem como a ausência do ambiente intracelular natural encontrado *in vivo* pelo parasito são entraves importantes desta abordagem (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006).

Por sua vez, o emprego da forma amastigota de *Leishmania* spp. como modelo para triagem em larga escala é demorado, trabalhoso e caro (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

Desta forma, uma metodologia que viabilize a avaliação de novos compostos focando no estágio de amastigota intracelular de um modo simples, rápido, reproduzível e economicamente viável é uma grande contribuição que abre novas avenidas no campo da triagem e estudo de compostos para a enfermidade.

A introdução de genes repórter foi empregada na busca de agentes ativos contra microrganismos intracelulares como o *Mycobacterium tuberculosis*, *Trypanosoma cruzi* e *Toxoplasma gondii* (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004). Embora diversas espécies de *Leishmania* tenham sido transfectadas com genes repórter, poucos deles, parecem promissores para testes de atividade de compostos. Dentre esses, destacam-se os que são repórteres catalíticos, a exemplo da β -galactosidase, β -Lactamase e Luciferase, visto que são mais sensíveis do que aqueles baseados em outros princípios, como a fluorescência gerada pela proteína verde fluorescente (DUBE; GUPTA; SINGH, 2009).

Neste contexto, consideramos que a obtenção de parasitos geneticamente modificados para expressar a enzima β -galactosidase e seu emprego para teste de atividade de compostos possui grande relevância farmacêutica e biotecnológica para a prospecção de novas

moléculas leishmanicidas. A validação da metodologia foi realizada utilizando o fármaco anfotericina B e uma série de moléculas análogas ou derivadas do ácido gálico, cuja atividade contra *T. cruzi*, um outro tripanosomatídeo, foi previamente estabelecida em nosso laboratório (ALBINO, 2005.; EGER, 2010).

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 LEISHMANIOSES

1.1.1 Histórico

As leishmanioses são um grupo heterogêneo de síndromes clínicas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmitidos por insetos fêmea de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae). O principal determinante da forma da doença é a espécie do parasito, embora as características do hospedeiro e do vetor também sejam importantes. As formas clínicas mais comuns são três: Leishmaniose Cutânea (LC), Muco-Cutânea (LMC) e Visceral (LV) (HERWALDT, 1999; ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012).

Registros de LC existem há milhares de anos no velho mundo sendo nominada como Ferida de Balkh, Botão-de-Bagdá, Botão-do-Oriente, etc, de acordo com os locais em que ocorriam. No Novo Mundo, as civilizações pré-colombianas produziram peças de cerâmica – conhecidas como Huacos - representando as lesões destrutivas da LMC. Acredita-se que LV também seja antiga, mas tenha sido historicamente confundida com a Malária até o século XIX, sendo conhecida como Febre Dum-dum ou Kalazar (COX, 2002; BARI, 2006).

A etiologia da forma cutânea começou a ser desvendada no final do século XIX. O mérito pela descoberta é conferido ao americano James Wright em 1903, embora o médico britânico David Cunningham e o cirurgião russo Borovsky tenham descrito anteriormente estruturas semelhantes ao parasito em lesões tegumentares. A causa da forma visceral foi encontrada em 1900, quando William Leishman e Charles Donovan separadamente demonstraram um novo parasito no baço de pacientes sofrendo de Kalazar. O parasito foi chamado de *Leishmania donovani* em homenagem aos seus co-descobridores (BAILEY; BISHOP, 1959; COX, 2002). Desde então, muitos autores descreveram novas espécies de leishmanias patogênicas ou não para seres humanos.

Indícios experimentais da transmissão da leishmaniose pelos flebotomíneos foram apresentados pelos irmãos Sergent em 1921, mas foi apenas no início da década de 40 que o modo de transmissão através da picada foi finalmente demonstrado (COX, 2002).

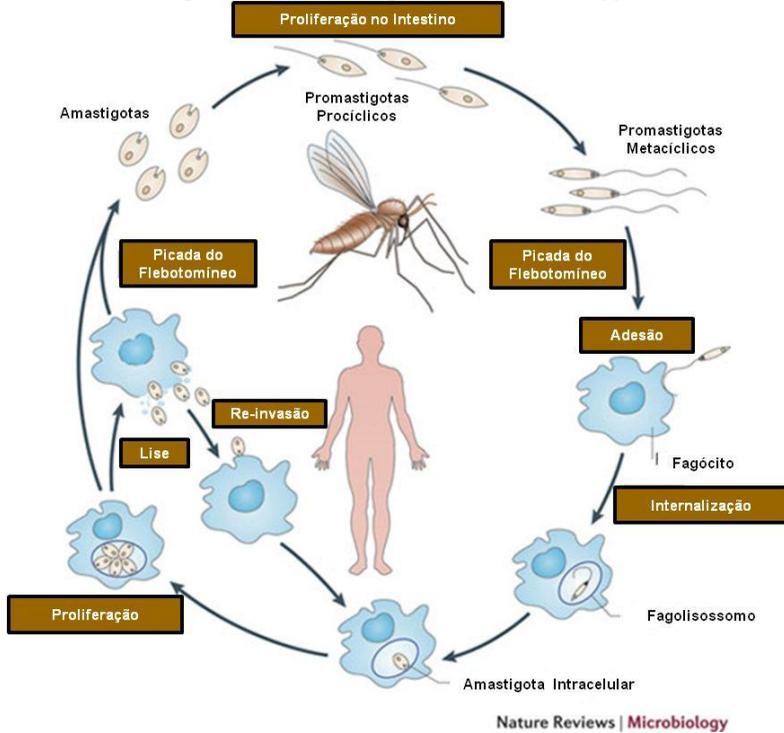
1.1.2 Biologia do parasito

Embora sua taxonomia ainda seja alvo de discussão, o gênero *Leishmania* spp. abrange 21 espécies divididas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Todas as 10 espécies encontradas no Velho Mundo pertencem ao subgênero *Leishmania* e 7 destas infectam humanos. No Novo Mundo, das 20 espécies conhecidas 11 pertencem ao subgênero *Leishmania* e 9 ao subgênero *Viannia*, das quais 5 e 8 espécies, respectivamente, causam doença em humanos (SHAW, 1994; LAINSON, 2010).

As leishmanias são protozoários heteroxenos e durante o seu ciclo biológico assumem duas formas morfológicas distintas: promastigota no flebotomíneo e amastigota no hospedeiro mamífero (MURRAY, *et al.*, 2005). O ciclo biológico de *Leishmania* spp. está representado na Figura 1. Cerca de 30 espécies de flebotomíneos pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, no Novo e Velho Mundo, respectivamente, são vetores destes parasitos (HERWALDT, 1999).

Durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado, as fêmeas de flebotomíneos ingerem formas amastigotas. No trato digestório do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas flagelados móveis que se proliferam através de divisão binária. Após uma semana do repasto sanguíneo, ocorre o processo de metaciclogênese com o surgimento de parasitos não proliferativos e altamente infectantes, os promastigotas metacíclicos. Estes se acumulam nas porções anteriores da hipofaringe do inseto e durante o novo repasto sanguíneo são regurgitados na derme do hospedeiro (OSÓRIO Y FORTEA, *et al.*, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

Os promastigotas metacíclicos são recobertos com um denso glicocálix composto de macromoléculas fixadas por âncoras de fostatidil-glicosilinositol (GPI). Os constituintes mais abundantes são os lipofosfoglicanos (LPG) com âncoras de GPI e enzimas como a protease gp63, moléculas essenciais para a virulência do parasito (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). O promastigota converte o C3b, componente do sistema complemento, em iC3B através da ação da gp63a favorecendo a pronta fagocitose através da interação com os receptores de complemento CR1 e CR3 de células dendríticas, neutrófilos e principalmente macrófagos, onde no interior do fagolisossomo se transformam em amastigotas e se proliferam através de divisão binária (SHARMA; SINGH, 2010).

Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp.

Um dos aspectos mais interessantes da biologia das leishmanias é a sua capacidade de escapar do sistema imune. Uma vez internalizados pelo macrófago, o parasito se protege da degradação no fagolisossomo por uma variedade de mecanismos que inibem a fusão fagossomo/endossomo, enzimas hidrolíticas, vias de sinalização intracelular, produção de óxido nítrico e produção de citocinas. Esta combinação de mecanismos adaptativos do parasito ao hospedeiro são fatores críticos para o aparecimento da doença (CUNNINGHAM, 2002).

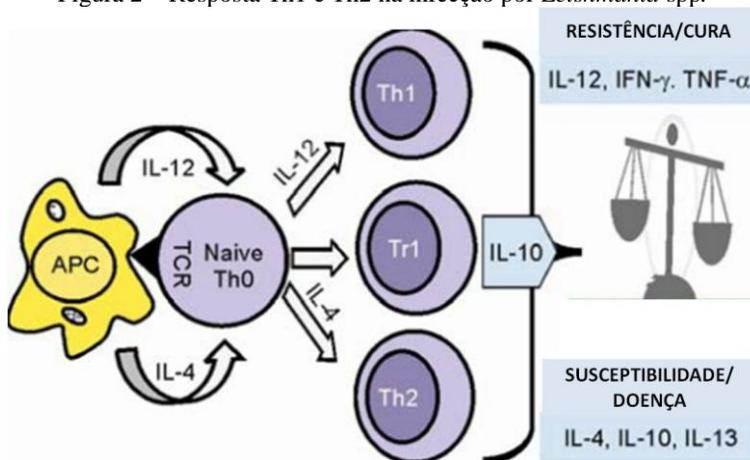
No vacúolo parasitóforo os parasitos passam por um remodelamento e diferenciação celular levando a formas ovais amastigotas não flageladas por um processo de autofagia mediado por cisteína peptidases (WILLIAMS, *et al.*, 2006). Os amastigotas intracelulares multiplicam-se por divisão binária. Após a lise celular causada pela replicação das formas amastigotas, estas podem infectar

outros fagócitos e/ou serem sugadas pela fêmea do vetor em um novo repasto, completando o ciclo (MURRAY, *et al.*, 2005; SHARMA; SINGH, 2010).

1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas das leishmanioses

Após o estabelecimento da infecção, a resposta imune contra o parasito é mediada por linfócitos T. O predomínio de respostas mediadas por células T helper 1 (Th1) ou T helper 2 (Th2) ajuda a entender o amplo espectro clínico, mesmo em infecções causadas por uma mesma espécie (SHARMA; SINGH, 2010). Respostas envolvendo linfócitos Th1 e mediadas por IFN- γ , TNF- α e IL-12 são associadas com resolução espontânea e resistência. Por sua vez a resposta Th2, com produção de IL-4, IL-10 e IL-13 confere susceptibilidade e progressão da doença (MURRAY, *et al.*, 2005; AMEEN, 2010), conforme representado na Figura 2.

Figura 2 – Resposta Th1 e Th2 na infecção por *Leishmania* spp.



Fonte: SHARMA; SINGH, 2010.

APC: célula apresentadora de antígenos; TCR: receptor de célula T; Th1: Linfócito T *helper* 1; Th2: Linfócito T *helper* 2; IL: Interleucina; IFN- γ : Interferon gama; TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

A intensidade e a natureza da resposta inflamatória levam, portanto, ao surgimento das lesões e determinam a sua extensão e duração. A baixa ou a ausência da resposta imune levam a uma doença crônica de difícil tratamento, conseqüentemente, uma reatividade

exacerbada leva a lesões desfigurantes. Muitos destes dados, contudo, provém de modelos murinos e a sua extrapolação para seres humanos deve ser feita com cautela, ainda mais se considerarmos que espécies distintas do parasito podem induzir respostas imunológicas diferenciadas (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004; REITHINGER, *et al.*, 2007).

A classificação das leishmanioses é feita de acordo com a apresentação clínica da doença. O principal fundamento para esta classificação é o tropismo de determinadas espécies do parasito por locais específicos do corpo do hospedeiro (HERWALDT, 1999; MURRAY, *et al.*, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição geográfica das espécies de leishmanias patogênicas e patologia associada

Espécie de <i>Leishmania</i>	Localização Geográfica		Doença	
	Novo Mundo	Velho Mundo	Primária	Secundária
			LC ^a	LV ^b
<i>L. donovani</i>		●		● LDPC ^c
<i>L. infantum</i> *		●		● LC
<i>L. chagasi</i> *	●			● LC
<i>L. major</i>		●	●	
<i>L. aethiopica</i>		●	●	LCD ^d
<i>L. tropica</i>		●	●	<i>Recidivans</i>
<i>L. mexicana</i>	●		●	LCD
<i>L. amazonensis</i>	●		●	LCD/recidivans
<i>L. venezuelensis</i>	●		●	LCD
<i>L. braziliensis</i>	●		●	LMC ^e /recidivans
<i>L. panamensis</i>	●		●	LMC (raro)
<i>L. guyanensis</i>	●		●	LMC (raro)
<i>L. peruviana</i>	●		●	LMC (relatos)
<i>L. Pifanoi</i>	●		●	

Fonte: CROFT; YARDLEY, 2002 (Modificado)

*: *L. infantum* (Velho mundo) e *L. chagasi* (Novo Mundo) são a mesma espécie.

^a:leishmaniose cutânea. ^b:leishmaniose Visceral. ^c:leishmaniose dérmica pós-calazar.

^d:leishmaniose cutânea difusa e ^e:Leishmaniose muco-cutânea

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma dermatrópica da doença, sendo também a mais prevalente. Possui subclassificações clínicas, de acordo com a extensão e persistência das lesões observadas na derme. A

evolução inicial da lesão, entretanto, é similar para todas. Após um período de incubação de 2 semanas a 3 meses, aparece uma pequena pápula indolor bem delimitada, de bordos elevados e fundo granuloso, acompanhada de prurido e uma linfonodomegalia local (Figura 3A). Esta lesão pode se curar espontaneamente, deixando uma cicatriz hipopigmentada ou desenvolver-se para outras formas da doença. Podem ocorrer múltiplas lesões metastáticas em áreas não contíguas do corpo (REITHINGER, *et al.*, 2007; AMEEN, 2010). Em casos de recidiva após a remissão clínica, novas lesões podem surgir nas bordas ou mesmo sobre a cicatriz de lesões resolvidas há meses ou anos (GOTO; LINDOSO, 2010).

Uma variante importante da LC é a Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), que produz nódulos não ulcerados disseminados por todo o corpo. A disseminação supostamente ocorre devido à anergia imunológica de alguns indivíduos aos antígenos do parasito (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010).

Na Leishmaniose Mucocutânea (LMC), ou espúndia, acontece a destruição progressiva de mucosas (nariz, faringe, boca e laringe) com comprometimento desfigurante da cartilagem (Figura 3B). A espécie mais comum neste caso também é *L. braziliensis*. Embora a LC em suas diversas subclassificações e a LMC não sejam fatais, as cicatrizes causam estigma e morbidade comprometendo a qualidade de vida do indivíduo acometido (GOTO; LINDOSO, 2010; WHO, 2010).

Figura 3 – Manifestações clínicas das leishmanioses



(A) Leishmaniose Cutânea; (B) Leishmaniose Muco-Cutânea. (C) Leishmaniose Visceral.

Fontes: (A) Dra. Marise S. Mattos; (B) Prof. Dr. Mario Steindel; (C) Wellcome Trust, 2000.

A forma mais grave dentre as leishmanioses é a visceral. A LV é uma doença sistêmica, fatal que afeta fígado, baço e medula óssea (Figura 3C). Os sinais e sintomas incluem febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia e pancitopenia. Em alguns casos o indivíduo pode permanecer assintomático por décadas. Devido ao comprometimento do

sistema imunológico, co-infecções bacterianas e virais (principalmente HIV), como pneumonia e diarreia podem surgir. O óbito ocorre pelas co-infecções, sangramento massivo ou anemia severa (CHAPPUIS, *et al.*, 2007 ; CLEM, 2010)

A leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) é uma complicação da LV principalmente nas áreas endêmicas para *L. donovani*. Caracteriza-se por *rash* macular, maculopapular e nodular, onde podem ser observados amastigotas. Os parasitos são observados em pacientes que se recuperaram ou estão em processo de recuperação da LV. Os mecanismos deste acometimento ainda não estão esclarecidos, mas muitas vezes exige continuidade ou retomada do tratamento (ZIJLSTRA, *et al.*, 2003).

A leishmaniose é uma infecção oportunista emergente em pacientes infectados com HIV. O problema mais significativo ocorre nos casos de LV+HIV, visto que ambas as doenças exercem um efeito deletério sinérgico da resposta imune (ALVAR, *et al.*, 2008). Indivíduos co-infectados demonstram uma resposta ineficiente a quimioterapia sistêmica e altas taxas de recaída. O emprego da terapia antiretroviral e profilaxia secundária parecem reduzir, mas não eliminar as recaídas (CHAPPUIS, *et al.*, 2007). Na LC/HIV surgem lesões atípicas incluindo pápulas, nódulos, placas e ulcerações. Um tratamento mais intenso também é necessário para se conseguir a remissão (GOTO; LINDOSO, 2010).

1.1.4 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos

Atualmente, as leishmanioses são um problema mundial de saúde pública e ocorrem de forma endêmica em 98 países ou territórios, onde mais de 350 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção. A incidência estimada anual é de 2 milhões de casos (500 mil da forma visceral e 1,5 milhão da forma cutânea e muco-cutânea). Estima-se que a leishmaniose visceral cause mais de 50.000 óbitos anuais, e uma perda de anos úteis de vida (DALYs) da ordem de 2,3 milhões de anos, taxa que entre as parasitoses é superada apenas pela malária (WHO, 2010).

Esta doença tem transmissão de caráter zoonótico, pois os hospedeiros naturais do parasito são principalmente roedores e canídeos. Os seres humanos são hospedeiros acidentais, exceto no subcontinente indiano e partes da África, onde há uma expressiva taxa de transmissão antroponótica da LV por *L. donovani* (PAVLI; MALTEZOU, 2010; READY, 2010)

A enfermidade distribui-se mundialmente, mas concentra-se nos trópicos e sub-trópicos. Mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Para a LC, os focos ocorrem na América Latina, norte da África e Oriente-Médio, com 90% dos casos encontrados no Afeganistão, Algeria, Irã, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru. A frequência de LCD e LMC é maior na América do Sul. Focos relativamente menores tanto de LC quanto de LV estão na região mediterrânea da Europa (WHO, 2010; READY, 2010).

Entre 1980 e 2005 foram registrados 59.129 casos de LV no Brasil, dos quais, 82,5% na região Nordeste. No decorrer deste tempo a doença parece ter se alastrado para outros locais, pois em 2005 a proporção de casos de LV em outras regiões havia subido para 44% (MAIA-ELKHOURY, *et al.*, 2008).

Durante muito tempo a LV foi considerada uma doença zoonótica rural no Brasil, entretanto ela tem emergido com proporções epidêmicas em áreas urbanas e periurbanas do país, a exemplo da tendência observada em outros países latino americanos (HARHAY, *et al.*, 2011). As ondas migratórias rural-urbanas e as condições sociais precárias, associadas a alta soroprevalência da doença em caninos e a adaptabilidade do vetor *Lutzomyia longipalpis* a estas condições foram correlacionadas com a urbanização da LV (LAINSON; RANGEL, 2005; WERNECK, *et al.*, 2007; HARHAY, *et al.*, 2011).

Ao contrário da LV, que no Brasil é causada apenas pela *L. infantum* (*L. chagasi*), a LC possui diversos agentes etiológicos, sendo os principais *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Entre os anos de 1990 e 2011 foram relatados 587.962 casos de LC e LMC no Brasil, em sua grande maioria nas regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2012). Uma franca expansão geográfica tem sido observada para esta forma de leishmaniose, pois no início da década de 80, dezenove estados eram endêmicos para LC e em 2001 todos os estados já haviam reportado casos autóctones da doença (COSTA, 2005).

As formas cutâneas da leishmaniose classicamente afetavam populações rurais e militares. Entretanto, a epidemiologia da LC mudou principalmente no nordeste brasileiro, ocorrendo agora na interface das áreas peri-urbanas e rurais (OLIVEIRA, *et al.*, 2004), indicando um deslocamento em direção as cidades, como já observado para LV.

Casos autóctones de LC já foram relatados em diferentes regiões do estado de Santa Catarina, sendo que desde a descrição dos primeiros relatos em 1987 até o ano de 2009, houve uma grande expansão geográfica da doença que atualmente ocorre de forma endêmica em 46

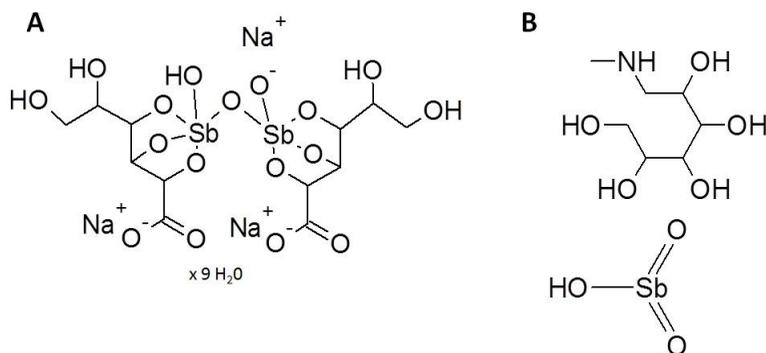
dos 297 municípios do Estado (MARLOW, *et al.*, 2013). A caracterização dos agentes etiológicos mostrou a presença de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* em mais de 98% dos casos (GRISARD, *et al.*, 2000; DIVE/SC, 2011)

Mesmo assim, a despeito de sua crescente importância epidemiológica, a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas, pois persiste predominantemente em comunidades pobres e marginalizadas (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012).

1.1.5 Tratamento das leishmanioses

Por mais de 60 anos os fármacos de primeira linha para o tratamento da LC ou LV tem sido os Antimoniais Pentavalentes Orgânicos (SbV) Estibogluconato de Sódio (Pentostan®) e Antimoniato de Meglumina (Glucantime®), (Figura 4). Estes substituíram os Antimoniais Trivalentes (SbIII), moléculas bastante tóxicas introduzidas como tratamento em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna (CROFT; YARDLEY, 2002; KAYSEL-CRUZ, *et al.*, 2009).

Figura 4 – Antimoniais Pentavalentes



(A) Estibogluconato de Sódio e (B) Antimoniato de Meglumina.

Os mecanismos da ação dos SbV não foram ainda completamente elucidados. Acredita-se que os SbV sejam pró-fármacos que são convertidos pelo sistema glutatona no ambiente intracelular do macrófago, à forma SbIII. A ação dos SbIII parece ser ampla, com evidências de que interferem com a glicólise, beta-oxidação, reduzem os níveis de tióis, e inibem a DNA topoisomerase I, afetando o equilíbrio

redox do parasito e levando a depleção do ATP intracelular (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

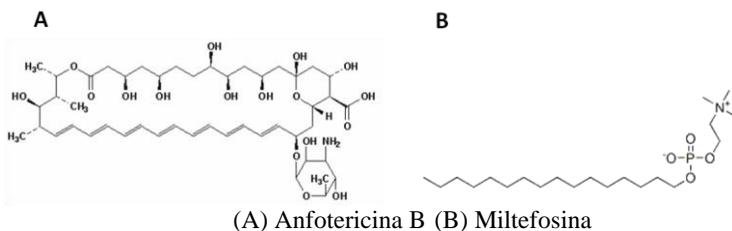
A via de administração (parenteral) e a longa duração do tratamento contribuem para aumentar os efeitos adversos (mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite) destes medicamentos. São comuns os casos de desistência e não-aderência ao tratamento devido a estes efeitos indesejados (CROFT; YARDLEY, 2002). Nestes casos de tratamento inadequado, podem restar níveis baixos de SbV circulantes, o que tem causado o surgimento de cepas de parasitos resistentes (ASHUTOSH.; SUNDAR; GOYAL, 2007). A resistência medicamentosa já levou ao abandono dos antimoniais como tratamento para leishmaniose em partes da Índia e Nepal, onde estes foram substituídos pela anfotericina B (CROFT; OLLIARO, 2011; STAUCH, *et al.*, 2012).

Na segunda linha de tratamento está o antibiótico macrolídeo poliênico Anfotericina B (Figura 5A), isolado de *Streptomyces nodosus*. Este fármaco complexa-se seletivamente com esteróis substituídos na posição 24 (como o ergosterol) presentes na membrana do parasito, o que altera a permeabilidade celular pela formação de poros que comprometem o equilíbrio osmótico (CROFT; COOMBS, 2003). Não há estudos conclusivos que demonstrem resistência de *Leishmania* a Anfotericina B, exceto induzida *in vitro* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Embora a anfotericina B (ANFO) já seja um tratamento alternativo para LMC e LV há um bom tempo, seu uso é restringido pela necessidade de infusão intravenosa e efeitos adversos tóxicos, em particular a cardio e nefrotoxicidade (CROFT; YARDLEY, 2002).

Várias formas farmacêuticas para este fármaco foram desenvolvidas visando diminuir os efeitos adversos e aumentar a eficácia do tratamento. A estratégia que obteve maior sucesso foi a inclusão da molécula em grandes vesículas lamelares, chamadas lipossomos, e sendo comercializada com o nome de AmBisome® (SHYAM SUNDAR, 2010). Estas formulações, embora ainda tenham algum potencial tóxico, e sejam de administração parenteral, são bastante seguras. A maior limitação ao seu uso é o alto custo, principalmente levando em consideração as populações acometidas pela doença (CROFT; YARDLEY, 2002).

Figura 5 – Anfotericina B e Miltefosina



Antifúngicos da classe dos imidazóis (cetoconazol, itraconazol e fluconazol) inibem a síntese do ergosterol e, portanto, possuem uma potente atividade leishmanicida *in vitro*, mas estudos clínicos demonstraram uma eficácia limitada devido a perfis de sensibilidade variáveis entre as espécies de leishmania (MINODIER; PAROLA, 2007).

A Miltefosina (Figura 5B) ou hexadecilfosfocolina (Impavido®, Zentaris), é o mais novo medicamento aprovado para tratamento de LV e LC. Este fármaco é inovador por ser o único com propriedades farmacocinéticas que possibilitam seu uso pela via oral. Foi identificado e avaliado no início dos anos 80 como um agente antitumoral, mas abandonado devido a efeitos tóxicos na dose efetiva para este fim. A atividade antiprotozoários das alquilglicerofosfocolinas, classe a qual pertence a miltefosina, foi também descrita nos anos 80. Seu desenvolvimento como um medicamento para leishmaniose foi realizado em colaboração pela WHO/TDR e o laboratório farmacêutico Zentaris (CROFT; ENGEL, 2006).

O mecanismo de ação das alquilglicerofosfocolinas ainda não é conhecido. Por ser um medicamento novo, ainda há algumas ressalvas quanto a seu uso. Os estudos pré-clínicos e clínicos demonstraram que o trato gastrointestinal é o principal alvo para efeitos tóxicos em humanos. Em animais, induziu alterações testiculares e efeitos embrio e fetotóxicos, o que contra-indica seu uso em gestantes (SINDERMANN; ENGEL, 2006).

Existem evidências de resistência tanto *in vitro* quanto *in vivo* ao tratamento com miltefosina. Alguns estudos sugerem resistência relacionada com a espécie ou isolados regionais de *L. braziliensis* e *L. mexicana*. Outros apontam o aumento nos casos de recaídas pós-tratamento na Índia, advertindo que a resistência medicamentosa a este fármaco pode se desenvolver rapidamente (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Outros fármacos também são empregados contra as leishmanioses, sendo que seu uso é mais comum nas regiões de maior prevalência de cepas resistentes ou quando a terapia clássica mostra-se ineficaz. Entre estes fármacos, os mais comuns são a paromomicina e a pentamidina (DAVIDSON; DEN BOER; RITMEIJE, 2009; BALAÑA-FOUCE, *et al.*, 1998).

Outras classes de moléculas têm demonstrado atividade leishmanicida *in vitro* ou em modelos animais. Estas foram revisadas por Richard e Werbovetz (2010). Moléculas derivadas ou inspiradas em produtos naturais também apresentam atividade leishmanicida promissora e já foram extensamente relatadas na literatura (SALEM; WERBOVETZ, 2006; SCHMIDT, *et al.*, 2012a; SCHMIDT, *et al.*, 2012b)

Em janeiro de 2013, a busca por testes clínicos em aberto envolvendo o termo “*leishmaniasis*” no site www.clinicaltrials.gov, administrado pelo *U.S. National Institutes of Health* resultou em 25 estudos. Destes, a maioria é referente a diferentes esquemas terapêuticos ou administração combinada de compostos já estabelecidos no tratamento da enfermidade. Entretanto, um estudo conduzido pelo *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID) chama a atenção pela abordagem diferenciada, envolvendo o uso concomitante do AmBisome e do SCH708980, um anticorpo monoclonal anti-IL10.

A falta de uma vacina efetiva e os prospectos pouco favoráveis para a obtenção de uma no futuro próximo fazem com que o controle da leishmaniose seja baseado na quimioterapia. Entretanto, o arsenal terapêutico atual possui sérias limitações (KAYSEL-CRUZ, *et al.*, 2009). Observa-se um marasmo na descoberta de novos fármacos, pois a maioria dos testes clínicos em andamento não envolve novos agentes terapêuticos, evidenciando a importância da obtenção de novas moléculas para o tratamento das leishmanioses.

1.2 DESCOBERTA DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de medicamentos é oneroso e requer anos de pesquisa, o que causou um desinteresse da indústria farmacêutica pelas doenças tropicais, já que o público alvo destes produtos não constitui um mercado lucrativo, comprometendo o retorno do investimento (CHATELAIN; IOSET, 2011; TROUILLER, *et al.*, 2002).

Um grande avanço nesta área, proporcionado pelo aporte financeiro dos últimos anos foi o seqüenciamento do genoma de várias

espécies de *Leishmania*. Isso fornece informações importantes para o entendimento desses organismos, comparação com as proteínas equivalentes no hospedeiro e ultimamente, identificação de alvos únicos para descoberta de novos quimioterápicos com mecanismos de ação diferenciados e inovadores (CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

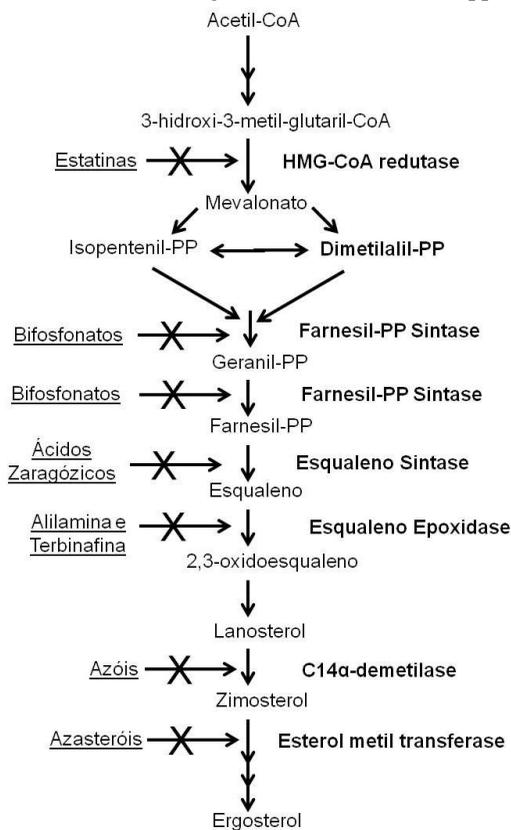
Há um número crescente de trabalhos para identificar peculiaridades biológicas destes parasitos com finalidade terapêutica (CROWTHER, *et al.*, 2010; MAGARIÑOS, *et al.*, 2012). Entretanto, diversas rotas metabólicas e enzimas conhecidas já foram validadas como alvos potenciais para o desenvolvimento racional de terapias para a leishmaniose.

1.2.1 Alvos terapêuticos

Filogeneticamente os tripanossomatídeos são uma família de um ramo distante dos eucariotos superiores. Sendo assim, sua organização celular e vias bioquímicas são únicas ou diferem consideravelmente daquelas encontradas em células de mamíferos. Isso provê alvos excelentes para o desenvolvimento de fármacos seletivos contra os parasitos e que produzam menos efeitos sobre os hospedeiros (BARRETT; MOTTRAM; COOMBS, 1999). As principais rotas metabólicas passíveis de uso como alvos terapêuticos serão discutidas a seguir.

A via biosintética dos esteróis é importante nas leishmanias para manutenção da função e estrutura celular. Ao contrário das células de mamíferos onde o principal esterol da membrana é o colesterol, nestes organismos este papel é desempenhado pelo ergosterol. Inibidores de enzimas desta via (estatinas, alilaminas e azóis) causam depleção dos esteróis normais e acúmulo de seus precursores. Exemplos de inibidores e seus respectivos alvos nesta rota estão na Figura 6 (TORRES-SANTOS, *et al.*, 2009; CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

Figura 6 - Biosíntese do ergosterol em *Leishmania* spp.



Fontes: Elaborado pelo autor, baseado em Chawla e Mandubala (2010) e De Souza e Rodrigues (2011).

A possibilidade do uso combinado de moléculas que inibem enzimas de diferentes etapas desta rota metabólica é interessante, pois pode produzir efeitos sinérgicos. Por exemplo, promastigotas de *L. braziliensis* que são naturalmente resistentes a inibidores da C14 α -demetilase (como o cetoconazol), tornam-se bastante susceptíveis quando estes são usados em combinação com a terbinafina, um inibidor da esqualeno epoxidase (URBINA, 1997).

A exemplo da via do ergosterol, a via de síntese das poliaminas também é um alvo passível de exploração farmacológica devido as diferenças bioquímicas entre o patógeno e o hospedeiro. As poliaminas, como a putrecina, espermina e espermidina, estão presentes em níveis

milimolares nos parasitos e têm uma importância adicional nestes organismos, pois além de participarem de uma gama de processos de diferenciação e proliferação, são cruciais para a síntese do tiol tripanotona (COLOTTI; ILARI, 2011).

Em mamíferos uma importante via para neutralização de espécies reativas de oxigênio é o sistema glutatona/glutationa redutase. Em tripanosomatídeos, esta função é suprida pela tripanotona/tripanotona redutase. A tripanotona oxidada é uma molécula chave para diversos processos metabólicos, sendo um elemento essencial para a manutenção de um ambiente intracelular redutor. Tais características tornam as enzimas envolvidas na síntese e redução da tripanotona em alvos importantes para a pesquisa de novos antiparasitários contra tripanosomatídeos, pois possibilitam o desenvolvimento de fármacos seletivos aos parasitos com menor potencial tóxico ao hospedeiro. Destas enzimas, a mais bem estudada é a Tripanotona Redutase (TR), a qual já é um alvo validado (SCHMIDT; KRAUTH-SIEGEL, 2002).

Leishmanias não possuem as enzimas para a síntese “de novo” dos anéis purínicos necessários aos nucleosídeos de purina e dependem, portanto, de um sistema de salvamento para utilizar estes metabólitos provenientes do meio adjacente. Os nucleosídeos são carreados através da superfície celular do parasito por transportadores específicos. O desenvolvimento de ligantes tóxicos que sejam internalizados seletivamente via transportadores seriam fármacos relevantes para tratamento desta doença (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Em adição, as enzimas da cascata de conversão das purinas a adenosina monofosfato (AMP) e guanosina monofosfato (GMP) também podem ser exploradas (SHUKLA, *et al.*, 2010).

Por outro lado, a síntese “de novo” das pirimidinas é um processo metabólico importante em *Leishmania*, sendo dependente de folato. Entretanto este sistema possui diversas rotas alternativas que exigiriam a inibição de mais de um alvo ao mesmo tempo. Estudos utilizando inibidores de uma única enzima, como a dihidrofolato redutase, demonstraram a rápida adaptação do parasito pela superexpressão de enzimas capazes de reduzir folato (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

Foram investigados, ainda, outros alvos como a via glicolítica, a rota Biosintética do GPI, MAP quinases (mediadoras de transdução de sinal e reguladoras da diferenciação e proliferação celular) e as enzimas cisteína, serina, e aspartato proteinases, devido ao seu papel na interação parasito-hospedeiro e como putativos fatores de virulência destes patógenos (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A identificação de moléculas capazes de modular ou inibir os alvos potenciais é possível através de ensaios de atividade contra as proteínas isoladas ou contra o parasito vivo. Para esta finalidade diversas estratégias e ensaios são empregados atualmente.

A descoberta de compostos contra doenças tropicais baseia-se em três estratégias: (1) extensão do uso de medicamentos empregados em outras patologias; (2) investigação de inibidores de um alvo molecular já validado em outro organismo e (3) identificação de novas entidades químicas em triagens de alto desempenho (HTS, do inglês *High Throughput Screening*). As duas primeiras geraram fármacos importantes como a Anfotericina B e a Miltefosina além de reduzirem os custos e tempo de pesquisa, mas medicamentos inovadores são geralmente obtidos pela terceira estratégia (NWAKA; HUDSON, 2006).

1.2.2 Detecção de novas moléculas líder contra leishmaniose

A identificação de compostos protótipos é um dos fatores limitantes no processo de descoberta de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose. Um dos métodos propostos para contornar esta dificuldade são os HTS em bibliotecas de moléculas sintéticas ou obtidas de fontes naturais (BLEICHER, *et al.*, 2003; SIQUEIRA-NETO, *et al.*, 2010).

Não obstante, os métodos para HTS baseiam-se, geralmente, em um único alvo molecular, como enzimas ou canais iônicos. Isto acontece porque testes celulares tendem a ser mais demorados, enfadonhos e difíceis de automatizar mesmo possuindo uma melhor capacidade preditiva sobre as propriedades biológicas de um composto (DAVIS; MURRAY; HANDMAN., 2004; SERENO, *et al.*, 2007).

Existem ensaios de triagem de compostos direcionados a promastigotas, amastigotas axênicos (cultivados na ausência de células) e contra amastigotas intracelulares (Tabela 2)..

Embora amplamente utilizada, ensaios com a forma promastigota apresentam desvantagens, visto que diferenças morfológicas e bioquímicas fazem dos promastigotas menos sensíveis do que amastigotas. Tal fato pode causar a exclusão de moléculas com potencial leishmanicida. Uma alternativa é a triagem em amastigotas axênicos, parasitos cultivados em meio na ausência de células (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

Contudo, Rochete e colaboradores (2009), apontam diferenças importantes no padrão de expressão de mRNA entre amastigotas axênicos e intracelulares de *L. infantum*, abrangendo desde genes

associados a proteínas do metabolismo de ácidos graxos até outros relacionados a resposta ao estresse oxidativo. Os autores especulam que isto seja sugestivo de que os amastigotas axênicos apenas regulam a expressão do mRNA como resposta aos sinais utilizados para sua diferenciação (choque de temperatura e pH extracelular), ao contrário dos amastigotas intracelulares.

Mais recentemente, Pescher e colaboradores (2011), compararam o perfil proteômico e traços fenotípicos de amastigotas axênicos e intracelulares de *L. donovani* demonstrando diferenças na virulência, habilidade de causar hepatoesplenomegalia e tempo de sobrevivência em meios que mimetizam a baixa disponibilidade de nutrientes do vacúolo fagolisossomal. Além disso, os amastigotas intracelulares apresentam níveis de expressão cinco vezes maior de enzimas antioxidantes e enzimas envolvidas no metabolismo de proteínas e aminoácidos. Estas diferenças sugerem que os amastigotas axênicos não são ideais para a triagem de compostos por não constituírem uma representação fiel dos amastigotas intracelulares.

Tabela 2 – Métodos de Triagem de Compostos ativos contra *Leishmania* spp.

Método	RGAente/ Marcador	Forma do Parasito		
		P ^a	A.A. ^b	A.I. ^c
Colorimétrico	Alamar Blue	●	●	
	MTT, MTS ou p-NPP	●		
	β-galactosidase	●		
Contagem Microscópica Manual	β-Lactamase			●
	Coloração pelo Giemsa/Diff-Quick /Fast Red			●
Microscopia Confocal Automatizada	Draq5 (fluoróforo/corante de DNA)			●
Fluorimétrico	Alamar Blue	●		
	GFP	●		●
Luminométrico	Luciferase	●	●	●

Fontes: KAISEL-CRUZ *et al.*, 2009; SIQUEIRA-NETO *et al.* 2012. (modificado)

^a:promastigotas; ^b:amastigotas axênicos; ^c: amastigotas

O emprego de metodologias com amastigotas intracelulares são desejáveis, pois estas se aproximam melhor da condição intracelular do parasito no hospedeiro humano (KAYSEL-CRUZ, *et al.*, 2009). Apesar

disso, os métodos clássicos de quantificação dos parasitos intracelulares requerem trabalho intenso, estão sujeitos a inacurácia e não são compatíveis com automação. Um exemplo disso é a técnica de contagem microscópica após a coloração das células infectadas pelo Giemsa. Tais limitações claramente impedem seu emprego para a avaliação de um grande número de compostos (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004). Um sistema para quantificação de parasitos intracelulares evitando a avaliação microscópica é, portanto, de alta relevância.

Gene repórter é um termo tipicamente usado para designar aquele que produz um fenótipo prontamente mensurável e distinguível do sinal endógeno inespecífico (SERENO, *et al.*, 2007). A tecnologia de genes repórter em parasitos geneticamente modificados foi sugerida como alternativa para facilitar este processo, pois podem produzir dados quantitativos e objetivos, deixar o método mais rápido e reduzir o trabalho manual (GUPTA; NISHI., 2011).

Atualmente existem diferentes cepas de leishmanias transgênicas expressando genes repórter tanto na forma de um plasmídeo ou integrado ao DNA cromossômico. Algumas preocupações têm surgido no tocante ao método de introdução do gene, tais como a resistência cruzada com fármacos devido a presença de genes de resistência a antibióticos para seleção dos parasitos ou a heterogeneidade da expressão do repórter por diferentes clones do parasito. Geralmente, métodos que usam repórteres catalíticos como a luciferase, β -lactamase e β -galactosidase são mais sensíveis do que aqueles baseados em fluorescência (GFP). As peculiaridades dos diferentes repórteres foram revisadas por Dube e colaboradores (2009).

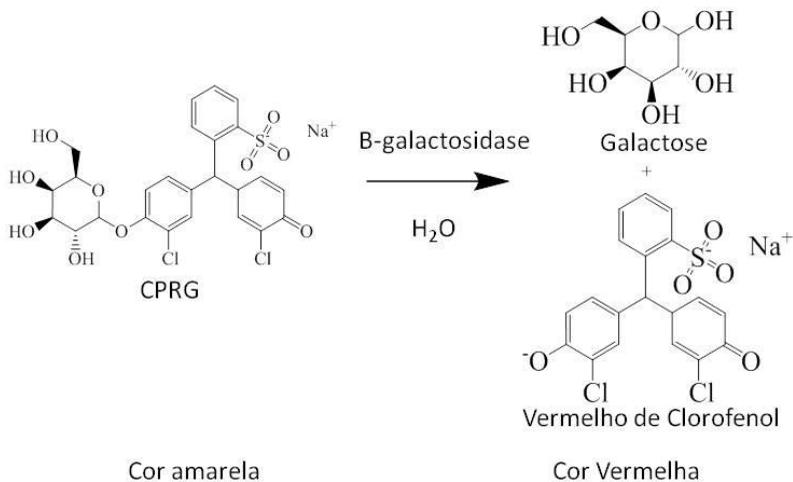
Leishmanias expressando o gene da luciferase também parecem ser adequadas a esta finalidade, permitindo inclusive a monitoração de infecções *in vivo*. O custo atual dos rGAentes requeridos, entretanto, torna menos provável o seu uso quando uma quantidade maior de compostos deve ser testada (GUPTA; NISHI., 2011).

Um sistema envolvendo β -lactamase foi desenvolvido para teste de compostos contra *L. major* e *L. amazonensis*. Entretanto, o substrato do ensaio (Nitrocefin) rGAe inespecificamente com componentes do meio de cultura, embora passos adicionais no ensaio tenham minimizado o problema (BUCKNER; WILSON, 2005).

Formas extracelulares de *L. amazonensis* expressando β -galactosidase foram avaliadas quanto ao seu potencial para uso em triagens de compostos (OKUNO, *et al.*, 2003). Embora a fácil detecção colorimétrica da reação catalisada por esta enzima (Figura 7) seja

desejável e bastante vantajosa, seu emprego para quantificação de formas intracelulares do parasito em macrófagos foi questionado, visto que essas células também expressam a enzima, gerando um alto ruído de leitura e interferindo no teste (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). O problema do *background* de leitura precisaria ser resolvido para que este repórter pudesse ser utilizado com maior confiança.

Figura 7 – Clivagem da CPRG pela β -galactosidase



Fonte: Elaborado pelo autor, baseado em Dias e colaboradores (2009)

Esquema reacional da clivagem do substrato clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo ou CPRG (1) pela enzima β -galactosidase, levando a formação de galactose (2) e do cromóforo vermelho de clorofenol.

1.2.3 Ácido gálico, análogos e ésteres derivados

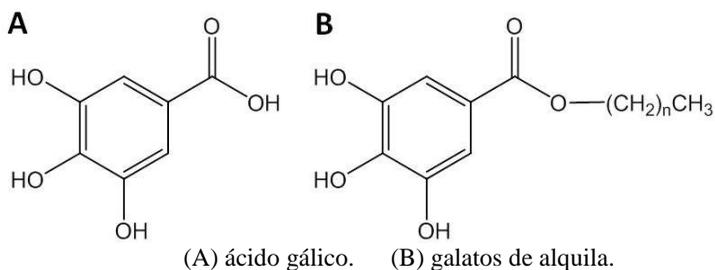
A aplicação do método de triagem proposto pode ser demonstrada na prática através da avaliação da atividade leishmanicida de uma série de moléculas biologicamente ativas, que possuem atividade antiprotozoários já descrita.

Derivados fenólicos que ocorrem em plantas possuem atividade leishmanicida estabelecida *in vitro* e *in vivo*. Dentre estes compostos destacam-se as chalconas, seus derivados auronas, e os flavonóides. Outros derivados fenólicos com atividade leishmanicida incluem algumas ligninas, cumarinas, curcuminas e taninos hidrolisáveis (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; SALEM; WERBOVETZ, 2006).

O ácido gálico (G0) ou conforme a IUPAC, ácido 3,4,5-trihidroxibenzóico (Figura 8A), é um composto fenólico trihidroxilado e uma molécula encontrada de forma abundante no reino vegetal como um metabólito secundário componente de taninos hidrolisáveis em uvas e chás (HODGSON, *et al.*, 2004; HOGAN, *et al.*, 2009).

Os galatos de alquila (GA), outro termo para os ésteres de alquila do ácido gálico (EAG), especialmente os galatos de propila, octila e dodecila (Figura 8B), tem sido extensamente usados pelas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos desde 1947. Suas aplicações incluem a de aditivos e seqüestrantes de espécies de oxigênio reativo para prevenir mudanças no sabor e no valor nutritivo devido a oxidação de ácidos graxos insaturados (VAN DER HEIJDEN; JANSSEN; STRIK, 1986; GARCÍA-MELGARES; DE LA CUADRA; MARTÍN, 2007).

Figura 8 – O ácido gálico e seus derivados ésteres de alquila



Fonte: elaborado pelo autor

Entretanto, a segurança de seu uso com esta finalidade foi questionada, devido a evidências de sensibilização de contato por várias destas moléculas, especialmente o galato de laurila (Galato de dodecila – G12) que produziu efeitos mais evidentes (HAUSEN; BEYER, 1992). Entre 1985 e 2006, 47 casos de alergias envolvendo GA foram registrados pela unidade de alergia do Hospital Geral Universitário de Valência na Espanha, sendo a maioria devido aos galatos de propila e octila (G8) (GARCÍA-MELGARES; DE LA CUADRA; MARTÍN, 2007).

Os efeitos *in vitro* e *in vivo* do ácido gálico e seus derivados sobre as enzimas que metabolizam drogas foram discutidos por Ow e Stupans (2003). Nessa revisão, os autores mostraram que alguns GA, quando ingeridos, são hidrolisados a ácido gálico e metabolizados no fígado,

onde podem inibir enzimas do complexo citocromo P450 (OW; STUPANS, 2003).

A ação destes compostos sobre os radicais livres é bem estabelecida na literatura, porém, estudos apontam que eles podem atuar tanto como antioxidantes como pró-oxidantes (GUNCKEL, *et al.*, 1998; KUBO, *et al.*, 2002a; YOSHINO, *et al.*, 2002; HA; KUBO, 2004). O efeito antioxidante pode ser devido a inibição da xantina oxidase, além da modulação da atividade da mieloperoxidase e seqüestro de ácido hipocloroso (KUBO, *et al.*, 2002a; MASUOKA; NIHEI; KUBO, 2006; ROSSO, *et al.*, 2006) enquanto que a ação pró-oxidante é cobre-dependente e causa, *in vitro*, quebras na molécula de DNA e formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, dano atribuído a formação de espécies reativas de oxigênio (YOSHINO, *et al.*, 2002).

Outras atividades biológicas deste grupo de moléculas são bastante amplas e incluem desde efeitos antitumorais e anticarcinogênicos (LOCATELLI, *et al.*, 2008; LOCATELLI, *et al.*, 2009; LOCATELLI, *et al.*, 2012) até atividades inibitórias sobre vírus (SAVI, *et al.*, 2005; KRATZ, *et al.*, 2008), bactérias (KUBO; FUJITA; NIHEI, 2002; KUBO; XIAO; FUJITA, 2002; KUBO, *et al.*, 2003; KUBO, *et al.*, 2004), fungos (KUBO, *et al.*, 2002b; HSU, *et al.*, 2009; LEAL, *et al.*, 2009) e protozoários (LETELIER, *et al.*, 1990; KOIDE, *et al.*, 1998; ALBINO, 2005.; TASDEMIR, *et al.*, 2006; EGER, 2010).

Quanto a atividade antiparasitária destes compostos, Koide *et al.* (1998) relataram que o ácido gálico e alguns compostos relacionados possuem atividade tripanocida sobre o *Trypanosoma brucei brucei* tanto em formas sanguíneas como em procíclicas, com doses letais de aproximadamente 47 e 30 μM para as duas formas, respectivamente. O pirogalol, uma molécula semelhante ao ácido gálico, porém desprovida do grupo funcional carboxila parece ser o responsável pela atividade. Nose e colaboradores (1998) sugeriram que a atividade tripanocida pode estar relacionada a efeitos pró-oxidantes do G0 (NOSE, *et al.*, 1998).

Tasdemir e colaboradores (2006) testaram a atividade de diversos flavonóides sobre formas sanguíneas de *T. b. rhodesiense*, amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, e amastigotas axênicos de *Leishmania donovani*, sendo que o G0 demonstrou atividade apenas sobre *T. brucei*. Por outro lado, o pirogalol, foi ativo contra *T. brucei* e *L. donovani*.

Letelier *et al.* (1990) avaliaram a capacidade do G0 e de galatos de metila, propila, octila e dodecila em inibir a respiração celular em epimastigotas de *T. cruzi*, das cepas Tulahuen e do clone Dm28. O consumo de oxigênio foi inibido de forma mais potente pelos derivados ésteres com maior número de carbonos na cadeia alifática (LETELIER,

et al., 1990). Albino (2005), avaliou a atividade tripanosomicida *in vitro* de 28 compostos derivados do G0 e observou que quatro dos seus GA (galatos de decila, undecila, dodecila e tetradecila) possuíam atividade contra epimastigotas, tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares da cepa Y de *T. cruzi*. Estudos posteriores realizados por Eger (2010) confirmaram essa atividade e demonstraram, ainda, a inibição pelo G0 da enzima Tripanotiona Redutase recombinante de *T. cruzi* (TcTR).

Apesar de sua atividade inibitória sobre a TcTR, G0 não apresentou efeito tripanocida *in vitro* ou *in vivo*. É razoável hipotetizar, portanto, que a ausência desta bioatividade pode ser devida, em parte, à sua baixa permeabilidade celular (EGER, 2010). Os GA também parecem exercer uma atividade citotóxica sobre células de mamíferos, com CI_{50} sobre células Vero variando de 17,6 a 35,5 μM (KRATZ, 2007). Uma forma de contornar estas desvantagens e melhorar a sua atividade seria o desenvolvimento de carreadores com capacidade para aumentar a biodisponibilidade intracelular dos compostos.

Dada a necessidade de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses e os resultados promissores apresentados por alguns GA sobre outros tripanossomatídeos, consideramos importante a avaliação do potencial leishmanicida destes compostos e de variações estruturais da molécula protótipo (G0) sobre este efeito. A inclusão dos compostos ativos em uma formulação nanoencapsulada também poderia trazer melhorias sobre a atividade e seletividade destas moléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um método colorimétrico para a triagem da atividade antileishmania de compostos contra amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Transfectar uma cepa de *Leishmania amazonensis* com um plasmídeo contendo a enzima β -galactosidase de *E. coli*;
- Avaliar o efeito da transfecção sobre o crescimento em cultura e a infectividade *in vitro* e *in vivo* do parasito;
- Padronizar e validar um ensaio colorimétrico para detecção de compostos ativos contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- Avaliar a atividade leishmanicida do ácido gálico, seus análogos e derivados ésteres de alquila;
- Correlacionar aspectos da estrutura química dos compostos testados com a sua atividade leishmanicida;
- Verificar o efeito de formulações de nanocápsulas poliméricas contendo os compostos ativos sobre sua ação leishmanicida;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PARASITOS E CÉLULAS

3.1.1 Cultivo de parasitos

A cepa MHOM/BR/77/LTB0016 de *L. amazonensis* utilizada neste trabalho foi gentilmente cedida pela Dra Leonor Leon do Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Esta espécie e cepa foi preconizada pelos integrantes da *Research Initiative on Natural Products against Neglected Diseases* – (ResNetNPD) como modelo para triagem de compostos leishmanicidas devido a sua facilidade de cultivo *in vitro*. O Laboratório de Protozoologia da UFSC é um dos integrantes desta rede.

Para manter a infectividade, os parasitos foram inoculados nos coxins plantares das patas traseiras de camundongos Balb/c (*Mus musculus*). Os amastigotas recuperados das lesões foram propagados como promastigotas a 26°C em garrafas de cultura celular de 25 cm², contendo 5 mL de *Schneider's insect medium* (Sigma-Aldrich, St. Louis), pH 7,4 e suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado (SBF – Gibco, BRL), 2% (v/v) de urina humana, 10 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina (Gibco, BRL) (Aqui denominado Schneider completo). Várias alíquotas foram congeladas em nitrogênio líquido e depositadas no criobanco do Laboratório de Protozoologia da UFSC.

Para os experimentos, promastigotas foram descongelados e cultivados a 26°C em garrafas de cultura celular de 25 cm², contendo 5 mL de Schneider completo e mantidos através de 2 repiques semanais por no máximo 20 passagens. Os parasitos transfectados foram cultivados na presença de 500 µg/mL de Geneticin (G418 - Santa Cruz Biotechnology, USA).

3.1.2 Transfecção de *L. amazonensis*

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento (8×10^7 /mL) foram transfectadas com plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10 construído por Buckner *et al.* (1996) que contém o gene da Beta-Galactosidase de *Escherichia coli* (EC 3.2.1.23) (β -gal) e o gene da neomicina fosfotransferase II, que confere resistência ao antibiótico G418 (BUCKNER, *et al.*, 1996). A transfecção foi realizada por eletroporação utilizando o *Basic Parasite Nucleofector® Starter Kit* (Amaxa/Lonza) conforme as orientações do fabricante. Resumidamente,

10^7 parasitos lavados com PBS (Tampão Salino Fosfato, pH 7,4) foram coletados por centrifugação (2000.g/10 minutos) e suspendidos em 100 μ L de *Basic Parasite Nucleofactor Solution*. Em seguida foram transferidos para uma cubeta do kit e misturados com 10 μ g do plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10. Os promastigotas foram eletroporados em um dispositivo Nucleofector 2b® (Lonza) utilizando o programa U-033, transferidos para tubos cônicos contendo meio de Schneider completo e cultivados a 26°C. Após 24 horas iniciou-se a seleção dos parasitos transfectantes pela adição de concentrações crescentes de G418 (20 a 500 μ g/mL), sendo posteriormente cultivados conforme o item 3.1.

3.1.3 Clonagem de promastigotas de *L. amazonensis*

Visto que leishmanias tendem a crescer em cultura na forma de rosetas (agregados de parasitos), métodos de clonagem comumente usados, baseados somente em diluição limitante ou crescimento de colônias em meio sólido não são confiáveis. Uma forma de assegurar-se de que um único organismo será usado como inóculo é a através da observação microscópica direta (EVANS, 1993). Sendo assim, utilizamos o protocolo sugerido por Garin e colaboradores (2002) com algumas modificações.

Uma cultura em fase logarítmica de promastigotas expressando β -gal foi lavada em PBS por duas vezes e suspendida em meio de Schneider completo. Os parasitos foram quantificados por contagem em câmara de Neubauer e sua concentração foi ajustada para 10^3 promastigotas/mL. Um μ L desta suspensão foi distribuído em placa de cultura celular e a seguir os poços examinados um a um em microscópio invertido com um aumento de 300 vezes para identificação daqueles que continham apenas um parasito.

Em poços com um único parasito, adicionou-se 100 μ L do meio de Schneider completo e nos demais, 100 μ L de PBS para manter a umidade na placa. A mesma foi vedada com fita e incubada por 7 dias a 26°C, quando adicionou-se mais 100 μ L de meio em cada poço e o cultivo mantido por mais 7 dias. Os clones assim obtidos foram expandidos e cultivados pela inoculação do conteúdo de cada cavidade positiva em meio de cultura, conforme o item 3.1.1.

3.1.4 Ensaio de atividade da β -galactosidase em promastigotas

Promastigotas foram coletadas por centrifugação (2.000xg/10 minutos), lavadas uma vez com PBS e quantificadas em Câmara de Neubauer. A densidade dos parasitos foi ajustada com PBS para a concentração desejada e estes foram distribuídos em um volume de 200 μ L/poço em placas de 96 poços. Adicionou-se, em seguida, 50 μ L de uma solução contendo 500 μ M de CPRG (Sigma-Aldrich, St. Louis) e o detergente Nonidet P-40 (Amresco, OH) a 0,5% (v/v) diluídos em PBS. A reação foi desenvolvida durante 16 horas a 37°C e lida a 570 nm com referência em 630 nm em espectrofotometro Tecan® Modelo Infinite M200.

3.1.5 Cultivo de células

A linhagem de células de leucemia monocítica humana aguda THP-1 (TSUCHIYA, *et al.*, 1980) foi obtida do criobanco do Laboratório de Protozoologia da UFSC e cultivada em garrafas de cultura de 75cm² contendo 12 mL de RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Sigma Aldrich, St. Louis), pH 7,4 suplementado com 10% (v/v) de SBF, 12,5 mM de tampão HEPES (Gibco, BRL), 100 U/mL penicilina, 100 μ g/mL estreptomicina (GIBCO, BRL), 2 mM de Glutamax®, (GIBCO, BRL) 1mM de Piruvato de Sódio (GIBCO, BRL) (aqui definido como RPMI completo) e mantidas em uma incubadora umidificada (37°C e atmosfera umidificada de 5% de CO₂).

A linhagem foi mantida através de repiques no 3º ou 4º dia de crescimento e reinoculadas a uma densidade de 3 x 10⁵/mL. Para tal, após uma lavagem em PBS, o número de células viáveis foi determinado pelo teste de exclusão do azul de trypan (0,02%), quantificado em Câmara de Neubauer e ajustado a concentração desejada em meio RPMI completo. Para os experimentos, utilizaram-se células com no máximo 15 passagens.

As linhagens celulares murinas semelhantes a macrófagos (RAW 264.7 e J774.G8) foram mantidas nas mesmas condições descritas acima, mas por serem aderentes, o tapete celular foi coletado por raspagem com auxílio de um *cell scraper* para o repique duas vezes por semana.

3.1.6 Indução da diferenciação de células THP-1

Células THP-1 coletadas no 3º ou 4º dia de crescimento foram quantificadas conforme descrito no item 3.1.5 e induzidas à diferenciação em fagócitos aderentes semelhantes a macrófagos conforme descrito por Schwende e colaboradores (1996). Em resumo, em placas de 96 poços, cultivamos 3×10^4 células/poço em 200 μ L de meio RPMI completo acrescido de 100 μ g/mL de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Quando especificado, a diferenciação foi realizada em garrafas de cultivo celular de 75 cm² (6×10^6 células/garrafa) em um volume de 12 mL ou em *Chamber Slides* (10^5 /poço em 300 μ L), nas mesmas condições descritas acima.

3.1.7 Preparação dos parasitos para a infecção celular

Promastigotas em fase logarítmica tardia do crescimento (4º dia de cultivo – Figura 14) foram coletadas por centrifugação (2.000xg/10 minutos) e lavados duas vezes em PBS. A concentração de parasitos foi ajustada para 4×10^6 células/mL em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol na presença de 10% (v/v) de soro humano AB⁺ e incubados por uma hora a 34°C para opsonização. Subseqüentemente, os parasitos foram centrifugados (2.000xg/10 minutos) e suspensos em meio RPMI sem vermelho de fenol e sem SBF nas concentrações especificadas e adicionados sobre as monocamadas de células para infecção.

3.1.8 Infecção das células THP-1 com *L. amazonensis*

Para infecção em placas de 96 poços, a suspensão de promastigotas opsonizadas (3.1.7) foi adicionada sobre células THP-1 aderentes (3.1.6) na proporção de 10:1 parasitos/célula (exceto quando outra proporção for mencionada) em um volume final de 100 μ L/poço. Após três horas de cultivo (34°C; 5% de CO₂), as monocamadas foram lavadas com PBS para remoção dos parasitos não internalizados e cultivadas novamente por 24 horas a 34°C e 5% de CO₂ em 180 μ L de meio RPMI completo.

O protocolo foi idêntico para as células cultivadas em garrafas de cultura ou *Chamber Slides*, porém os volumes da suspensão de promastigotas e de RPMI completo adicionados foram de 5 mL/garrafa e 150 μ L/poço e 12 mL/garrafa e 450 μ L/poço, respectivamente.

3.1.9 Isolamento de formas amastigotas intracelulares

Monocamadas de células THP-1 infectadas conforme o item 3.1.7 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² durante uma semana em meio RPMI completo trocado a cada 3 dias. Os tapetes celulares infectados foram coletados por raspagem com *cell scraper* e rompidas para recuperação dos amastigotas intracelulares conforme o protocolo proposto por Chang (1980), com modificações.

As células foram centrifugadas em tubos cônicos de 15 mL a 4.500xg por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento suspendido em 5 mL de PBS com 2 mM de EDTA. Esta suspensão foi submetida a 4 ciclos de centrifugação (4.500xg/10 minutos; 34°C) e homogeneização vigorosa em vórtex (5 minutos). Após uma última centrifugação, o PBS do sobrenadante contendo a maior parte dos debris celulares foi descartado e substituído por meio RPMI completo. O sedimento restante foi passado 3 vezes em uma agulha de 26G½ e o número de amastigotas viáveis foi quantificado em Câmara de Neubauer e a viabilidade pelo método de exclusão do azul de trypan (0,02%).

3.1.10 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada através da técnica do MTT, conforme descrito por Loosdrecht e colaboradores (1991) e modificada por Sieuwerts e colaboradores (1995). A técnica consiste na incorporação da substância hidrossolúvel Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) por células viáveis que reduzem o composto através da ação de desidrogenases mitocondriais, formando um sal de formazan insolúvel e com coloração roxa, que se deposita no citoplasma. A quantidade deste sal é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As células foram coletadas e quantificadas conforme o item 3.1.5 e semeadas em placas de 96 poços (4 x 10⁴ células/poço) em 180 µL de RPMI completo. Em seguida, 20 µL dos compostos diluídos em meio de cultura em concentrações decrescentes de 100 a 1,56 µM foram adicionados sobre as células. Estas foram cultivadas por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. As placas foram, então, centrifugadas (2.700xg/10 minutos), o sobrenadante foi removido e o sedimento ressuspendido em 50 µL de uma solução de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis) a 3 mg/mL. Na seqüência, as placas foram incubadas a 37°C no escuro durante 4 horas e depois centrifugadas (2.700xg/10 minutos). O sobrenadante foi, então, retirado e o sedimento (sal de formazan) solubilizado em DMSO

(100 µL/orifício) por uma hora sob agitação. A densidade óptica foi determinada a 540 nm em equipamento Tecan® modelo Infinite M200.

Poços contendo apenas meio de cultura foram utilizados como branco para cada concentração de compostos ou controles. DMSO 1% (v/v) foi o controle negativo de inibição celular. DMSO 20% foi o controle positivo. Anfotericina B foi testada até 10 µM. O percentual de inibição (P.I.) para cada concentração dos compostos foi determinado conforme a Equação 1.

As CC_{50} foram calculadas plotando-se as curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA).

$$PI = \left(1 - \frac{D.O.\text{.composto} - D.O.\text{.branco -composto}}{D.O.\text{.controle negativo} - D.O.\text{.branco -contr ole negativo}} \right) \times 100$$

Equação 1 – Percentual de inibição do crescimento.

3.2 INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS

Amastigotas da cepa selvagem de *L. amazonensis* ou dos clones expressando β-galactosidase foram obtidos de células THP-1 infectadas (item 3.1.9) e ajustados a uma concentração de 2×10^7 parasitos/mL em meio RPMI.

Camundongos Balb/c (30 a 45 dias de idade) foram divididos em 3 grupos ($n \geq 3$) e inoculados na pata traseira esquerda com 50 µL (10^6 amastigotas) das suspensões de parasitos, utilizando-se uma agulha de insulina. A pata esquerda foi inoculada com 50 µL de RPMI. O diâmetro da pata infectada foi acompanhado durante 10 semanas e mensurado com um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. O tamanho da lesão foi expresso como a diferença (em milímetros) entre o diâmetro das patas medido em cada ponto após a infecção subtraindo-se o diâmetro medido antes da inoculação. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e fragmentos das lesões foram macerados e inoculados em meio de Schneider completo para recuperação dos parasitos como promastigotas conforme descrito no item 3.1.1.

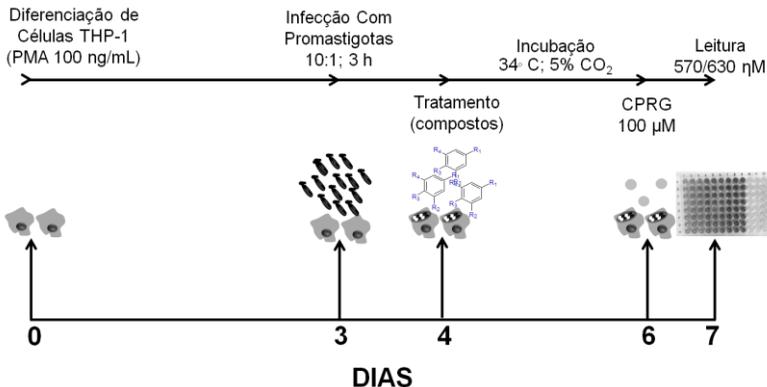
Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (CCB/UFSC) em ambiente a 22 ± 2 °C, em um ciclo de luz e escuridão de 12:12h e tratados com ração e água *ad libitum*. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais da UFSC (parecer PP00822/CEUA/2012).

3.3 TRIAGEM DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA INTRACELULAR DE COMPOSTOS

3.3.1 Ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicidas

Conforme mencionado, células THP-1 aderentes, diferenciadas em placas de 96 poços (item 3.1.6) foram infectadas com clones de *L. amazonensis* expressando a enzima β -gal (item 3.1.7). Após 24 horas de incubação, para permitir a transformação dos promastigotas em amastigotas, as células foram tratadas com 20 μ L dos compostos diluídos em meio de cultura em diferentes concentrações e as células cultivadas 48 horas a 34°C e 5% de CO₂. O sobrenadante foi removido e acrescentado 250 μ L de PBS contendo CPRG (100 μ M) e NP-40 0,1% (v/v). A reação foi desenvolvida durante 16 horas a 37°C e lida a 570 η m com referência em 630 η m em equipamento Tecan® Modelo Infinite M200. O procedimento do ensaio colorimétrico usado na triagem de compostos está esquematizado na Figura 9.

Figura 9 – O ensaio colorimétrico para teste de compostos



Poços contendo células não infectadas foram utilizados como branco para cada concentração de compostos ou controles. DMSO 1% (v/v) foi o controle negativo de inibição de *L. amazonensis*. Anfotericina B 1 μ M foi o controle positivo.

O percentual de inibição (P.I.) para cada concentração dos compostos foi determinado conforme a Equação 1. As CI₅₀ foram calculadas plotando-se as curvas concentração-resposta em um modelo

de regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.03® (San Diego, USA).

3.3.2 Avaliação da atividade leishmanicida pela contagem em microscópio óptico

O protocolo de infecção e tratamento com os compostos foi realizado de forma idêntica ao item 3.3.1. Entretanto, Para avaliar a atividade antiparasitária as monocamadas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol (2 minutos) e coradas pelo Giemsa (20 minutos). O número de parasitos intracelulares e o percentual de células infectadas foram quantificados em 100 células/poço para determinação da redução do Índice Parasitário (IP- Equação 2.), conforme Sereno e colaboradores (2000). O IP atribui peso tanto a redução no número de células infectadas quanto a diminuição na carga parasitária em relação ao controle negativo. As CI_{50} foram calculadas da mesma forma descrita para o teste colorimétrico.

$$IP = \left(1 - \frac{\text{Amastigotas/célula}_{\text{tratados}} \times \% \text{ de células infectadas}_{\text{tratados}}}{\text{Amastigotas/célula}_{\text{DMSO } 1\%} \times \% \text{ de células infectadas}_{\text{DMSO } 1\%}} \right) \times 100$$

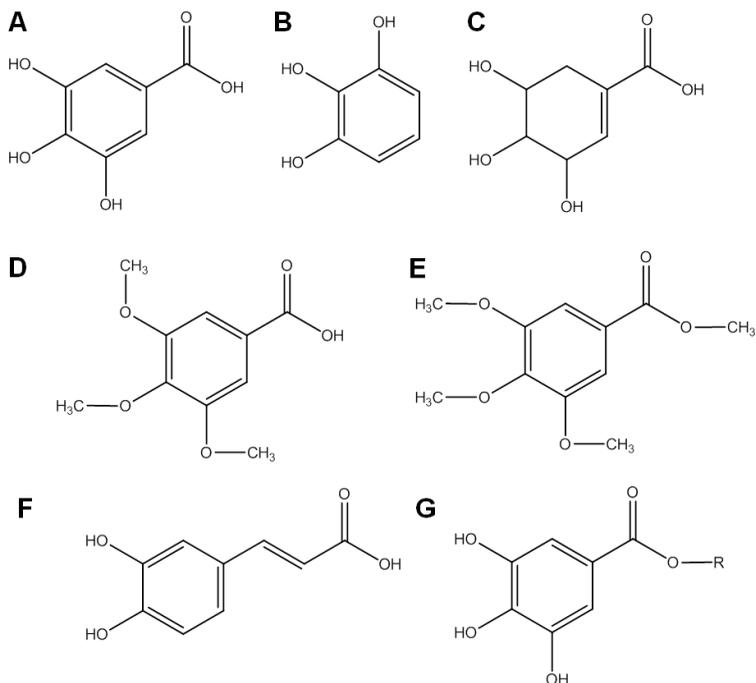
Equação 2 – Percentual de redução do índice parasitário.

As células cultivadas em *Chamber Slides* também foram coradas pelo Giemsa do mesmo modo descrito acima.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO GÁLICO E MOLÉCULAS RELACIONADAS

Utilizando o teste de triagem colorimétrico, visamos determinar a atividade leishmanicida de um grupo de moléculas (Figura 10) e melhorar a sua eficácia e seletividade, conforme os passos esquematizados Na Figura 11.

Figura 10 – Os compostos testados



(A) ácido gálico; (B) pirogalol; (C) ácido chiquímico; (D) ácido eudésmico; (E) eudesmato de metila; (F) ácido cafeico; (G) estrutura básica dos galatos de alquila, onde R representa uma cadeia carbônica contendo 8, 10, 11, 12 ou 14 átomos de carbono.

Os compostos testados (Figura 10) foram adquiridos da Sigma-Aldrich, com exceção dos galatos de decila, undecila e tetradecila, obtidos pela esterificação do ácido gálico no Laboratório de Síntese e Atividade do Departamento de Química da UFSC, sob supervisão do Professor Ricardo José Nunes, conforme descrito por Leal e cols (2009).

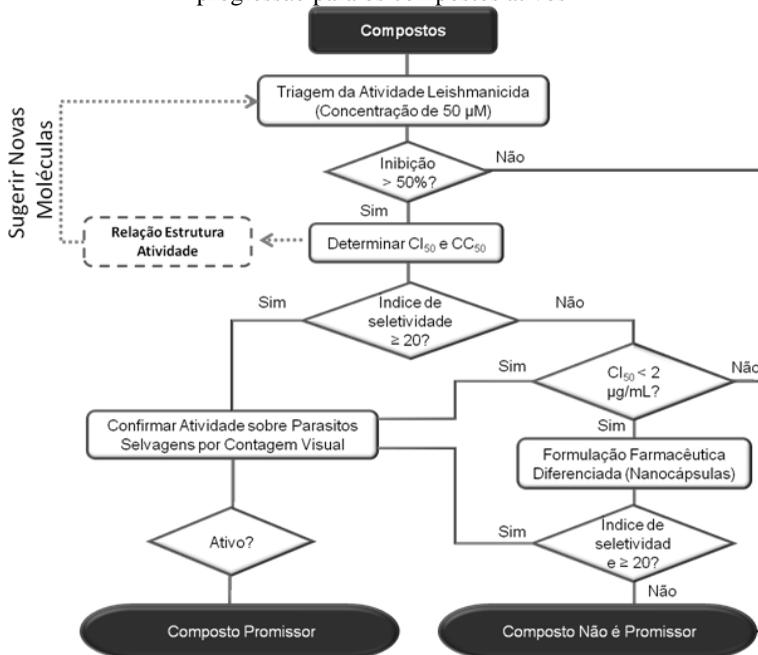
Os compostos testados neste estudo foram inspirados na molécula de G0 (Figura 10A) e representam modificações em sua estrutura química. Tais mudanças visaram verificar o efeito destas variações sobre a atividade leishmanicida. As modificações estudadas foram: retirada do grupo carboxila (Figura 10B), modificação no anel aromático (Figura 10C), metilação das hidroxilas nas posições 3, 4 e 5 (Figura 10D), esterificação do análogo da Figura 10D, formando o composto da Figura 10E, aumento do espaçamento entre o anel aromático e o grupamento carboxila por uma ligação insaturada e retirada de um grupo hidroxila na

posição 3 (Figura 10F) e variações no comprimento da cadeia alquílica dos ésteres de G0 (Figura 10G). Tais modificações permitiram estabelecer relações entre a estrutura e a atividade destes compostos e sugerir mudanças que podem ter influência sobre a atividade leishmanicida desta classe de moléculas.

Os valores calculados de LogP (cLogP) foram obtidos no programa Spartan 10 (Wavefunction) após otimização geométrica das moléculas utilizando um método semi-empírico de mecânica quântica (Austin Model 1 - AM1).

Como controle positivo de atividade leishmanicida foi utilizada a Anfotericina B (Sigma-Aldrich, Saint Louis). Para uso, os compostos e fármacos foram solubilizados a uma concentração de 50 mM em dimetilsulfóxido (DMSO – Merck, Hohenbrunn), mantidos a -20°C e utilizados no máximo até 48 horas após.

Figura 11 – Os ensaios de atividade antiparasitária e os critérios de progressão para os compostos ativos



3.4.1 Produção de Nanocápsulas Poliméricas Contendo G8 e G12

A preparação de nanocápsulas de G8 e G12 foi realizada pelo Doutorando Paulo Emílio Feuser, do Laboratório de Controle de Processos (LCP) da UFSC, utilizando o método de encapsulamento via polimerização em miniemulsão com auxílio da técnica de nanoprecipitação, desenvolvido e validado no próprio LCP (FEUSER, 2012). As nanocápsulas contendo os galatos foram suspensas em DMSO antes do seu uso. Nanocápsulas não carregadas foram utilizadas para comparação da atividade leishmanicida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE UM TESTE PARA DETECÇÃO DE AGENTES ATIVOS CONTRA AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

4.1.1 Expressão da β -galactosidase e seleção de clones dos parasitos transfectados

Após a transfecção com o plasmídeo contendo o gene de interesse e seleção da população transfectante com o antibiótico G418 (População LacZ), confirmamos a presença da enzima ativa nestes parasitos (Figura 12) através da incubação destes com o substrato CPRG.

A clivagem de CPRG no cromóforo vermelho de fenol é catalisada pela enzima β -galactosidase produzindo uma coloração vermelha que é detectável por espectrofotometria a 570 nm. Para melhorar o limite de detecção, lisamos células e parasitos com o detergente NP-40 no momento da adição da CPRG. Isto provoca a liberação da enzima ativa do meio intracelular, permitindo maior acesso ao substrato e leituras mais altas (EUSTICE, *et al.*, 1991).

Parasitos do gênero *Leishmania* possuem uma grande diversidade populacional interespecífica e inter cepas. Cepas são compostas por populações multiclonais de parasitos com grande heterogeneidade em diversos aspectos genéticos e fenotípicos como, por exemplo, a virulência e o tempo de crescimento *in vitro* e *in vivo* (MÉNDEZ, *et al.*, 2001; GARIN, *et al.*, 2011).

Quando genes repórter estão presentes em plasmídeos, o sinal produzido pelo produto de expressão pode depender do número de cópias do plasmídeo, que varia de célula para célula, e pode ocultar o efeito de um composto ativo (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). O isolamento de uma população clonal que reproduza o comportamento biológico da cepa original contribui para a obtenção de resultados mais homogêneos e reprodutíveis nos ensaios de inibição intracelular. Isto exclui variantes inerentes a heterogeneidade de expressão e virulência dos parasitos e possibilita a seleção de indivíduos com um nível adequado de expressão do gene de interesse.

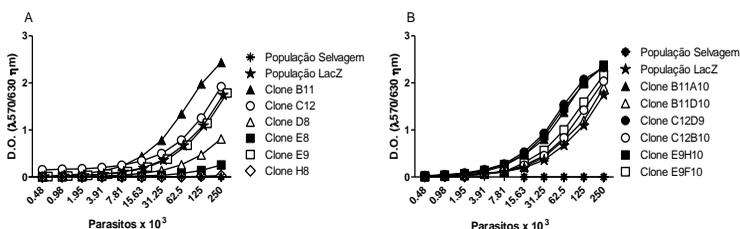
A partir da população LacZ foram isolados 10 clones (cerca de 16% do total semeado). Dentre estes, apenas 6 foram capazes de manter o crescimento na presença do antibiótico seletor G418. Estes seis clones foram avaliados quanto à expressão de β -gal (Figura 12A) plaqueando-se números conhecidos de promastigotas em placas de 96 poços e

comparado a expressão da enzima nestes em relação à população-LacZ (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni).

Verificamos que partir dos poços onde havia a presença de pelo menos 1.950 parasitos, os clones D8, E8 e H8 expressaram a enzima em quantidades significativamente inferiores a média da população-LacZ ($p < 0,05$), sendo que a partir de 3.910 parasitos a diferença detectável aumentou ($p < 0,001$).

Por outro lado, os clones C12 e E9 apresentaram níveis equivalentes de expressão em relação a população multiclonal ($p > 0,05$), enquanto que clone B11 obteve níveis mais altos a partir de 1.950 e 3.910 parasitos por poço ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente).

Figura 12 – Expressão da β -galactosidase em promastigotas



Expressão de β -gal nos clones isolados a partir da população LacZ (A) e subclones obtidos a partir dos clones selecionados (B). Os pontos representam a média \pm desvio padrão de um experimento em quadruplicata.

Visando assegurar uma população clonal homogênea, o procedimento de clonagem foi repetido para os três clones com nível de expressão mais alto: B11, C12 e E9. Desta forma, diversos subclones foram gerados e dois destes foram escolhidos aleatoriamente em cada grupo e comparados da mesma forma quanto à expressão da enzima (Figura 12B).

Os subclones B11D10 e C12B10 apresentaram atividade enzimática detectável mais elevada do que a população LacZ apenas a partir de 31.250 parasitos ($p < 0,01$), e o subclone C12B10 a partir de 15.630 parasitos ($p < 0,001$). Já os subclones B11A10, E9H10 e C12D9 tiveram atividade enzimática mais alta que a média de LacZ a partir de 3.910 parasitos ($p < 0,05$).

Para os subclones B11A10, E9H10 e C12D9, a atividade de β -gal pode ser detectada a partir de 1.950 parasitos/poço ($p < 0,001$). Considerando que níveis altos de expressão da proteína de interesse são

desejáveis por produzirem um sinal mais facilmente detectável e conseqüentemente melhorando a sensibilidade do teste, os testes subsequentes foram realizados majoritariamente com os subclones C12D9 ou B11A10.

Buckner e colaboradores (1996) transfectaram de forma integrativa as cepas Tulahuen e CL de *T. cruzi* com o gene LacZ utilizando o mesmo vetor empregado em nosso estudo para transfecção em *L. amazonensis*. No trabalho mencionado, os autores reportam que após a lise com NP-40, foi possível detectar até 500 tripomastigotas/poço, uma sensibilidade 3,9 vezes maior do que a encontrada no presente estudo. Entretanto, para *L. amazonensis* expressando a enzima β -lactamase, a sensibilidade reportada em um teste colorimétrico foi de 20.000 parasitos (BUCKNER; WILSON, 2005). Por outro lado, Roy e colaboradores (2000) utilizando *L. major* e *L. donovani* expressando o gene da luciferase demonstraram uma elevada sensibilidade do teste, onde foi possível detectar 10 parasitos/poço. Contudo, ensaios utilizando a luciferase dependem de rGAentes e equipamentos com custo elevado o que dificulta a sua utilização em larga escala na triagem de compostos que podem envolver centenas de milhares de testes (MANDAL, *et al.*, 2009; GUPTA; NISHI., 2011).

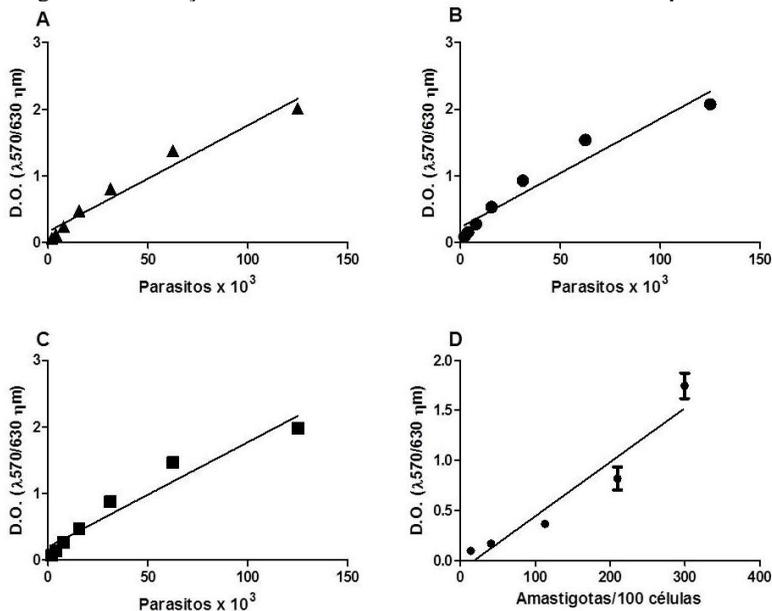
4.1.2 Linearidade da atividade da β -galactosidase

Novos procedimentos experimentais são desejáveis para melhorar a precisão, acurácia, reduzir o esforço técnico, melhorar a eficiência, tempo de execução ou custo do teste. Deve-se considerar, entretanto, que quando um novo método é proposto, a capacidade deste em reproduzir resultados de forma acurada quando comparado a um procedimento de referência é indispensável para a validação metodológica (LUMSDEN, 2000). Neste contexto, verificamos se a detecção da atividade de β -gal era capaz de reproduzir os resultados encontrados por metodologias clássicas de quantificação de parasitos *in vitro*.

A contagem visual e diluição seriada de promastigotas dos clones B11A10, C12D9 e E9H10 demonstraram uma relação linear com a absorbância medida a 570/630 nm no intervalo de 1.950 a 125.000 parasitos. Correlações positivas foram verificadas entre a absorbância e a contagem dos clones B11A10, C12D9 e E9H10 através de regressão linear ($r^2 = 0,9607, 0,9352$ e $0,9375$, respectivamente). Os resultados são mostrados na Figura 13 A, B e C. O coeficiente de variação máximo no

intervalo avaliado foi de 9,2%, nos poços com números menores de parasitos (1.950).

Figura 13 – Relação entre a atividade enzimática e o número de parasitos



Números conhecidos de promastigotas foram incubados com CPRG (vide item 3.1.4) ou células foram infectadas com proporções parasito:célula variáveis e submetidas ao teste colorimétrico (vide item 3.3.1) ou a contagem visual (item 3.3.2). Correlação entre a DO e o número de promastigotas para os clones (A) B11A10, (B) C12D9 e (C) E9H10. Correlação entre a DO e o número de amastigotas intracelulares para o clone C12D9 (D). Os pontos representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos em quadruplicata.

Okuno e colaboradores (2003), utilizando entre 200.000 e 1.200.000 promastigotas de *L. amazonensis* expressando β -gal demonstraram uma correlação positiva entre a contagem e a atividade da enzima ($r^2 = 0,9827$). Em nosso estudo, utilizando um número de parasitos que variou de 1.950 a 125.000 obtivemos um r^2 que variou de 0,9352 a 0,9607. Considerando que as correlações foram semelhantes, nosso teste demonstrou vantagens, visto que detecta um número 100 vezes menor de parasitos (até 1.950) sem perda considerável da linearidade.

Dada a aplicação destinada ao ensaio, este precisa necessariamente refletir com acurácia o número de amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos. Para verificar se o sinal produzido pelos parasitos transfectados mantinha-se detectável e linear mesmo na forma de amastigota intracelular, infectamos monocamadas de células THP-1 com promastigotas do clone C12D9 em diferentes proporções parasitos:célula (0,625 a 10:1).

Os resultados mostraram uma relação linear ($r^2=0,9101$) entre o número de parasitos intracelulares determinados por microscopia óptica e a atividade da enzima β -gal medida no teste colorimétrico (Figura 13D). No estudo de Okuno *et al* (2003) os autores descreveram uma sensibilidade do teste de até 350 amastigotas/100 células com um r^2 de 0,9652. No presente estudo foi possível detectar até 14 amastigotas/100 células, o que reflete em uma sensibilidade cerca de 25 vezes maior a reportada por Okuno e colaboradores (2003).

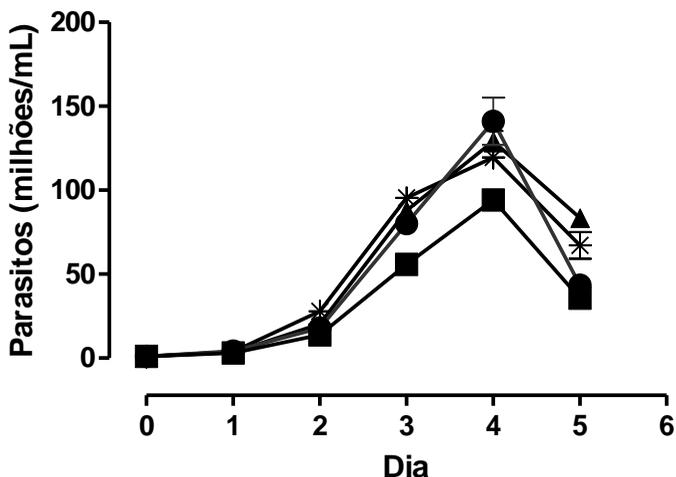
Estes resultados indicam que o método padronizado no presente estudo permite estimar de forma sensível e acurada o numero global de parasitos em células infectadas quando comparado aos métodos clássicos de quantificação.

4.1.3 A transfecção com o plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10 não alterou parâmetros biológicos da cepa

A transformação de parasitos pode ter conseqüências biológicas, pela alteração na estrutura genômica, no perfil de sensibilidade a antibióticos, ou simplesmente pela presença de um produto gênico estranho ao organismo em questão (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006; SERENO, *et al.*, 2007; GUPTA; NISHI., 2011). Sendo assim, avaliamos alguns parâmetros importantes da biologia de *L. amazonensis* que poderiam implicar diretamente na validade do nosso método.

Na Figura 14 estão plotadas as curvas de crescimento *in vitro* de promastigotas dos clones B11A10, C12D9 e E9H10 e da população selvagem de *L. amazonensis*.

Figura 14 - Curvas de crescimento da cepa selvagem e dos clones transfetados



Perfil de crescimento da população selvagem de *L. amazonensis* (*) e dos clones B11A10 (▲), C12D9 (●) e E9H10 (■) derivados da população LacZ. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos em duplicata

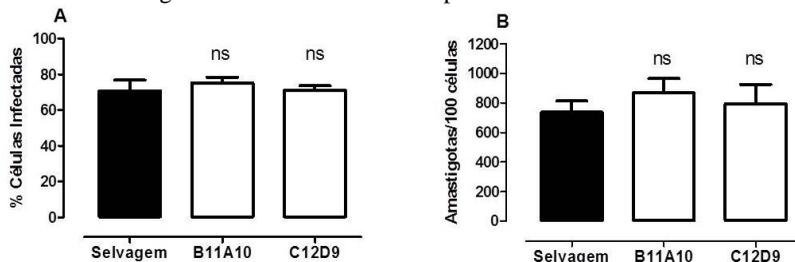
Observa-se um perfil de crescimento semelhante para os clones B11A10 e C12D9, porém o clone E9H10 parece multiplicar-se de forma um pouco mais lenta do que os demais. Devido ao crescimento mais lento, o clone E9H10 foi descartado dos estudos subsequentes.

Avaliamos também a habilidade dos clones B11A10 e C12D9 em infectar células THP-1, como uma medida de sua virulência (Figura 15). Nenhuma diferença significativa ($p > 0,05$; ANOVA de uma via) no percentual de células infectadas (Figura 15A) ou a carga parasitária, expressa como o número de amastigotas contados em 100 células aleatórias (Figura 15B) foi encontrada entre a cepa selvagem e os clones transformados.

Por fim, para verificar se os parasitos transfetados tiveram sua patogenicidade prejudicada, camundongos Balb/c foram infectados com os clones ou com a cepa selvagem e a evolução das lesões nas patas foram acompanhadas por 10 semanas (Figura 16D). Ao final da décima semana, nenhuma diferença pôde ser visualizada entre o tipo de lesão produzida por *L. amazonensis* selvagem ou pelos clones (Figura 16A, 17B e 17C). A medida semanal das lesões, expressa como aumento na espessura das patas infectadas, demonstrou que a progressão da doença

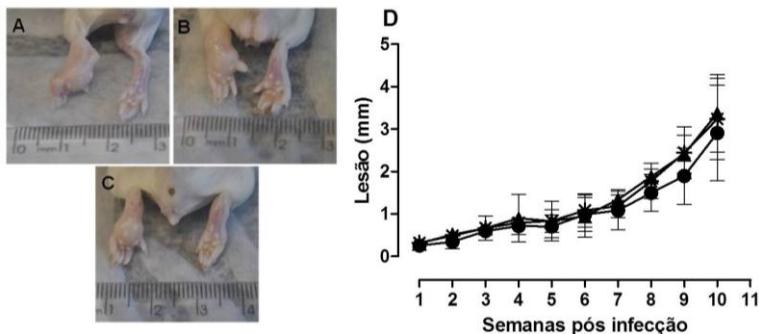
foi igual para todos os grupos durante todo o período de duração do experimento ($p > 0,05$; ANOVA de duas vias). A variação no peso corpóreo dos diferentes grupos de animais também não foi significativa no período analisado (dados não mostrados).

Figura 15 – Infectividade dos parasitos sobre células THP-1



Comparação da Infectividade para células THP-1 dos clones expressando β -gal em relação a população selvagem. (A) Percentual de células infectadas. (B) Carga Parasitária. As barras representam a média \pm desvio padrão de dois experimentos em quadruplicata. ns = $p > 0,05$; ANOVA de uma via.

Figura 16 – Edema de pata em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*



Fotografias representativas da lesão na pata esquerda produzida por (A) população selvagem, (B) clone B11A10, (C) clone C12D9 (C). Acompanhamento da progressão da lesão de pata em camundongos infectados com a população selvagem (*), clone B11A10 (▲) e C12D9 (●) (D). Os pontos representam a média \pm desvio padrão ($n = 3$ animais por grupo).

Tendo em conta o caráter policlonal das cepas de *Leishmania* spp, espera-se que existam variações inter individuais, mesmo em parasitos não modificados geneticamente (MÉNDEZ, *et al.*, 2001; GARIN, *et al.*, 2002; GARIN, *et al.*, 2011). Em nossas condições, a

única variável onde houve diferença entre os indivíduos foi o perfil de crescimento *in vitro* que, entretanto, foi mais acentuado somente para o clone E9H10. Méndez e colaboradores (2001) já haviam descrito diferenças neste parâmetro para clones isolados da cepa MCAN/ES/88/ISS44 de *L. infantum chagasi*. Não há, portanto, como definir se a diferença encontrada deve-se a introdução do gene repórter ou se é uma característica intrínseca deste clone. Não obstante, para reproduzir o comportamento típico da cepa original, apenas os clones com perfil mais semelhante ao selvagem foram utilizados para experimentos de triagem de compostos.

4.1.4 Estabilidade da transfecção com o plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10

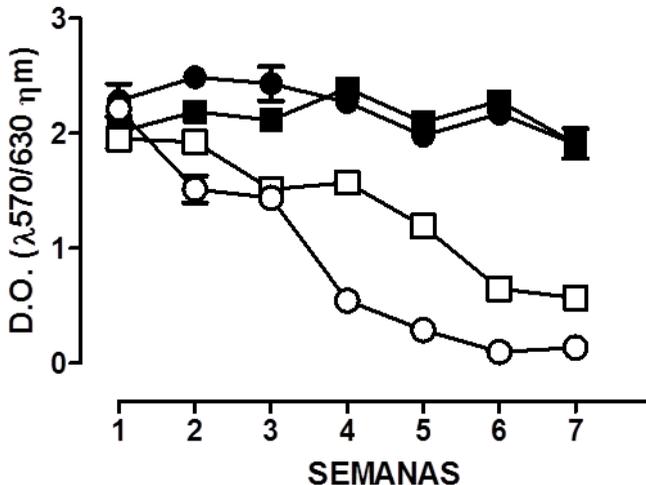
O uso de vetores para expressão episomal de genes repórter possui limitações como a heterogeneidade na expressão na população transfectada devida à ampla variação no número de cópias do plasmídeo por célula e a perda do plasmídeo na ausência de pressão seletiva para o marcador de resistência (MISSLITZ, *et al.*, 2000; BOLHASSANI, *et al.*, 2011). A heterogeneidade na expressão pode ser minimizada pela seleção de clones dos parasitos, conforme descrevemos acima.

Para estimar a estabilidade do plasmídeo, os clones B11A10 e C12D9 foram mantidos em ausência da pressão seletiva de G418 por sete semanas e a expressão da β -gal foi medida semanalmente (Figura 17).

A partir da segunda semana de cultivo sem G418 os parasitos já apresentaram uma redução significativa na atividade enzimática em relação a seus pares mantidos na presença da droga ($p < 0,001$; ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Tal diferença acentuou-se gradativamente ao longo do tempo de permanência sem a droga. Na sétima semana de avaliação a expressão de β -gal do clone B11A10 foi de 2% e a do clone C12D9 de 31% da atividade enzimática inicial.

Embora experimentos de *southern blotting* para verificar a integração do gene de interesse ao genoma do parasito não tenham sido realizados, é pouco provável que a integração tenha ocorrido, visto que o plasmídeo foi transfectado na forma circular e o comportamento de redução da atividade enzimática na ausência de G418 foi observado.

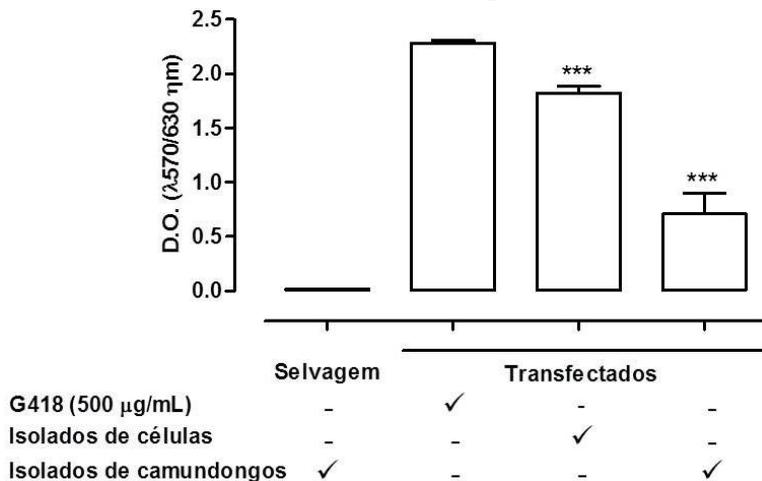
Figura 17 - Atividade da enzima β -gal em clones de *L. amazonensis* transfetados e mantidos na ausência de G418



Promastigotas dos clones B11A10 (círculos) e C12D9 (quadrados) foram mantidos na presença de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do antibiótico seletor G418 (símbolos fechados) ou na ausência de G418 (símbolos abertos) durante 7 semanas. Para os ensaios, os parasitos foram semeados em placas de 96 poços (10^4 parasitos/poço) e desenvolvidos com CPRG. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de um experimento em octuplicata.

Escolhemos então o clone C12D9 para avaliar a estabilidade do plasmídeo em parasitos intracelulares, ou seja, nas mesmas condições de um teste *in vitro* de atividade de compostos. Para isso, células THP-1 foram infectadas conforme o item 3.1.8, cultivadas durante uma semana e então rompidas conforme 3.1.9. Os amastigotas obtidos foram semeados em meio de Schneider (sem G418) para que se convertessem novamente a promastigotas, nos quais a atividade da β -gal foi avaliada (Figura 18).

Figura 18 – Atividade da β -gal no clone C12D9 após passagem em células e em camundongos



Promastigotas da cepa selvagem ou do clone C12D9, re-isolados de células THP-1 (após uma semana de infecção) ou de lesões de camundongos infectados (após dez semanas de infecção). As barras representam a absorvância média produzida por 10^4 parasitos/poço de um experimento realizado em octoplicata em placas de 96 poços. *** = $p < 0,001$; ANOVA de uma via seguido de Bonferroni.

Verificamos que os parasitos mantidos em células THP-1 durante uma semana ainda apresentavam 80% da atividade de β -gal em relação aqueles mantidos com G418 ($p < 0,001$). Como este tempo de permanência na condição intracelular é duas vezes maior que o tempo de um teste de atividade de compostos (item 3.3.1), a estabilidade deste clone é aceitável para esta finalidade.

Para investigar se a expressão permanece estável em um ambiente complexo de interação com o hospedeiro mamífero, parasitos foram recuperados de lesões de camundongos infectados com o clone C12D9 na décima semana pós infecção. Na Figura 18, mostramos que os parasitos mantidos *in vivo* por 10 semanas conservaram 31% da expressão de β -gal comparados com aqueles mantidos em cultura sob pressão constante de G418 ($p < 0,001$).

Geralmente epissemos circulares são instáveis na ausência de pressão seletiva, mas recombinantes estáveis são formados se os círculos se integram ao genoma (CLAYTON, 1999). A queda na expressão de genes repórter em *Leishmania* spp. com plasmídeos

epissomais após passagem *in vivo* ou na ausência de drogas seletoras é um fenômeno relatado com frequência (ROY, *et al.*, 2000; OKUNO, *et al.*, 2003; CHAN, *et al.*, 2003; ASHUTOSH; RAMESH; GOYAL, 2005).

Uma forma alternativa de superexpressão de um gene é a sua inserção no DNA genômico. O promotor do gene do RNA ribossomal de *Leishmania* tem sido usado com sucesso para expressão de proteínas repórter, pois permite a expressão constitutiva dos transgenes, mesmo na ausência de antibióticos seletores (KAYSEL-CRUZ, *et al.*, 2009). Entretanto, as leishmanias apresentam alta taxa de recombinação e plasticidade genômica, não garantindo também a característica estável sem seleção contínua (SQUINA, *et al.*, 2007). Esta alternativa é uma perspectiva para um trabalho futuro e está sendo estudada pelo nosso grupo para melhorar a estabilidade da expressão.

4.1.5 As células THP-1 possuem menor background de sinal para o teste de atividade da β -galactosidase

Leishmania spp. são parasitos intracelulares obrigatórios nos hospedeiros vertebrados, sendo que as células-alvo mais comuns são os macrófagos teciduais (CUNNINGHAM, 2002). Portanto, para que haja uma representação *bona fide* dos eventos de infecção e proliferação do parasito *in vivo*, um teste intracelular de atividade contra *Leishmania* spp. deve necessariamente empregar células fagocíticas.

Visto que a β -galactosidase é expressa de forma constitutiva por diferentes tipos celulares em mamíferos em quantidades facilmente detectáveis por técnicas histoquímicas (DIMRI, *et al.*, 1995), e que tanto fagócitos murinos quanto humanos possuem níveis elevados desta enzima (BURSUKER; RHODES; GOLDMAN, 1982), a seleção de uma linhagem celular fagocítica que apresente baixa atividade β -galactosidase é de central importância, visto que esta influenciará diretamente na linha de base (*background*) do teste e conseqüentemente no seu desempenho e sensibilidade.

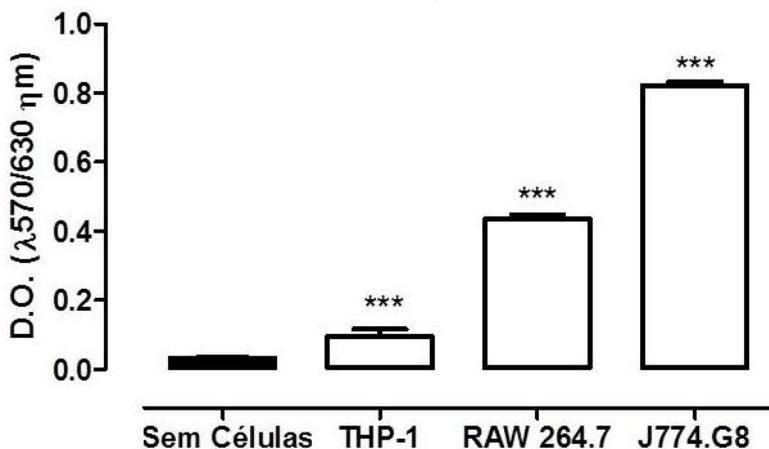
Em fato, a maior crítica ao uso de β -gal um repórter em testes de inibição contra parasitos intracelulares é o alto *background* produzido pelas células hospedeiras (GUPTA; NISHI, 2011; MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). Mesmo assim, OKUNO e colaboradores (2003) estabeleceram com sucesso uma linhagem de *L. amazonensis* expressando β -gal. No trabalho referido verificou-se uma correlação positiva entre o número de parasitos intracelulares e a atividade de β -gal, mas não demonstrou-se a sua aplicação na identificação de agentes

com atividade leishmanicida sobre amastigotas. Por outro lado, Buckner e Wilson (2005) relataram uma tentativa frustrada do uso desta enzima em um modelo amastigota-macrófago de triagem de compostos contra *Leishmania* spp, devido ao alto *background*. O emprego de uma linhagem celular proliferativa ao invés de uma cultura de células primárias, como no método clássico amastigota-macrófago murino torna o teste mais barato, rápido e reduz o uso de animais.

Para contornar este problema, testamos a atividade da enzima β -galactosidase em três linhagens celulares fagocíticas susceptíveis a infecção por *L. amazonensis*: THP-1, RAW 264.7 e J774.G8.

A Figura 19 demonstra que, conforme esperado, as três linhagens celulares testadas foram capazes de degradar CPRG em quantidade significativa em relação a um controle sem a presença de células ($p < 0,001$). Os macrófagos murinos J774.G8 apresentaram a maior atividade enzimática, seguido dos macrófagos RAW 264.7. Por outro lado, verificamos que as células THP-1 degradam o substrato CPRG com uma eficiência bem inferior a das demais linhagens testadas ($p < 0,001$), gerando um *background* consideravelmente menor e menos interferência na leitura do teste com parasitos transfectados, sendo escolhida para os experimentos subsequentes.

Figura 19 – Atividade da β -gal em células THP-1, RAW 264.7 e J774.G8 não infectadas



As células foram semeadas em placas de 96 poços (3×10^4 /poço), cultivadas por seis dias e desenvolvidas com CPRG. As colunas representam a média \pm desvio padrão de 2 experimentos realizados em octuplicata. *** = $p < 0,001$; ANOVA seguido de Bonferroni.

A identificação das células THP-1 como hospedeiras de baixa interferência contribui não apenas para o alto desempenho do teste proposto neste trabalho, mas também pode ser útil no aperfeiçoamento dos procedimentos de triagem de substâncias ativas contra outras espécies de parasitos transfectados com β -gal, como o método de Buckner e colaboradores (2005), preconizado por Romanha e colaboradores (2010), para *T. cruzi*, e o de McFadden *et al* (1997) para *Toxoplasma gondii*.

Essa linhagem celular cresce em cultura de forma não aderente, podendo ser induzida a diferenciação a um tipo celular aderente semelhante a macrófago através da incubação com ésteres de forbol (TSUCHIYA, *et al.*, 1982). Estes mimetizam os efeitos do diacilglicerol, o ativador fisiológico da proteína quinase C (PKC), envolvida na regulação da proliferação e diferenciação celular (PARKER, *et al.*, 1989).

Células THP-1 diferenciadas já são utilizadas há 20 anos, com sucesso, para triagem de agentes ativos contra *Leishmania* (GEBRE-HIWOT, *et al.*, 1992), sendo empregadas em trabalhos recentes de avaliação de grandes quimiotecas de compostos contra diferentes espécies de *Leishmania* spp, utilizando técnicas de HTS (SIQUEIRA-NETO, *et al.*, 2012; DE MUYLDER, *et al.*, 2011), o que as torna mais adequadas aos nossos propósitos.

As células THP-1 apresentam ainda a vantagem de serem pouco ou não proliferativas após a diferenciação (SCHWENDE, *et al.*, 1996). Linhagens proliferativas podem trazer problemas em testes de atividade anti-leishmania, visto que muitas vezes seu tempo de duplicação pode ser menor ou igual ao do parasito, ou células não infectadas podem crescer mais rapidamente do que as infectadas, levando a resultados de cargas parasitárias e percentuais de infecção erroneamente baixos.

4.1.6 Otimização do protocolo usado na triagem de compostos

O protocolo para o ensaio de triagem foi otimizado através de dados da literatura e experimentação de diferentes condições.

As células THP-1 foram as mais adequadas ao método proposto (vide 4.1.5). Sua diferenciação foi realizada cultivando-as com diferentes concentrações do Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) em diversos tempos de incubação. Um número de 3×10^4 células/poço foi adotado, pois permitiu a formação de uma monocamada confluyente e

homogênea, com poucas células sobrepostas, ao contrário da incubação com 4×10^4 células/poço.

O modelo de infecção adotado foi baseado no uso de promastigotas do clone C12D9 na fase exponencial tardia (4º dia de cultivo - Figura 14) para infecção de células THP-1 em placas de 96 poços. Nesta fase do crescimento em cultura há uma proporção maior de promastigotas metacíclicos, favorecendo a internalização do parasito e a obtenção de maiores taxas de infecção (LUZ, *et al.*, 2009). A incubação de 10 promastigotas/célula durante 3 horas, seguida de uma lavagem com PBS resultou em taxas de infecção superiores a 70% (Figura 15). Um período de 72 horas de incubação das células infectadas foi adotado por ser suficiente para que haja replicação intracelular dos parasitos (ANTOINE, *et al.*, 1990; MOREHEAD; COPPENS; ANDREWS, 2002).

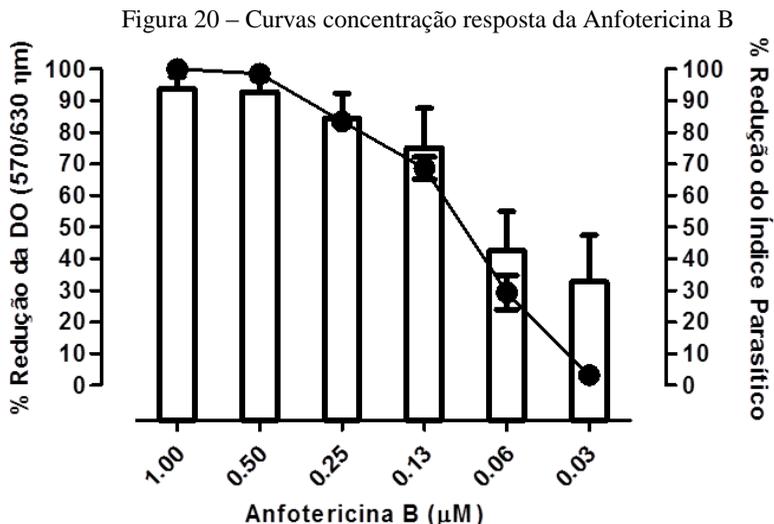
Okuno e colaboradores (2003) especularam que quantidades de β -gal ativa, oriundas dos parasitos intracelulares mortos poderiam ser secretadas no sobrenadante pelas células infectadas, levando a leituras falso positivas. Em experimentos preliminares (dados não mostrados) também observamos este fenômeno. Em virtude disso, ao final do tempo de incubação, substituímos o sobrenadante por uma solução de CPRG diluído em PBS detectando apenas a enzima presente no meio intracelular.

A incubação com substrato foi realizada por 16 horas, conforme descrito por Buckner e colaboradores (1996). Por tratar-se de um ensaio colorimétrico, é possível que alguns extratos, frações e compostos possam interferir na leitura por absorverem luz no mesmo comprimento de onda analisado. Para minimizar o impacto deste fator, utilizamos um “branco”, no qual monocamadas celulares não infectadas foram incubadas na presença de cada concentração do composto testado. A absorbância do branco é então subtraída daquela obtida nos poços contendo células infectadas.

4.1.7 Comparação do método colorimétrico com a contagem microscópica utilizando a anfotericina B

A validação farmacológica é um parâmetro importante para que um teste de atividade de compostos seja considerado adequado para utilização (SIQUEIRA-NETO, *et al.*, 2012). Para comprovar a eficiência da nossa metodologia, determinamos curvas concentração resposta do fármaco de referência Anfotericina B sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, comparando a detecção colorimétrica da atividade de β -

gal com a contagem visual do número de parasitos intracelulares em células THP-1 coradas pelo Giemsa (Figura 20).



Quantificação colorimétrica (□) e microscópica (●) da atividade do fármaco de referência Anfotericina B sobre *L. amazonensis* intracelular em células THP-1. Pontos ou barras representam a média \pm desvio padrão de no mínimo 2 experimentos em triplicata.

As CI_{50} foram de $0,07 \pm 0,02 \mu\text{M}$ e $0,09 \pm 0,01 \mu\text{M}$ para o teste colorimétrico e a contagem microscópica, respectivamente. Nota-se uma grande semelhança entre os valores obtidos pelos diferentes procedimentos, validando assim o método proposto.

Verificamos que em concentrações mais baixas do fármaco, ou seja, onde há um número maior de parasitos, a concordância entre os métodos foi menor. Uma possível explicação é que a acurácia no método visual seja prejudicada devido a dificuldade na quantificação precisa do número de amastigotas em células muito infectadas. Adicionalmente, a quantificação por este método é feita por amostragem, enquanto que o ensaio colorimétrico considera a totalidade dos parasitos.

Os estudos que contemplam uma análise mais apurada da reprodutibilidade dos métodos usados na triagem de fármacos contra *Leishmania* spp. não são numerosos. Contudo, a Tabela 3 mostra coeficientes de variação para a CI_{50} de Anfotericina B sobre amastigotas intracelulares de diversas espécies do parasito obtidos em diferentes

estudos para fins de comparação do desempenho do teste desenvolvido no presente estudo com os demais ensaios descritos na literatura.

Tabela 3 – Coeficientes de variação da CI_{50} de Anfotericina B sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania* spp. em diversos métodos de avaliação da atividade de compostos.

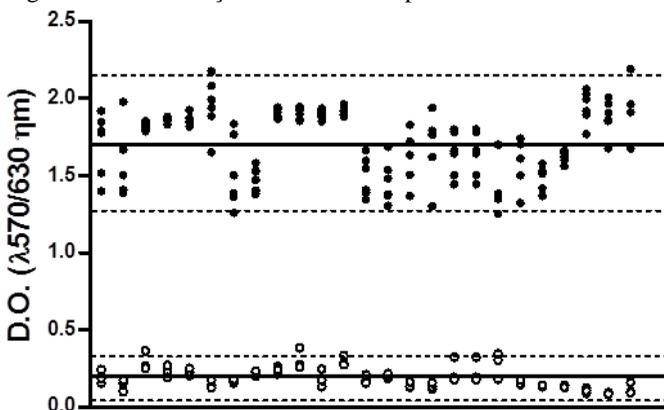
Espécie e/ou Cepa	Referência	Método	C.V. (%)
<i>L. amazonensis</i>	Presente estudo	Colorimétrico	29
<i>L. amazonensis</i>	Buckner; Wilson, 2005	Colorimétrico	9
<i>L. donovani</i>	Seifert; Croft, 2006	Contagem Visual	3
<i>L. donovani</i>	Mandal, <i>et al.</i> , 2009	Colorimétrico	1,5 a 100
<i>L. donovani</i>	Singh, <i>et al.</i> , 2009	Fluorimétrico	11 a 14
<i>L. donovani</i>	Siqueira-Neto, <i>et al.</i> , 2012	Contagem Automatizada	66
<i>L. infantum chagasi</i>	Lachaud, <i>et al.</i> , 2009	Luminométrico	11 a 41
<i>L. major</i>	Buckner; Wilson, 2005	Colorimétrico	10

C.V.= Coeficiente de Variação.

4.1.8 Indicadores da qualidade do teste

Para Zhang e colaboradores (1999), durante o processo de validação de um teste de triagem, é crucial realizar diversas placas de ensaios contendo controles positivos e negativos para calcular a reprodutibilidade e variação do sinal obtido nos dois extremos do intervalo. A diferença entre a média dos controles define o intervalo dinâmico do ensaio. Quanto mais ampla esta diferença e menor a variação dos controles, melhor é a capacidade do teste em discernir um verdadeiro composto ativo.

Figura 21 – Distribuição da densidade óptica média dos controles



Os pontos simbolizam a DO do controle negativo DMSO 1% (●) e do controle positivo Anfotericina B 1 μ M (○). Linhas sólidas representam a média dos respectivos controles e as tracejadas indicam 2 desvios padrão da média

A reprodutibilidade e robustez do nosso método, foram avaliadas utilizando-se os resultados dos controles de múltiplas placas realizadas por três diferentes operadores ao longo de três meses. A Figura 21 demonstra a distribuição dos resultados dos controles de qualidade deste período. A DO média foi de $1,71 \pm 0,22$ para o controle negativo (DMSO 1%) e $0,19 \pm 0,07$ para o controle positivo (Anfotericina B 1 μ M). Pode-se observar uma ampla banda de separação entre a média dos controles (intervalo dinâmico). Quanto a reprodutibilidade, o controle negativo apresentou CV intra-ensaio de 7,3% e inter-ensaios de 12,8%. Já para o controle positivo, obtivemos CV intra-ensaio de 17% e interensaio de 36,8%. A maior variação na densidade óptica do controle positivo é esperada, pois estando em uma faixa onde o sinal é baixo, diferenças absolutas mínimas são traduzidas em uma alta variação relativa.

O presente método foi desenvolvido para realização em pequena escala, embora sua natureza permita a automação de diversas etapas. O uso de pipetadores e incubadores robotizados possivelmente aumentaria o desempenho dos indicadores da qualidade demonstrados, a capacidade de triagem, a segurança da equipe (menos manipulação de agentes patogênicos) e redução da hora/homem despendida.

Um ensaio que detecta substâncias ativas contra o parasito em sua célula hospedeira é muito vantajoso como ferramenta de triagem primária, pois é capaz de identificar compostos que agem sobre os mais

variados alvos moleculares (MCFADDEN; SEEBER; BOOTHROYD, 1997), ao contrário da limitada prática comum de ensaios direcionados a um único alvo.

A transfecção de *L. amazonensis* com o plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10 não alterou parâmetros biológicos importantes neste parasito e permitiu o desenvolvimento de um ensaio colorimétrico de realização simples para identificação de compostos com atividade leishmanicida sobre amastigotas intracelulares, a forma clinicamente relevante para os hospedeiros mamíferos.

Deve-se considerar, contudo, que a detecção do parasito é feita indiretamente pela atividade da enzima. Isto suscita alguns problemas teóricos como a possibilidade de um composto testado ser um inibidor da β -gal, levando a interpretação errônea de que houve eliminação do parasito, ou contrariamente, a enzima poderia alterar o efeito de compostos. Tais possibilidades foram especuladas também por Buckner e colaboradores (1996) no trabalho que gerou um teste colorimétrico de atividade contra *T. cruzi* empregando β -gal. Parte da questão pode ser resolvida através da reavaliação dos compostos mais promissores pelo método clássico de coloração pelo Giemsa com parasitos não transfectados.

Demonstramos que o nosso teste é robusto e reprodutível, refletindo consistentemente resultados obtidos pelo método clássico de triagem de compostos, com a vantagem de ser muito mais rápido do que o subjetivo e enfadonho processo manual de contagem microscópica. O desempenho do ensaio colorimétrico foi comparável ao de outros ensaios similares atualmente em uso.

Uma vez que este teste pode ser adaptado para *high throughput screening*, ele abre a possibilidade para descoberta de novas classes de compostos para tratamento das leishmanioses.

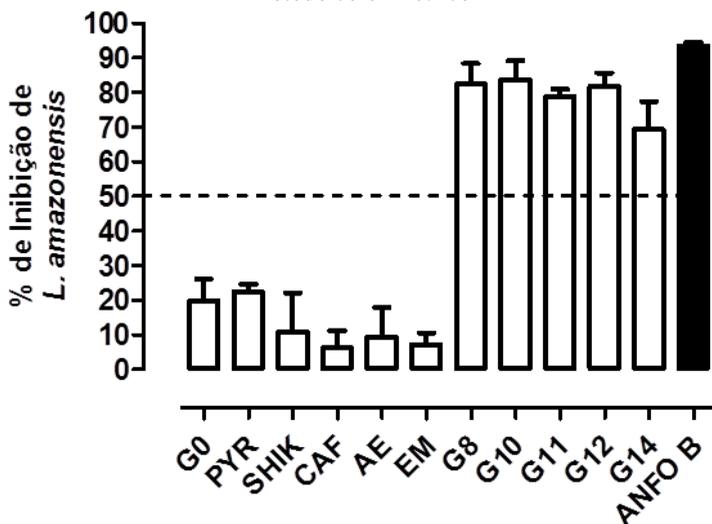
Considerando que o Laboratório de Protozoologia (MIP/CCB) da UFSC é integrante do Research Initiative on Natural Products against Neglected Diseases - ResNet NPD - (<http://www.unimuenster.de/Chemie.pb/forschen/ResNetNPND/index.html>), um grupo internacional e interdisciplinar que busca novos produtos naturais úteis contra doença de Chagas, doença do sono, leishmaniose e outras protozooses e que o teste pode ser adaptado para um método de HTS, abre-se a possibilidade para a triagem de produtos naturais, seus derivados ou compostos sintéticos em grande escala, possibilitando a descoberta de novas classes de compostos ativos contra *Leishmania* spp..

4.2 APLICAÇÃO DO TESTE COLORIMÉTRICO PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO ÁCIDO GÁLICO E ANÁLOGOS

4.2.1 Derivados ésteres do ácido gálico possuem atividade leishmanicida

Uma avaliação inicial da atividade leishmanicida do G0, seus análogos e seus ésteres de alquila (galatos de alquila – GA) foi realizada utilizando-se os compostos na concentração de 50 μ M.

Figura 22 – Atividade leishmanicida do ácido gálico, seus análogos e derivados ésteres sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* pelo método colorimétrico



As barras representam a média \pm desvio padrão de um experimento em triplicata. A linha tracejada indica 50% de inibição. Os compostos (barras brancas) foram testados a 50 μ M e a Anfotericina B (barra escura) a 1 μ M.

Na Figura 22 observamos que dos 11 compostos avaliados apenas 5 foram capazes de eliminar mais do que 50% dos parasitos. As taxas de inibição variaram de 6,3 a 83,6%. Interessantemente, os compostos que demonstraram maior atividade foram os GA, enquanto que o próprio G0 e seus análogos foram pouco ativos.

Para este grupo mais ativo, calculamos a CI₅₀ contra *L. amazonensis* e também a atividade citotóxica sobre células THP-1 não

infectadas (CC_{50}), com o objetivo de detectar um possível efeito tóxico inespecífico que afetasse igualmente os parasitos e as células.

Tabela 4 – Atividade dos GA sobre amastigotas de *L. amazonensis* expressando β -gal (método colorimétrico) e citotoxicidade dos compostos sobre células THP-1.

Composto	CC_{50} (μM) ^a	CI_{50} (μM) ^a	IS ^b
	THP-1	<i>L. amazonensis</i>	
G8	9,97±1,87	7,12±1,17	1,4
G10	8,63±1,78	3,6±0,36	2,4
G11	3,99±0,97	2,65±0,44	1,5
G12	4,18±1,15	0,52±0,24	8,0
G14	3,37±1,7	3,21±1,26	1,0
Anfotericina B	>10	0,07 ± 0.02	>142

^a Valores representam a média ± desvio padrão de no mínimo 3 experimentos realizados em triplicata.

^b Índice de Seletividade (CC_{50}/CI_{50})

Tabela 5 – Atividade dos GA contra amastigotas de *L. amazonensis* da cepa selvagem, determinados por contagem em microscópio óptico.

Composto	Percentual de Redução do Índice Parasitário ^a		
	10 μM	2 μM	0.4 μM
G8	32,3±4,4	30,5±3,7	15,5±4,1
G10	CTX	33,7±2,5	14,7±2,4
G11	CTX	68,7±6,1	19,7±0,6
G12	CTX	67±3,8	33,7±4,5
G14	CTX	35,6±2,8	3,5±0,7

^a Valores são a média ± desvio padrão de 2 experimentos realizados em triplicata.

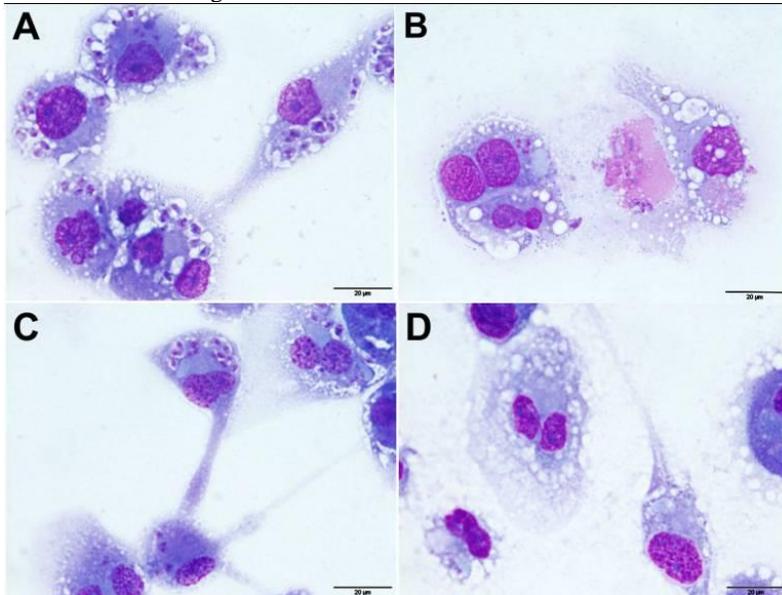
Anfotericina B 1 μM : 100% de inibição; CTX = citotóxico

Conforme mostrado na

Tabela 4, todos os GA testados foram novamente ativos, com CI_{50} variando entre 7,12 e 0,52 μM , sem, contudo, superar o fármaco de referência anfotericina B ($CI_{50} = 0,07 \mu\text{M}$). Para confirmação deste efeito leishmanicida, determinamos os percentuais de inibição dos GA sobre parasitos da cepa selvagem através do método de contagem por microscopia óptica, obtendo resultados semelhantes (Tabela 5). Neste último método, os compostos conservaram uma atividade ainda detectável na concentração de 0,4 μM , também com destaque para G12, que inibiu 33,7% do índice parasitário.

O composto mais potente e também mais seletivo foi o G12, com uma CI_{50} de $0,52 \mu\text{M}$. A Figura 23 mostra o efeito de G12 e permite a comparação visual da redução do número de parasitos intracelulares em relação a um controle tratado apenas com o solvente DMSO (1%) e o controle positivo Anfotericina B.

Figura 23 - Fotomicrografias representativas do efeito de G12 sobre amastigotas de *L. amazonensis* em células THP-1



Resultados representativos do efeito de G12 sobre amastigotas de *L. amazonensis* em células THP-1 cultivadas em *Chamber Slides* e coradas pelo Giemsa após 48 horas de incubação. (A) DMSO 1% - Controle Negativo; (B) G12 $2 \mu\text{M}$. (C) G12 $0,4 \mu\text{M}$ e (D) Anfotericina B $1 \mu\text{M}$ (Controle Positivo). As barras horizontais representam $20 \mu\text{m}$.

Nossos resultados mostram que somente os ésteres do ácido gálico foram ativos contra *L. amazonensis*. Estes resultados concordam com os estudos de Eger (2010), que avaliou estes compostos quanto a sua atividade inibitória sobre *T. cruzi*. Em seu trabalho a autora demonstrou que G0 não causou a morte de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* em células Vero e macrófagos murinos, embora os ésteres tenham obtido um desempenho proeminente tanto sobre a cepa Y (Sensível ao fármaco de referência benzonidazol) quanto sobre a cepa Colombiana (resistente). Este efeito não foi associado ao estímulo da

produção de óxido nítrico por células fagocíticas profissionais. O composto G12, neste caso, foi também o que demonstrou a maior atividade biológica dentre os membros da série.

É possível supor que o alvo para o mecanismo antiparasitário destes compostos é conservado pelo menos entre estas duas espécies de tripanossomatídeos e envolve uma ação direta sobre o patógeno. Este efeito, todavia, não é inteiramente seletivo para o parasito, pois a maioria dos GA inviabilizou igualmente células e amastigotas. A atividade citotóxica destes compostos, expressa na forma de CC_{50} , variou de 9,97 a 3,37 μM , gerando índices de seletividade nulos ou baixos (iguais ou próximos de 1). A exceção foi G12, que demonstrou uma seletividade 8 vezes maior para o parasito.

Considera-se que para ser promissora como leishmanicida, uma molécula precise ter $CI_{50} \leq 2 \mu\text{g/mL}$ e índice de seletividade ≥ 20 (NWAKA, *et al.*, 2009). Nestes termos, a CI_{50} de G8, que dentre os GA foi o menos potente, seria de aproximadamente 1,98 $\mu\text{g/mL}$ enquanto que a de G12 ficaria em 0,18 $\mu\text{g/mL}$. No entanto, a sua baixa seletividade torna-os pouco promissores. Contudo, dada a atividade potente demonstrada, a adoção de estratégias de direcionamento seletivo às células alvo (através de formulações farmacêuticas) seria uma alternativa válida para melhorar a sua seletividade.

4.2.2 Análise da relação da estrutura com a atividade leishmanicida

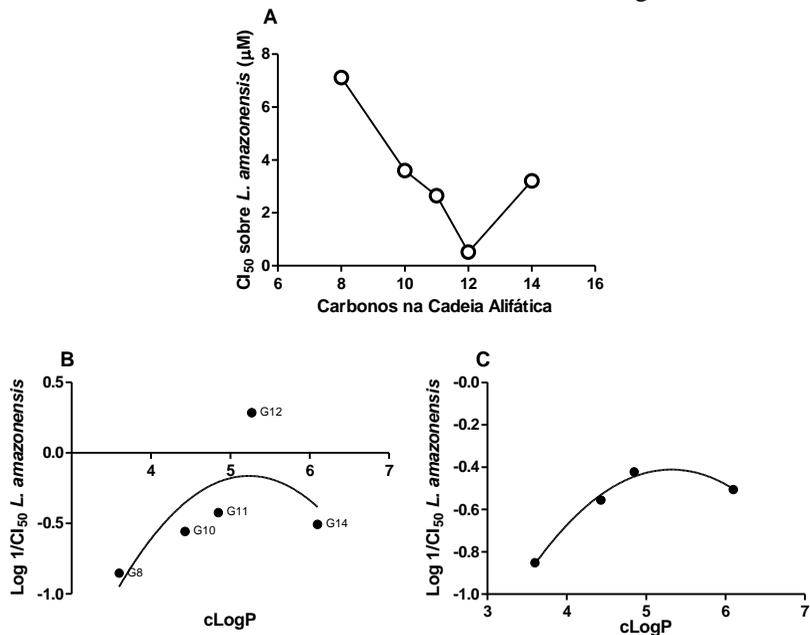
O conceito de relação entre a estrutura química e a atividade biológica de compostos já era conhecido há algum tempo, mas foi consolidado no estudo pioneiro de Unger e Hansch em 1973, o qual estabeleceu regras gerais para a elaboração e validação de modelos matemáticos para este fim.

Estudos visando estabelecer a relação entre variações na estrutura química e a atividade leishmanicida já foram realizados anteriormente pelo nosso grupo com algumas séries de chalconas (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, *et al.*, 2009; BELLO, *et al.*, 2011).

A relação mais clara entre a estrutura química dos compostos aqui testados e sua atividade biológica é que apenas aqueles esterificados com cadeias longas alifáticas na função ácida demonstraram efeito leishmanicida importante. Este efeito, curiosamente, ocorreu de forma quase dependente do aumento no número de carbonos da cadeia n-alquílica (Figura 24A). Verifica-se uma

CI₅₀ decrescente até 12 carbonos (efeito máximo), entretanto, um comprimento maior do que este comprometeu o efeito leishmanicida.

Figura 24 - Relação do comprimento da cadeia n-alquílica e cLogP com a atividade leishmanicida dos ésteres do ácido gálico



(A) Atividade leishmanicida como uma função do número de carbonos da cadeia alifática. (B) Atividade leishmanicida como uma função quadrática do cLogP e (C) Atividade leishmanicida frente ao cLogP com exclusão de G12.

Considerando que cadeias carbônicas lineares influenciam diretamente sobre as propriedades físico-químicas das moléculas, como a lipofilicidade (LEAL, *et al.*, 2009), verificamos se este descritor, expresso na forma do coeficiente de partição octanol-água calculado (cLogP) correlaciona-se com a atividade antiparasitária dos GA (Figura 24B). Conforme esperado, o perfil obtido nesta análise foi o mesmo visto quando do incremento no número de carbonos, ou seja, a atividade leishmanicida torna-se progressivamente mais pronunciada em decorrência do incremento na lipofilicidade. A linha que passa entre os pontos na Figura 24B refere-se a tendência de uma equação polinomial de segunda ordem e demonstra uma fraca correlação ($r^2=0,5584$) entre as variáveis cLogP (X) e Log 1/CI₅₀ (Y). Na Figura 24C, plotamos os

mesmos dados, excluindo G12. Com esta abordagem, o coeficiente de correlação subiu para 0,9891, explicando mais de 98% da atividade destes compostos como uma função polinomial de sua lipofilicidade.

É evidente que o ponto de G12 possui um forte desvio positivo na atividade, sugerindo que o seu mecanismo de ação não pode ser explicado pelo cLogP como seus pares. Abe e colaboradores (2000) ao avaliarem o efeito inibitório de GA sobre a esqualeno epoxidase recombinante, enzima envolvida na via metabólica de esteróis, observaram uma potente e seletiva inibição enzimática, principalmente do galato de dodecila ($CI_{50} = 0,061 \mu\text{M}$). Isto poderia ser um mecanismo adicional para G12, explicando sua maior atividade. Entretanto, é possível que simplesmente o seu cLogP (5,27) seja ótimo para interação com as macromoléculas alvo.

Ésteres do ácido gálico foram investigados quanto a sua atividade sobre diversas espécies de fungos (KUBO, *et al.*, 2002b; LEAL, *et al.*, 2009; HSU, *et al.*, 2009). Estes autores verificaram concentrações inibitórias mínimas decrescentes sobre *Saccharomyces cerevisiae*, de acordo com o número de carbonos na cadeia alifática para os hexila, heptila, octila e nonila, atingindo seu máximo com o galato de decila. Observou-se também que cadeias alifáticas maiores (11 ou 12 carbonos) ou muito curtas (1 ou nenhum carbono), tornavam os compostos inativos. Isso é conhecido como “Fenômeno de *cut-off*” (KUBO, *et al.*, 2002b). Leal *et al.* (2009) também demonstraram que os galatos contendo 6 a 9 carbonos na cadeia n-alquílica foram mais ativos contra *Microsporium gypseum* e que esta atividade decai consideravelmente quando o cLogP fica fora do intervalo compreendido entre 2,5 e 4,5.

Vários fármacos com atividade antifúngica possuem também propriedades leishmanicidas e tripanocidas devido a características comuns a estes microrganismos, especialmente quanto a composição dos lipídeos de membrana (ergosterol) e suas vias metabólicas de síntese (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). É razoável supor que dada a atividade fungicida, tripanocida e leishmanicida dos galatos, um mecanismo de ação em comum seja plausível.

Para explicar o efeito fungicida dos GA, HSU *et al.* (2009), baseados no mecanismo proposto para alcoóis alifáticos, sugeriram que a atividade deriva do rompimento de membranas como um surfactante não iônico, que penetra na bicamada lipídica pela cauda hidrofóbica, mas faz interações por ligações de hidrogênio com proteínas integrais da membrana. O incremento no tamanho da cadeia aumenta sua inserção na bicamada lipídica. Ao mesmo tempo, quando uma cadeia hidrofóbica maior do que aquela para a atividade máxima se dispersa na bicamada

lipídica, ocorre uma diminuição na interação por ligações de hidrogênio. Uma vez que o equilíbrio entre as porções hidrofílicas e hidrofóbicas dos galatos é destruído, a atividade biológica é perdida. As diferenças entre os valores de cLogP ótimos para atividade sobre fungos e *L. amazonensis* poderia ser explicada por composições levemente distintas em termos de fosfolipídios ou proteínas da membrana celular destas duas classes de microrganismos.

Ésteres do ácido gálico demonstraram um forte grau de afinidade com membranas artificiais e com a membrana celular de células CACO-2. A afinidade destes compostos com os fosfolipídios de membrana foi crescente, conforme o tamanho da cadeia alquílica, indicando diminuição da capacidade de penetrar monocamadas celulares pela maior retenção destas substâncias nas membranas lipídicas (TAMMELAA, *et al.*, 2004; SCHNEIDER, 2011).

O químico medicinal Christopher Lipinski e seus colaboradores analisaram as propriedades físico-químicas de mais de 2.000 fármacos e candidatos a fármacos em testes clínicos, concluindo que a probabilidade de um composto ser mais permeável em membranas biológicas e bem absorvido pelo corpo é maior se esse contemplar os seguintes critérios: (1) ter massa molecular menor do que 500 Da; (2) ter uma lipofilicidade, expressa como LogP, menor do que 5; (3) ter menos do que 5 grupos capazes de doar átomos de hidrogênio para ligações de hidrogênio e (4) ter menos do que 10 grupos que aceitam átomos de hidrogênio em ligações de hidrogênio. A simplicidade destes critérios fez com que se tornassem amplamente utilizados no campo da química medicinal para prever não apenas a absorção de compostos, mas também como um indicador geral das propriedades desejadas para um fármaco (*druglikeness*) (LIPINSKI, *et al.*, 2001).

Exceto G12 e G14, que possuem cLogP >5, nenhuma outra regra de Lipinski foi quebrada, indicando que estes compostos possuem propriedades físico-químicas desejáveis como fármacos

Isoladamente, o pirogalol, o ácido gálico e seus análogos não apresentaram efeito leishmanicida relevante, ao contrário do que foi reportado para *T. brucei* ou *L. donovani* por Koide *et al* (1998) e Tasdesmir *et. al.* (2006). Estas diferenças podem ser decorrentes dos trabalhos citados terem testado estes compostos sobre formas extracelulares dos parasitos, que no caso da *L. donovani* possuem um valor preditivo mais baixo do que as formas intracelulares avaliadas em nosso estudo.

Visto que a atividade antifúngica aparentemente é dependente também das porções pirogalol ou catecol presentes nos GA, a

investigação do papel destes grupamentos sobre a atividade antiparasitária poderia trazer mais informações quanto ao seu mecanismo de ação. Por exemplo, a avaliação do composto 3,4,5-trimetoxibenzoato de dodecila possibilitaria saber quais as implicações das metilações dos grupamentos hidroxila da porção pirogalol sobre a atividade leishmanicida do G12, pois tal mudança diminuiria as interações intermoleculares (composto-alvo) por ligações de hidrogênio.

4.2.3 Efeito leishmanicida de formulações nanoencapsuladas contendo galato de octila e galato de dodecila

A nanotecnologia envolve o estudo da matéria na ordem de 1 a 100 nm, valendo-se das propriedades físico-químicas únicas, como o tamanho ultra-pequeno, ampla razão superfície/massa, alta reatividade e interação com sistemas biológicos dos materiais nesta escala. Sua aplicação tem sido explorada pela área biomédica principalmente em sistemas de administração de medicamentos. (ZHANG, *et al.*, 2010).

No caso das leishmanioses, por serem doenças causadas por parasitos intracelulares obrigatórios, os sistemas de administração de fármacos podem ser direcionados para que os compostos atuem especificamente sobre as células hospedeiras do sistema retículo-endotelial, nominalmente, os macrófagos. Este direcionamento visa aumentar a atividade e diminuir a toxicidade, pois podem incrementar a biodisponibilidade, no meio intracelular e particularmente no vacúolo parasitóforo (BASU; LALA, 2009).

Em 2012, Feuser desenvolveu uma metodologia para a preparação de nanocápsulas de fármacos via polimerização em miniemulsão com auxílio de nanoprecipitação. Esta técnica foi empregada com sucesso para aumentar significativamente a atividade fotobiológica da Ftalocianina de Zinco (ZnPC) sobre células A459 (carcinoma de pulmão). Neste estudo, 5 µg/poço do composto reduziu a viabilidade celular em 50%, enquanto que a mesma concentração da forma nanoencapsulada reduziu esta viabilidade em 78%.

Como uma alternativa para melhorar a atividade e seletividade de nossos compostos, escolhemos esta metodologia para preparação de uma formulação contendo nanocápsulas poliméricas de metacrilato de metila (PMMA) carregadas com G8 e G12 (que dentre os GA possuem respectivamente a menor e maior atividade contra *L. amazonensis*), gerando G8-PMMA e G12-PMMA. Formulações de G0 e análogos não foram possíveis, pois estas moléculas são muito polares, comprometendo a eficiência do processo de nanoencapsulamento.

Na Tabela 6, observa-se que a preparação nanoencapsulada de G8 apresentou uma CI_{50} de 2,43 μM sobre *L. amazonensis* e uma CC_{50} de 9,64 μM sobre células THP-1. Para efeito de comparação, na Figura 25 estes indicadores foram plotados ao lado daqueles observados para o composto em sua forma livre.

Tabela 6 – Atividade Leishmanicida (CI_{50}), Citotóxica (CC_{50}) e Índices de Seletividade (IS) dos compostos G8 e G12 nanoencapsulados.

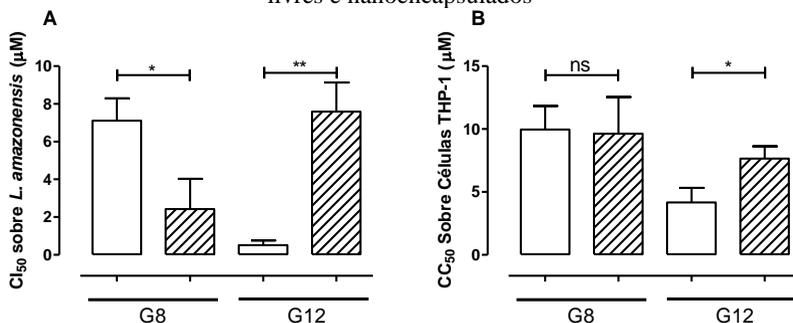
Composto	CI_{50} (μM) ^a	CC_{50} (μM) ^a	IS ^b
	<i>L. amazonensis</i>	THP-1	
G8-PPMA	2,43 \pm 1,59	9,64 \pm 2,91	3,97
G12-PMMA	7,60 \pm 1,54	7,64 \pm 0,98	1
ANFO-B	0,07 \pm 0,02	>10	>142

^a Valores representam a média \pm desvio padrão de no mínimo 3 experimentos realizados em triplicata. ^b Índice de Seletividade (CC_{50}/CI_{50}). Nanocápsulas não carregadas não inibiram *L. amazonensis* intracelular ou o crescimento de células THP-1 até 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Esta comparação revela que G8-PMMA possui 4 vezes a atividade leishmanicida do composto livre, sem alterar o efeito citotóxico sobre células THP-1, o que elevou o seu índice de seletividade de 1,4 para 3,97.

Com este mesmo propósito, diferentes nanopartículas poliméricas na forma de nanoesferas ou nanocápsulas foram propostas para uso como carreador de fármacos direcionados a macrófagos devido ao seu longo tempo de circulação no organismo e rápida remoção do plasma pelo sistema fagocítico mononuclear (KREUTER, 1991). Muitas destas foram também exploradas para aumentar a efetividade ou diminuir a toxicidade da pentamidina (PAUL, *et al.*, 1998), Anfotericina B (ESPUELAS, *et al.*, 2002), da Bacopasaponina C isolada de *Bacopa monniera* (SINHA, *et al.*, 2002) ou do composto sintético 14-desoxi-11-oxoandrografolideo (LALA, *et al.*, 2003).

Figura 25 – Efeito leishmanicida e citotóxico dos compostos G8 e G12 livres e nanoencapsulados



Comparação de (A) CI₅₀ sobre *L. amazonensis* e (B) CC₅₀ sobre células THP-1 para G8 e G12 livres (barras brancas) ou carregados em nanocápsulas poliméricas de metilmetacrilato (Barras hachuradas). As barras representam a média ± desvio padrão de pelo menos dois experimentos realizados em triplicata. ns: não significativo, *: p<0,05, **:p<0,01; Teste t não pareado.

Embora experimentos de internalização não tenham sido realizados, acreditamos que este efeito seja devido, pelo menos em parte, a um aumento na concentração intracelular de G8 nas células infectadas. Nossa hipótese é corroborada pelo fato das nanocápsulas G8-PMMA possuírem uma carga negativa (potencial Zeta de -32 mV) (FEUSER, 2012: comunicação pessoal), visto que mecanismos ainda desconhecidos fazem com que macrófagos reconheçam e internalizem partículas carregadas. A atribuição de carga a nanopartículas é uma estratégia amplamente utilizada para direcionamento de fármacos a células fagocíticas (KUNJACHAN, *et al.*, 2012).

Por outro lado, G12-PMMA foi menos ativo do que o seu equivalente livre G12 e também menos citotóxico (Tabela 6 e Figura 25), indicando uma perda geral da atividade biológica. Embora mais experimentos precisem ser realizados para compreender este fato, dados preliminares da análise do espectro U.V. sugerem que o fármaco pode ter sofrido alguma forma de degradação durante o processo de nanoencapsulamento, acarretando a perda de atividade. Estes mesmos dados preliminares sugerem que tanto G8 quanto G12 foram encapsulados com uma eficiência de aproximadamente 87,5% (FEUSER, 2012: comunicação pessoal). Os compostos G8 e G12 já foram encapsulados anteriormente em nanopartículas lipídicas sólidas para avaliação de seu potencial como antitumoral, sendo que não se

observaram diferenças entre a preparação livre e a nanoencapsulada (CORDOVA, 2011).

As nanocápsulas de PMMA são muito promissoras para o direcionamento de fármacos às células fagocíticas e melhoria da atividade e seletividade de compostos. Nosso grupo está investigando o efeito do nanoencapsulamento de diaminas lipofílicas *N*-tetradecil-1,4-butanodiamina e a *N*-decil-1,6-hexanodiamina, duas moléculas com elevada atividade leishmanicida e tripanocida respectivamente (YAMANAKA, 2012) no modelo experimental *in vivo*. Além disso, técnicas de nanoencapsulamento conjunto de fármacos já bem estabelecidos no tratamento destas parasitoses poderão contribuir para novas alternativas de opção terapêutica.

5 CONCLUSÕES

- Produzimos clones de *L. amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase;
- A expressão da enzima não afetou os parâmetros biológicos analisados para o clone C12D9 de *L. amazonensis*;
- Padronizamos e validamos um ensaio colorimétrico reprodutível e de baixo custo para triagem de compostos contra *L. amazonensis*;
- Os galatos de alquila mostraram atividade leishmanicida intracelular;
- A atividade dos galatos foi dependente do tamanho da cadeia alquílica e do cLogP, exceto para o galato de dodecila, que parece ter mecanismos leishmanicidas adicionais;
- A formulação de nanocápsulas de PMMA contendo galato de octila melhorou a sua atividade leishmanicida e seletividade para o parasito, entretanto, o mesmo procedimento causou a diminuição do efeito biológico do galato de dodecila.

6 PERSPECTIVAS

- Os resultados do presente trabalho permitirão a implementação de um método de triagem de compostos em larga escala e a identificação mais rápida de novas moléculas com atividade antiparasitária;
- A transfecção integrativa do gene da β -gal em *L. braziliensis* e *L. chagasi* permitirá a avaliar a atividade leishmanicida de forma mais abrangente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBINO, D. B. L. **Avaliação da atividade tripanocida de compostos fenólicos**. 2005, 74f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2005.

ALVAR, J. et al. The Relationship between Leishmaniasis and AIDS: the Second 10 Years. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 21, n. 2, p. 334-359, 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.** v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. **Eur. J. Med. Chem.** v. 44, p. 755-763, 2009.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v. 31, n. 2, p. 109-118, 2012.

ANTOINE, J. C. et al. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. **Infect. Immun.** v. 3, n. 58, p. 779-787, 1990.

ASHUTOSH, S. G.; RAMESH, S. S.; GOYAL, N. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in *in vitro* drug screening. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 49, n. 9, p. 3776-3783, 2005.

ASHUTOSH.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **J. Med. Microbiol.** v. 56, n. 2, p. 143-156, 2007.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J. Med. Res.** v. 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

- BAILEY, H.; BISHOP, W. J. Leishman-Donovan bodies and donovaniasis. **Brit. J.Vener. Dis.** v. 35, n. 8, p. 8-9, 1959.
- BALANÑA-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Gen. Pharmac.** v. 30, n. 4, p. 435-443, 1998.
- BARI, A. U. Chronology of cutaneous leishmaniasis: An overview of the history of the disease. **J. Pakist. Assoc. Dermatol.** v. 16, n. 1, p. 24-27, 2006.
- BARRETT, M. P.; MOTTRAM, J. C.; COOMBS, G. H. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. **Trends Microbiol.** v. 7, n. 2, p. 82-88, 1999.
- BASU, M. K.; LALA, S. Macrophage specific drug delivery in experimental leishmaniasis. **Cur. Mol. Med.** v. 4, n. 6, p. 681-689, 2009.
- BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure-activity relationship (SAR). **Bioorg. Med. Chem.** v. 19, n. 16, p. 5046-5052, 2011.
- BLEICHER, K. H. et al. A guide to drug discovery: hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nature Rev. Drug Disc.** v. 2, n. 5, p. 369-378, 2003.
- BOLHASSANI, A. et al. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for *in vitro* and *in vivo* studies. **Exp. Parasitol.** v. 127, n. 3, p. 637-645, 2011.
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996.
- BUCKNER, F. S.; WILSON, A. J. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 72, n. 5, p. 600-605, 2005.

BURSUKER, I.; RHODES, J. M.; GOLDMAN, R. Beta-galactosidase-an indicator of the maturational stage of mouse and human mononuclear phagocytes. **J. Cell. Physiol.** v. 112, n. 3, p. 385-390, 1982.

CHAN, M. M. et al. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. **Parasitol. Res.** v. 89, n. 4, p. 266-271, 2003.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.** v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHANG, K. P. Human cutaneous leishmania in a mouse macrophage line: propagation and isolation of intracellular parasites. **Science.** v. 209, n. 4462, p. 1240-1242, 1980.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis what are the needs for diagnosis treatment and control. **Nat. Rev. Microb.** v. 5, n. 11, p. 873-882, 2007.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug Des. Devel. Ther.** v. 5, p. 175-181, 2011.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. Drug targets in leishmania. **J. Parasit. Dis.** v. 34, n. 1, p. 1-13, 2010.

CLAYTON, C. E. Genetic manipulation of kinetoplastida. **Parasitol. Today.** v. 15, n. 9, p. 372-378, 1999.

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.** v. 2, n. 2, p. 124-126, 2010.

COHEN, J.; DIBNER, M. S.; WILSON, A. Development of and access to products for neglected diseases. **PLoS ONE.** v. 5, n. 5, p. e10610, 2010.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in leishmania: from arginine to trypanothione. **Amino Acids.** v. 40, n. 2, p. 269-285, 2011.

CORDOVA, C. A. S. **Avaliação da toxicidade e da atividade antitumoral de derivados n-alkil ésteres do ácido gálico, livres ou encapsulados em nanopartículas lipídicas sólidas, para o estudo do melanoma in Vitro e in Vivo.** 2011, 188 f. Tese (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2011.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia.** v. 75, n. 1, p. 3-17, 2005.

COX, F. E. G. History of human parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15, n. 4, p. 595–612, 2002.

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

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Trans.Royal Soc.Trop. Med. Hygiene.** v. 100, n. S1, p. S4-S8, 2006.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S. L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharmac. Design.** v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002.

CROWTHER, G. J. et al. Identification of attractive drug targets in neglected disease pathogens using an in silico approach. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 4, n. 8, p. e804, 2010.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Exp. Mol. Pathol.** v. 72, n. 2, p. 132-141., 2002.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJE, K. Paromomycin. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 103, n. 7, p. 653-660, 2009.

DAVIS, A. J.; MURRAY, H. W.; HANDMAN., E. Drugs against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. **Trends Parasitol.** v. 20, n. 2, p. 73-76, 2004.

DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. Sterol biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, 2009.

DE MUYLDER, G. et al. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.

DIAS, L.C. et al. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009

DIMRI, G. P. et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 92, n. 20, p. 9363-9367, 1995.

DIVE/SC. Informativo Epidemiológico "Barriga Verde". **Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Secretaria de Estado da Saúde - Governo de Santa Catarina** Disponível em:
<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/informativo_epidemiologico/Informativo_Epidemiologico_2007-01.pdf>. Acessado em: 05/Julho/2011.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends Parasitol.** v. 25, n. 9, p. 432-439, 2009.

EGER, I. **Potencial quimioterapêutico de diferentes derivados do ácido gálico para o tratamento da infecção pelo *trypanosoma cruzi*: avaliação *in vitro* e *in vivo*.** 2010, 127 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2010.

ESPUELAS, M. S. et al. In vitro antileishmanial activity of amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. **J. Drug. Target.** v. 10, n. 8, p. 593-599, 2002.

EUSTICE, D. C. et al. A sensitive method for the detection of beta-galactosidase in transfected mammalian cells. **Biotechniques**. v. 11, n. 6, p. 739-740, 1991.

EVANS, D. A. *In Vitro* Cultivation and Biological Cloning of Leishmania. In: HYDE, J. E. **Methods in Molecular Biology**: Protocols in Molecular Parasitology. Totowa: Humana Press, v. 21, 1993. Cap. 3, p. 29-41.

FEUSER, P. **Encapsulamento simultâneo de nanopartículas magnéticas (NPMS) com ftalocianina de zinco (ZNPC) via polimerização em miniemulsão**. 2012, 125 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2012.

FUMAROLA, L.; SPINELLI, R.; BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res. Microb.** v. 155, n. 4, p. 224-230, 2004.

GARCÍA-MELGARES, M. L.; DE LA CUADRA, J.; MARTÍN, B. L. C. M. L. A. V. Sensitization to gallates: review of 46 cases. **Actas Dermosifiliogr.** v. 98, n. 10, p. 688-693, 2007.

GARIN, Y. J. et al. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infect. Immun.** v. 69, n. 12, p. 7365-7373, 2011.

GARIN, Y. J.-F. et al. Microplate method for obtaining leishmania clonal populations. **J. Parasitol.** v. 88, n. 4, p. 803-804, 2002.

GEBRE-HIWOT, A. et al. An *in vitro* model for screening antileishmanial drugs: the human leukaemia monocyte cell line, THP-1. **Acta Trop.** v. 51, n. 3-4, p. 237-245, 1992.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in

Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Trop.** v. 74, n. 1, p. 89-93, 2000.

GUNCKEL, S. et al. Antioxidant activity of gallates: an electrochemical study in aqueous media. **Chem. Biol. Interact.** v. 114, n. 1-2, p. 45-59, 1998.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **Indian J. Med. Res.** n. 133, p. 27-39, 2011.

HA, T. J.. N. K.; KUBO, I. Lipoygenase inhibitory activity of octyl gallate. **J. Agric. Food Chem.** v. 52, n. 10, p. 3177-3181, 2004.

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

HAUSEN, B. M.; BEYER, W. The sensitizing capacity of the antioxidants propyl, octyl, and dodecyl gallate and some related gallic acid esters. **Contact Dermatitis.** v. 26, n. 4, p. 253-258, 1992.

HERWALDT, L. B. Leishmaniasis. **Lancet.** v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HODGSON, J. M. et al. Phenolic acid metabolites as biomarkers for tea- and coffee-derived polyphenol exposure in human subjects. **Br. J. Nutr.** v. 91, n. 2, p. 301-306, 2004.

HOGAN, S. et al. Antioxidant properties and bioactive components of Norton (*Vitis aestivalis*) and Cabernet Franc (*Vitis vinifera*) wine grapes. **LWT Food Sci. Tech.** v. 42, n. 7, p. 1269-1274, 2009.

HSU, F. et al. Effects of alkyl chain length of gallates on their antifungal property and potency as an environmentally benign preservative against wood-decay fungi. **Int. J. Biodet. Biodegrad.** v. 63, n. 5, p. 543-547, 2009.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 9, n. 8, p. 604-615, 2011.

KAYSEL-CRUZ, A. et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. **Cur. Drug Targ.** v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: prevention, parasite detection and treatment. **Cur. Med. Chem.** v. 19, n. 10, p. 1443-1474, 2012.

KOIDE, T. et al. Trypanocidal effects of gallic acid and related compounds. **Planta Med.** v. 64, n. 1, p. 27-30, 1998.

KRATZ, J. M. **Estudo do mecanismo da ação anti-herética do ácido gálico e do galato de pentila.** 2007 - 80 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2007.

KRATZ, J. M. et al. Anti-HSV-1 and anti-HIV-1 activity of gallic acid and pentyl gallate. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 103, n. 5, p. 437-442, 2008.

KREUTER, J. Liposomes and nanoparticles as vehicles for antibiotics. **Infection.** v. 19, n. S4, p. S224-S228, 1991.

KUBO, I. et al. Antioxidant activity of dodecyl gallate. **J. Agric. Food. Chem.** v. 50, n. 12, p. 3533-3539, 2002a.

KUBO, I. et al. Molecular Design of Antifungal Agents. **J. Agric. Food Chem.** v. 50, n. 14, p. 3992-3998, 2002b.

KUBO, I. et al. Non-antibiotic antibacterial activity of dodecyl gallate.. **Bioorg. Med. Chem.** v. 11, n. 4, p. 573-580, 2003.

KUBO, I. et al. Antibacterial activity of alkyl gallates against *Bacillus subtilis*. **J. Agric. Food. Chem.** v. 52, n. 5, p. 1072-1076, 2004.

KUBO, I.; FUJITA, K.; NIHEI, K. Anti-Salmonella activity of alkyl gallates. **J. Agric. Food. Chem.** v. 50, n. 23, p. 6692-6696, 2002.

KUBO, I.; XIAO, P.; FUJITA, K. Anti-MRSA activity of alkyl gallates. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 12, n. 2, p. 113-116, 2002.

- KUNJACHAN, S. et al. Physicochemical and biological aspects of macrophage-mediated drug targeting in anti-microbial therapy. **Fund. Clin. Pharmacol.** v. 26, n. 1, p. 63-71, 2012.
- LACHAUD, L. et al. Parasite susceptibility to amphotericin B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients coinfectd with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. **Clin. Infect. Dis.** v. 48, n. 2, p. 16-22, 2009.
- LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Rev. Pan-Amaz. Saude.** v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.
- LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005.
- LALA, S. et al. Delivery *in vivo* of 14-deoxy-11-oxoandrographolide, an antileishmanial agent, by different drug carriers. **Indian. J. Biochem. Biophys.** v. 40, n. 3, p. 169-174, 2003.
- LEAL, P. C. et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorg. Med. Chem. Letters.** v. 19, n. 6, p. 1793-1796, 2009.
- LETELIER, M. E. et al. *Trypanosoma cruzi*: a possible control of transfusion-induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. **Exp. Parasitol.** v. 71, n. 4, p. 357-363, 1990.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Adv. Drug Deliv. Rev.** v. 1, n. 46, p. 3-26, 2001.
- LOCATELLI, C. et al. Ester derivatives of gallic acid with potential toxicity toward L1210 leukemia cells. **Bioorg. Med. Chem.** v. 16, n. 7, p. 3791-3799, 2008.
- LOCATELLI, C. et al. Gallic acid ester derivatives induce apoptosis and cell adhesion inhibition in melanoma cells: The relationship between

free radical generation, glutathione depletion and cell death. **Chem. Biol. Interact.** v. 181, n. 2, p. 175-184, 2009.

LOCATELLI, C. et al. Antimetastatic activity and low systemic toxicity of tetradecyl gallate in a preclinical melanoma mouse model. **Invest. New Drugs.** v. 30, n. 3, p. 870-879, 2012.

LOOSDRECHT, A. A. et al. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **J. Immunol. Methods.** v. 141, p. 15-22, 1991.

LUMSDEN, J. H. Laboratory test method validation. **Revue. Méd. Vét.** v. 151, n. 7, p. 623-630, 2000.

LUZ, R. I. et al. *In vitro* sensitivity testing of leishmania clinical field isolates: preconditioning of promastigotes enhances infectivity for macrophage host cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 53, n. 12, p. 5197-5203, 2009.

MAGARIÑOS, M. P. et al. TDR Targets: a chemogenomics resource for neglected diseases. **Nucleic Acids Res.** v. 40, n. Database Issue, p. D1118-D1127, 2012.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S. et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cad. Saúde Pública.** v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MANDAL, S. et al. High-throughput screening of amastigotes of *Leishmania donovani* clinical isolates against drugs using a colorimetric β -lactamase assay. **Indian. J. Exp. Biol.** v. 47, n. 6, p. 475-479, 2009.

MARLOW, M. A. et al. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. **Plos One** v.8, n. 2, p. e56177

MASUOKA, N.; NIHEI, K.; KUBO, I. Xanthine oxidase inhibitory activity of alkyl gallates. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 50, n. 8, p. 725-731, 2006.

- MCFADDEN, D. C.; SEEBER, F.; BOOTHROYD, J. C. Use of *Toxoplasma gondii* expressing beta-galactosidase for colorimetric assessment of drug activity in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 41, n. 9, p. 1849-1853, 1997.
- MÉNDEZ, S. et al. Correlation between in vitro and in vivo infectivity of *Leishmania infantum* clones. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 48, n. 6, p. 616-621, 2001.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel. Med. Infect. Dis.** v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007.
- MISSLITZ, A. et al. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania* amastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 107, n. 2, p. 251-261, 2000.
- MONTE-ALEGRE, A.; OUAISSI, A.; SERENO, D. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. **Kinetoplastid Biol. Dis.** v. 5, n. 6, 2006.
- MOREHEAD, J.; COPPENS, I.; ANDREWS, N. W. Opsonization modulates rac-1 activation during cell entry by *Leishmania amazonensis*. **Infect. Immun.** v. 70, n. 8, p. 4571-4580, 2002.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.
- NOSE, M. et al. Formation of reactive oxygen intermediates might be involved in the trypanocidal activity of gallic acid. **Biol. Pharm. Bull.** v. 21, n. 6, p. 583-587, 1998.
- NWAKA, S. et al. Advancing drug innovation for neglected diseases - criteria for lead progression. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 3, n. 8, p. e440, 2009.
- NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 5, n. 11, p. 941-955, 2006.
- OKUNO, T. et al. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Exp. Anim.** v. 52, n. 2, p. 109-118, 2003.

- OLIVEIRA, C. C. G. et al. Changing epidemiology of American cutaneous leishmaniasis (ACL) in Brazil: a disease of the urban–rural interface. **Acta Tropica**. v. 90, n. 2, p. 155-162, 2004.
- OSÓRIO Y FORTEA, J. et al. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**. v. 219, n. 1, p. 66-74, 2007.
- OW, Y. Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr. Drug. Metab.** v. 4, n. 3, p. 241-248, 2003.
- PARKER, P. J. et al. Protein kinase C--a family affair. **Mol. Cell. Endocrinol.** v. 65, n. 1-2, p. 1-11, 1989.
- PAUL, M. et al. Physicochemical characteristics of pentamidine-loaded polymethacrylate nanoparticles: implication in the intracellular drug release in *Leishmania major* infected mice. **J. Drug Target.** v. 5, n. 6, p. 481-490, 1998.
- PAVLI, A.; MALTEZOU, H. C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **Int. J. Infect. Dis.** v. 14, n. 12, p. e1032-9, 2010.
- PESCHER, P. et al. Quantitative proteome profiling informs on phenotypic traits that adapt *Leishmania donovani* for axenic and intracellular proliferation. **Cell. Microbiol.** v. 13, n. 7, p. 978–991, 2011.
- READY, P. D. Leishmaniasis emergence in Europe. **Euro Surveill.** v. 15, n. 10, p. Disponível em: <
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19505>>. Acessado em: 27/06/2011, 2010.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** v. 7, n. 9, p. 581-596, 2007.
- RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 14, n. 4, p. 447-455, 2010.

- ROCHETTE, A. et al. Whole-genome comparative RNA expression profiling of axenic and intracellular amastigote forms of *Leishmania infantum*. **Molec.Bioch. Parasitol.** v. 165, n. 1, p. 32-47, 2009.
- ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 105, p. 233-238, 2010.
- ROSSO, R. et al. Relationship between the lipophilicity of gallic acid *n*-alkyl esters' derivatives and both myeloperoxidase activity and HOCl scavenging. **Bioorg. Med. Chem.** v. 14, n. 18, p. 6409-6413, 2006.
- ROY, G. et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 110, n. 2, p. 195-206, 2000.
- SALEM, M. M.; WERBOVETZ, K. A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. **Curr. Med. Chem.** v. 13, n. 21, p. 2571-2598, 2006.
- SAVI, L. A. et al. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetic alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung.** v. 55, n. 1, p. 66-75, 2005.
- SCHMIDT, A.; KRAUTH-SIEGEL, L. R. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. **Curr. Top. Med. Chem.** v. 2, n. 11, p. 1239-1259., 2002.
- SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Curr. Med. Chem.** v. 19, n. 14, p. 2128-2175, 2012a.
- SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part II. **Curr. Med. Chem.** v. 19, n. 14, p. 2176-2228, 2012b.
- SCHNEIDER, N. F. Z. **Padronização do ensaio PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeation Assay) e Avaliação *in vitro* da permeabilidade intestinal e cutânea de compostos de origem natural**

e sintética. 2011, 132 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2011.

SCHWENDE, H. et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J. Leukoc. Biol.** v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In Vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n. 1, p. 173-179, 2006.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Intern.** v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; LEMESRE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Trop.** v. 74, n. 1, p. 25-31, 2000.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian. J. Exp. Biol.** v. 47, n. 6, p. 412-423, 2010.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 89, n. 3, p. 471-478, 1994.

SHUKLA, A. K. et al. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Appl. Biochem. Biotechnol.** v. 160, n. 8, p. 2208-2218, 2010.

SHYAM SUNDAR, J. C. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. **J. Global Infect. Dis.** v. 2, n. 2, p. 159-166, 2010.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50 - values and cell survival.. **Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.** v. 33, n. 11, p. 813-823., 1995.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hygiene.** v. 100, n. S1, p. S17-S20, 2006.

SINGH, N. et al. Transgenic *Leishmania donovani* clinical isolates expressing green fluorescent protein constitutively for rapid and reliable ex vivo drug screening. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 64, n. 2, p. 370-374, 2009.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac. J. Trop. Med.** v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SINHA, J. et al. Bacopasaponin C: critical evaluation of anti-leishmanial properties in various delivery modes. **Drug. Deliv.** v. 9, n. 1, p. 55-62, 2002.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 4, n. 5, p. e675, 2010.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular *Leishmania donovani* amastigotes in human macrophages. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 6, p. e1671, 2012.

SQUINA, F. M. et al. Shuttle mutagenesis and targeted disruption of a telomere-located essential gene of *Leishmania*. **Parasitology.** v. 134, n. 4, p. 511-522, 2007.

STAUCH, A. et al. Treatment of visceral leishmaniasis: model-based analyses on the spread of antimony-resistant *L. donovani* in Bihar, India. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 12, p. e1973, 2012.

TAMMELAA, P. et al. Permeability characteristics and membrane affinity of flavonoids and alkyl gallates in Caco-2 cells and in phospholipid vesicles. **Arch. Bioch. Biophysics.** v. 425, n. 2, p. 193-199, 2004.

TASDEMIR, D. et al. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *in vitro*, *in vivo*, structure-activity

relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 50, n. 4, p. 1352-1364, 2006.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Altered sterol profile induced in *Leishmania amazonensis* by a natural dihydroxymethoxylated chalcone. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 63, n. 3, p. 469-472, 2009.

TROUILLER, P. et al. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet.** v. 359, n. 9324, p. 2188–2194, 2002.

TSUCHIYA, S. et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). **Int. J. Cancer.** v. 26, n. 2, p. 171-176, 1980.

TSUCHIYA, S. et al. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. **Cancer Res.** v. 42, n. 4, p. 1530-1536, 1982.

UNGER, S. H.; HANSCH, C. Model building in structure-activity relations. Reexamination of adrenergic blocking activity of beta-halo-beta-arylalkylamines. **J. Med. Chem.** v. 16, n. 7, p. 745-749, 1973.

URBINA, J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology.** v. 114, n. S1, p. S91-S99, 1997.

VAN DER HEIJDEN, C. A.; JANSSEN, P. J. C. M.; STRIK, J. J. T. W. A. Toxicology of gallates: a review and evaluation. **Food. Chem. Toxicol.** v. 24, n. 10, p. 1067-1070, 1986.

WERNECK, G. L. et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol. Infect.** v. 135, n. 2, p. 195-201, 2007.

WHO. **Control of the leishmaniases.** Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization. 2010.

WILLIAMS, R. A. et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.** v. 61, n. 3, p. 655–674, 2006.

WILLYARD, C. Neglected diseases see few new drugs despite upped investment. **Nat. Med.** v. 19, n. 2, 2013.

YAMANAKA, C. N. **Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida, tripanocida de derivados de diaminas.** 2012, 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) - Universidade Federal de Santa Catarina: Florianópolis, 2012.

YOSHINO, M. et al. Prooxidant action of gallic acid compounds: copper-dependent strand breaks and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA. **Toxicol. In Vitro.** v. 16, n. 6, p. 705-709, 2002.

ZHANG, J. H.; CHUNG, T. D.; OLDENBURG, K. R. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. **J. Biomol. Screen.** v. 4, n. 2, p. 67-73, 1999.

ZHANG, L. et al. Development of nanoparticles for antimicrobial drug delivery. **Cur. Med. Chem.** v. 17, n. 6, p. 585-594, 2010.

ZIJLSTRA, E. E. et al. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infect. Dis.** v. 3, n. 2, p. 87-98, 2003.