

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

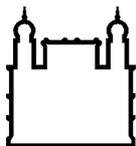
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOB DOMINGOS INÁCIO FILHO

Estudo do efeito da EGCG *in vitro* e *in vivo*, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*

RIO DE JANEIRO

2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOB DOMINGOS INÁCIO FILHO

Estudo do efeito da EGCG *in vitro* e *in vivo*, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

RIO DE JANEIRO

2018

Inácio Filho, Job Domingos.

Estudo do efeito da epigalocatequina-3-galato in vitro e in vivo, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum* / Job Domingos Inácio Filho. - Rio de Janeiro, 2018.

119 f.; il.

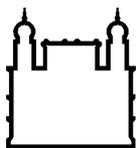
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Quimioterapia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Epigalocatequina-3-galato. 4. Tripanotona redutase. 5. Docking. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JOB DOMINGOS INÁCIO FILHO

Estudo do efeito da EGCG *in vitro* e *in vivo*, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

EXAMINADORES:

- Prof^ª. Dr^ª.** Kátia da Silva Calabrese (IOC/FIOCRUZ) - **Presidente**
Prof. Dr. Carlos Roberto Alves (IOC/FIOCRUZ)
Prof^ª. Dr^ª. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva (UERJ)
Prof. Dr. José Procópio Moreno Senna (BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ)
Prof. Dr^ª. Tânia Zaverucha do Valle (IOC/FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 27 de Abril de 2018

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese à minha esposa, meus pais, meus familiares e aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder o dom da vida e por me sustentar durante essa longa jornada.

Quero agradecer a minha esposa Amanda. Ela que me deu o apoio e suporte, principalmente na reta final, para que eu concluísse essa etapa na minha vida. Por muitas vezes teve que me aturar chato, de mau humor, estressado... Fora as “semanas de viúva de marido vivo”, as vezes que foi dormir sozinha porque eu estava virando noites estudando. Lamento pelas bagunças, pelas coisas fora do lugar, pelas garrafas vazias na geladeira, por diversas vezes não podermos ver um filme juntos porque eu não tinha tempo... Saiba que eu me importo com você e tudo o que passamos serviu para nos tornar mais fortes e unidos. Do fundo da minha alma, eu te amo!

Aos meus pais... ah meus pais!! Gratidão é pouco. Devo a vocês a minha vida. Agradeço as incessantes orações da minha mãe, pelas madrugadas a fora na qual ela se ajoelhava e intercedia pelo futuro do seu filho. Deus tem me sustentado através do seu clamor. Ao meu pai, que literalmente deu o suor e sangue para me incentivar a realizar o meu sonho. Desde novo eu sempre optei pela carreira da ciência. E lembro que o senhor comprava diversas revistas e me “obrigava” a não só ler, como fazer um resumo das reportagens. No auge dos meus 10 anos me recordo que dentre a Veja, Época e outras revistas estava a Scientific American. Eu não entendia muito bem as reportagens, mas esse foi meu primeiro contato com o meio científico. Me deslumbrei, me apaixonei e hoje estou concluindo uma etapa em minha vida resultante da mosquinha azul que o senhor me permitiu conhecer. Espero algum dia ser metade do homem que o senhor é. Amo vocês!

Quero expressar a minha gratidão à Larissa Diniz, ops, Siqueira, por me indicar para uma vaga no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatoque? Foi essa oportunidade que me colocou aqui dentro e me ajudou a realizar parte do meu sonho. Mesmo eu dizendo que você não é mais Fiocruz, no fundo – beeeemmm lá no fundo – você é sim. À minha grande amiga Dra. Viviane dos Santos, ops, Faiões. Pela longa trajetória de mais de 10 anos de amizade. Pelas alegrias e tristezas que compartilhamos durante esse tempo. Ainda temos muito pela frente e o nosso esforço será recompensado.

Ao meu orientador Elmo. Muito obrigado por me aceitar como aluno e por me desafiar, e ser desafiado, a crescer como pessoa, como homem, como cidadão,

como cientista, como pesquisador... Desculpe-me pelas vezes que eu lhe proporcionei um mini infarto. Eu juro, não foi minha intenção.

Aproveito esse momento para expressar a minha gratidão a Dra. Leonor. Primeiro, porque ela foi a minha primeira orientadora no LBqT. Ela que me aceitou em seu laboratório para eu iniciar a minha trajetória. Segundo porque foi ela quem comprou o primeiro frasco de EGCG para que o Dr. Elmo pudesse dar início a sua linha de pesquisa de produtos naturais como agentes terapêuticos para as leishmanioses. Muito obrigado por acreditar no potencial do meu orientador, por abrir as portas do seu laboratório e por ser um exemplo de idoneidade a ser seguido.

MYYYYYSSSSSSSSSS!!!!!!!!!!!!!! Dona da minha tese, razão do meu diploma!! Myslene, obrigado pelo seu suporte em bancada. Pelas vezes que você insistiu em sair tarde do laboratório mesmo quando eu te implorava pra ir pra casa porque já estava tarde. Obrigado pela oportunidade que me proporcionou de aprender com você. E te agradeço também por tornar o meu coração mais forte por ter te aturado durante parte dessa jornada. Eu quero aproveitar para deixar registrado que a pós-graduação permitisse dupla autoria no diploma de doutorado, porque essa menina trabalhou muito!!! Não foi à toa que ganhou o prêmio RAIC Fiocruz e está concorrendo na etapa nacional do Prêmio Destaque na Iniciação Científica. Meu orgulho!!

Ao Yago, Gabi e Thaís agradeço pela amizade, pelo café, pelo ranço nosso de cada dia, pelos conselhos, pelas longas conversas entre os experimentos, pelo suporte, pelo apoio, pelos risos, pelas lágrimas, pelas discussões, pelo companheirismo, pelas caronas, por tudo! Vocês me ajudaram a suportar essa caminhada de 4 anos e fizeram o meu caminho mais suave e leve. Vocês são demais!!!

Aos demais amigos do LBqT. Muito obrigado pela agradável convivência ao longo dos meus quase 10 anos de Fiocruz. Tive a oportunidade de aprender muito com vocês e carrego um pedaço de cada um dentro de mim. Vocês foram essenciais para a minha formação acadêmica e formação do meu caráter.

Aos colaboradores que, com muita paciência, me ensinaram novas técnicas e me proporcionaram um novo horizonte de aprendizado. Em especial ao Dr. Gabriel Limaverde. Muito obrigado por, com muita paciência, me auxiliar nos estudos de *docking*.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular por fornecer-me toda a infraestrutura necessária para o meu crescimento e para

desenvolver a minha pesquisa. Muito obrigado aos professores com quem tive o grande prazer de aprender sobre a minha profissão.

A todos vocês, o meu muito obrigado!

*“O princípio da sabedoria é: Adquire a sabedoria; sim,
com tudo o que possuis, adquire o entendimento.”*

Provérbios 4:7.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende
o que ensina.”*

Cora Coralina

x

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Estudo do efeito da EGCG *in vitro* e *in vivo*, suas associações e mecanismo molecular de ação em *Leishmania infantum*

RESUMO TESE DE DOUTORADO

Job Domingos Inácio Filho

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas presentes em 98 países e são responsáveis pelo acometimento de 1,6 milhão de novos casos por ano, podendo levar a aproximadamente 60 mil óbitos. Essas doenças são causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania* as quais podem apresentar diversas manifestações clínicas que vão desde o acometimento da pele, podendo acometer as mucosas, até a forma clínica mais grave que é a leishmaniose visceral na qual o indivíduo vem a óbito caso não receba o diagnóstico e tratamento adequados. Nesse contexto, o tratamento atual para as leishmanioses tem se baseado nos antimoniais pentavalentes. Outras alternativas compõem a segunda escolha, como a anfotericina B e a pentamidina, e em alguns países a miltefosina tem sido utilizada como primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. De um modo geral, esses fármacos apresentam elevada toxicidade, alto custo no tratamento além de já serem descritos isolados clínicos com fenótipo de resistência aos tratamentos atuais. Dessa forma, a busca por novos compostos que atuem em vias seletivas desses parasitos vem sendo estudada além da associação de novos compostos com os já utilizados na clínica. O flavonoide EGCG é o principal catequina do chá verde e vem demonstrando resultados promissores em diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmanioses. Parte do seu mecanismo de ação envolve o acúmulo nos níveis de ROS, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e conseqüentemente a morte do parasito. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* da EGCG em *Leishmania infantum*, estudar sua interação com os fármacos utilizados na clínica para as leishmanioses, bem como demonstrar a participação da tripanotona redutase (TR) como parte do mecanismo molecular de ação e a avaliação *in vivo*. A EGCG demonstrou atividade antipromastigota com um IC₅₀ de 162,0µM. O estudo da associação com miltefosina ou anfotericina B em promastigotas revelou uma interação aditiva. Já o mecanismo de ação envolve o aumento nos níveis de H₂O₂ decorrente da inibição da TR, desencadeando uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial e subsequente diminuição nos níveis de ATP intracelular, levando a morte do parasito. Nossos resultados em amastigota intracelular revelaram um IC₅₀ de 3,8µM com uma inibição de 90% na concentração de 24µM. O estudo *in vivo* confirmou o alto potencial da EGCG que administrado com 12,5mg/kg por via oral por apenas 5 dias duas vezes ao dia reduziu em 92% a carga parasitária no fígado de camundongos infectados. Sendo assim, nossos dados revelam-se promissores como uma possível alternativa para o tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: leishmanioses, quimioterapia, *Leishmania infantum*, EGCG, tripanotona redutase.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Study of the effect of EGCG *in vitro* and *in vivo*, its associations and molecular mechanism of action in *Leishmania infantum*

ABSTRACT DOCTORAL THESIS

Job Domingos Inácio Filho

Leishmaniasis are neglected tropical diseases present in 98 countries and is responsible for the emergence of 1.6 million new cases per year, which can lead to approximately 60 thousand deaths. These diseases are caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, which present several clinical manifestations that range from the involvement of the skin affecting the mucous membranes, to the most severe clinical form visceral leishmaniasis, which the individual comes to death if do not receive the proper diagnosis and treatment. In this context, current treatment for leishmaniasis has been based on pentavalent antimonials, and in some countries miltefosine has been used as the first choice for the treatment of leishmaniasis. Other alternatives make up the second choice, such as amphotericin B and pentamidine. In general, these drugs present high toxicity, high cost in treatment, and clinical isolates with resistance phenotype to current treatments have already been described. Thus, the search for new compounds that act in selective pathways of these parasites have been studied in addition to the association of new compounds with those already used in the clinic. The flavonoid EGCG is the main catechin of green tea and has shown promising results in different *in vitro* and *in vivo* models of leishmaniasis. Part of its mechanism of action involves accumulation in ROS levels, decrease of mitochondrial membrane potential and consequently death of the parasite. Thus, the objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of EGCG on *L. infantum*, its interaction with the drugs used in the treatment for leishmaniasis, as well as to demonstrate the participation of TR as part of the molecular mechanism of action and its evaluation *in vivo*. EGCG demonstrated antipromastigote activity with an IC₅₀ of 162.0µM. The study of the association with miltefosine or amphotericin B in promastigotes revealed an additive interaction. On the other hand, the mechanism of action involves an increase in H₂O₂ levels due to the inhibition of TR, triggering a decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent decrease in intracellular ATP levels, leading to death of the parasite. Our results on intracellular amastigote revealed an IC₅₀ of 3.8µM with a 90% inhibition at 24µM concentration. The *in vivo* study confirmed the high potential of EGCG administered with 12.5mg/kg orally for only 5 days twice a day reduced the parasite load in the liver of infected mice by 92%. Thus, our data are promising as a viable alternative for leishmaniasis treatment.

Key words: leishmaniasis, chemotherapy, *Leishmania infantum*, EGCG, trypanothione reductase.

SUMÁRIO

1.	Introdução	1
1.1.	Doenças Tropicais Negligenciadas.....	2
1.2.	Leishmanioses	3
1.3.	Vetores das leishmanioses	7
1.4	Parasito <i>Leishmania</i>	8
1.5	Ciclo biológico.....	9
1.6	Manifestações clínicas das leishmanioses	11
1.6.1	Leishmaniose cutânea localizada	11
1.6.2	Leishmaniose recidiva cútis	12
1.6.3	Leishmaniose disseminada	12
1.6.4	Leishmaniose mucocutânea	13
1.6.5	Leishmaniose cutâneo-difusa	13
1.6.6	Leishmaniose dérmica pós-calazar	14
1.6.7	Leishmaniose visceral	14
1.7	Quimioterapia para as leishmanioses	15
1.7.1	Antimoniais pentavalentes	15
1.7.2	Anfotericina B	16
1.7.3	Pentamidina.....	17
1.7.4	Miltefosina.. ..	19
1.7.5	Paromomicina.....	19
1.8	Pesquisa e desenvolvimento de fármacos.....	20
1.9	Terapia combinada	21
1.10	Produtos naturais aplicados para as leishmanioses	22
1.10.1	Flavonoides	23
1.11	Tripanotiona redutase e o balanço redox.....	25
2.	Objetivos	30
2.1	Objetivo geral.....	31

2.2	Objetivos específicos	31
3.	Material e métodos	32
3.1	Fármacos.....	33
3.2	Parasitas.....	33
3.3	Animais.....	33
3.4	Ensaio <i>in vitro</i>	33
3.4.1	Atividade antipromastigota	33
3.4.2	Terapia combinada	34
3.4.3	Atividade antiamastigota.....	34
3.5	Mecanismo de ação.....	35
3.5.1	Dosagem de H ₂ O ₂	35
3.5.2	Determinação do potencial de membrana mitocondrial.....	35
3.5.3	Avaliação nos níveis de ATP intracelular.....	36
3.5.4	Inibição da tripanotiona redutase.....	36
3.6	Ensaio <i>in vivo</i>	37
4.	Resultados	39
4.1	Ensaio <i>in vitro</i>	40
4.1.1	Atividade antipromastigota	40
4.1.2	Terapia combinada	42
4.2	Estudo do mecanismo de ação.....	47
4.2.1	Dosagem de H ₂ O ₂	47
4.2.2	Determinação do potencial de membrana mitocondrial.....	49
4.2.3	Determinação dos níveis de ATP intracelular	50
4.2.4	Inibição da tripanotiona redutase.....	51
4.3	Efeito terapêutico da EGCG	63
4.3.1	Atividade antiamastigota.....	63
4.3.2	Atividade <i>in vivo</i>	64
5.	Discussão	66

6.	Conclusão	80
7.	Bibliografia	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 - Distribuição da leishmaniose tegumentar ao redor do mundo.	3
Figura 1.2 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo.	4
Figura 1.3 - Número de casos de LT registrados entre 1998 e 2015	4
Figura 1.4 - Número de casos de LV registrados entre 1998 e 2015	5
Figura 1.5 - Notificações de LV no Brasil em 2015.	6
Figura 1.6 - Vetores das leishmanioses	7
Figura 1.7 – Morfologia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	8
Figura 1.8 – Taxonomistas do gênero <i>Leishmania</i>	9
Figura 1.9 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	10
Figura 1.10 - Leishmaniose cutânea localizada	12
Figura 1.11 - Leishmaniose recidiva cútis	12
Figura 1.12 - Leishmaniose disseminada	13
Figura 1.13 - Leishmaniose mucocutânea	13
Figura 1.14 - Leishmaniose cutâneo-difusa	14
Figura 1.15 - Leishmaniose dérmica pós calazar	14
Figura 1.16 - Leishmaniose visceral.....	15
Figura 1.17 - Estrutura básica de um flavonoide	24
Figura 1.18 - Estrutura química da EGCG	25
Figura 1.19 - Reação da tripanotona redutase	26
Figura 1.20 - Reações dependentes da tripanotona redutase.....	27
Figura 1.21 - Estrutura conformacional 3D da tripanotona redutase	28
Figura 1.22 - Domínios da tripanotona redutase	28
Figura 1.23 - Sítio ativo da tripanotona redutase.....	29
Figura 4.1 - Efeito da EGCG, miltefosina e anfotericina B na proliferação celular de promastigotas de <i>L. infantum</i>	41
Figura 4.2 - Valores de IC ₅₀ e FICl ₅₀ da ssociação da EGCG com miltefosina	43
Figura 4.3 - Valores de IC ₉₀ e FICl ₉₀ da associação da EGCG com miltefosina	44
Figura 4.4 - Valores de IC ₅₀ e FICl ₅₀ da associação da EGCG com anfotericina B ..	46
Figura 4.5 - Valores de IC ₉₀ e FICl ₉₀ da ssociação da EGCG com anfotericina B ...	47
Figura 4.6 - Produção intracelular de H ₂ O ₂	48
Figura 4.7 - Determinação do potencial de membrana mitocondrial.	50
Figura 4.8 - Determinação dos níveis de ATP intracelular	51
Figura 4.9 - Efeito da EGCG sobre a atividade da enzima tripanotona redutase	52
Figura 4.10 - Região para o estudo do <i>docking</i>	53

Figura 4.11 - Cluster do estudo de <i>redocking</i> entre a tripanotiona reduzida e o sítio catalítico da TR	54
Figura 4.12 - Estudo de <i>redocking</i> entre o NADPH e o sítio do cofator da TR.....	54
Figura 4.13- Interação da tripanotiona oxidada no sítio catalítico da TR.....	56
Figura 4.14 - Interação da EGCG no sítio catalítico da TR	58
Figura 4.15 - Interação da clomipramina no sítio catalítico da TR.....	59
Figura 4.16 - Interação da EGCG de menor energia no sítio do cofator	60
Figura 4.17 - Interação da EGCG de maior prevalência no sítio do cofator	61
Figura 4.18 - Interação da clomipramina no sítio do cofator.	62
Figura 4.19 - Atividade anti-mastigota da EGCG.....	64
Figura 4.20 - Atividade <i>in vivo</i> da EGCG.....	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Registros de LV no Brasil em 2015.	6
Tabela 1.2 - Esquema terapêutico para o tratamento das Leishmanioses no Brasil.	18
Tabela 1.3 - Desvantagens dos tratamentos utilizados na clínica para o tratamento das leishmanioses.....	20
Tabela 1.4 - Estudos de terapia combinada contra as leishmanioses.....	22
Tabela 4.1 - Valores de IC ₅₀ e IC ₉₀	41
Tabela 4.2 - Valores de IC ₅₀ e FICl ₅₀ da associação da EGCG com miltefosina.	42
Tabela 4.3 - Valores de IC ₉₀ e FICl ₉₀ da associação da EGCG com miltefosina.	43
Tabela 4.4 - Valores de IC ₅₀ e FICl ₅₀ da associação da EGCG com anfotericina B..	45
Tabela 4.5 - Valores de IC ₉₀ e FICl ₉₀ da associação da EGCG com anfotericina B..	45
Tabela 4.6 – Cálculos do estudo de <i>docking</i> no sítio catalítico e no sítio do cofator.	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial
- 2TNB⁻ - 2-nitro-5-ácido tiobenzóico
- ATP - Adenosina trifosfato
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- DNDi - *Iniciativa* Medicamentos para Doenças Negligenciadas
- DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas
- DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- ED₅₀ - Dose que inibe 50% da atividade da carga parasitária
- ED₉₀ - Dose que inibe 90% da atividade da carga parasitária
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGCG - Epigalocatequina-3-galato
- FCCP - Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona
- GSH - Glutathione
- GTP - Guanosina trifosfato
- H₂DCFDA - Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- HBSS - Solução salina balanceada de Hanks
- IC₅₀ - Concentração que inibe 50% da atividade testada
- IC₉₀ - Concentração que inibe 90% da atividade testada
- IDH - Índice de Desenvolvimento Humano
- IF - Índice de Infecção
- IV - Índice de Variação
- JC-1 - Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboxianina
- LCD - Leishmaniose cutâneo-difusa
- LCL - Leishmaniose cutânea localizada
- LD - Leishmaniose disseminada
- LDA - Ensaio de diluição limitante
- LDC - Leishmaniose Difuso-Cutânea
- LDPC - Leishmaniose dérmica pós-calazar
- LRC - Leishmaniose recidiva cútis
- LV - Leishmaniose Visceral
- NADP⁺ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Solução tamponada com fosfato
PNUD - Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio
RMS – Raiz quadrada média
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SFB - Soro Fetal Bovino
T(S)₂ - Tripanotiona oxidada
T(SH)₂ - Tripanotiona reduzida
TDR - Programa Especial da Investigação e Capacitação no Domínio das Doenças
Tropicais
TR - Tripanotiona Redutase
UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

1. Introdução

1.1. Doenças Tropicais Negligenciadas

Doenças infecciosas geram um grande impacto para a saúde pública ao redor do mundo. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) revelam que, no geral, essas doenças prevalecem em regiões de clima tropical e subtropical em 149 países podendo afetar aproximadamente 1 bilhão de pessoas por ano, no qual indivíduos que residem em condições precárias de vida, com pouco ou nenhum saneamento básico e em contato próximo com vetores infectados são os mais afetados (NDJONKA et al., 2013). Dentre essas doenças podemos citar: dengue, chikungunya, raiva, tracoma, úlcera de Buruli, boubá, hanseníase, doença de Chagas, tripanossomíase humana africana, leishmanioses, malária, teníase, neurocisticercose, dracunculíase, equinococose, doenças transmitidas por alimentos, filariose linfática, micetoma, oncocercose, esquistossomose e helmintíase transmitida pelo solo (WHO, 2017a).

Essas doenças estão classificadas segundo a OMS como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), uma vez que não recebem um grande apoio de indústrias farmacêuticas no que tange a pesquisa e desenvolvimento de estratégias para o controle, prevenção e tratamento dessas doenças (DIMASI; GRABOWSKI; VERNON, 1995). Entre os anos de 1975-1999 apenas 1,1% dos novos produtos terapêuticos foram desenvolvidos para doenças negligenciadas. Dos 850 novos produtos registrados entre os anos de 2000-2011 apenas 97 (4%) foram indicados para doenças negligenciadas. Nesse mesmo período apenas 4 novas entidades químicas, 1% de um total de 336, foram aprovadas para esse grupo de doenças e em 31 de dezembro de 2011 dos 148.145 novos produtos registrados, apenas 2016 (1%) foi registrado para doenças negligenciadas (PEDRIQUE et al., 2013).

Nesse contexto, diferentes organizações sem fins lucrativos e diversos países têm se engajado para oferecer meios necessários para a erradicação dessas doenças através de propostas que visem ampliar a discussão e a sua resolução. Em 1975 foi criado o Programa Especial de Investigação e Capacitação no Domínio das Doenças Tropicais (*Training in Tropical Diseases – TDR*), co-patrocinado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), Banco Mundial e OMS. Outros programas e fundações também tem gerado um impacto direto na pesquisa e desenvolvimento em DTN, como é o caso da *Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas*, (*Drugs for Neglected Diseases initiative – DNDi*) e a Fundação Bill e Melinda Gates. A própria OMS vem realizando diversas reuniões com pauta voltada

para a elaboração de iniciativas para a erradicação das DTN. Em maio de 2013 foi realizada a 66ª Assembleia Mundial da Saúde que teve como metas intensificar e integrar medidas contra doenças tropicais negligenciadas e planejar investimentos para melhorar a saúde e o bem-estar social das populações afetadas (WHO, 2012). Além dessa iniciativa, também foi elaborada uma lista com diferentes Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) que contempla 17 objetivos e 169 metas envolvendo temáticas diversificadas como a erradicação da pobreza, redução das desigualdades, educação, saúde, acabar com as epidemias de AIDS, tuberculose, malária e doenças tropicais negligenciadas, combater a hepatite, doenças transmitidas pela água, e outras doenças até 2030 (WHO, 2017b).

1.2. Leishmanioses

As leishmanioses estão classificadas no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) e são amplamente distribuídas ao redor do mundo (Figura 1.1 e Figura 1.2). São causadas por parasitos protozoários intracelulares obrigatórios da família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*. Dados mais recentes da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam números preocupantes. Presente em 98 países, onde 350 milhões de pessoas vivem em local de risco da infecção, são responsáveis por cerca de 1,6 milhão de novos casos por ano e podem induzir aproximadamente 60 mil óbitos por ano (WHO, 2010, 2017c; ALVAR et al., 2012).

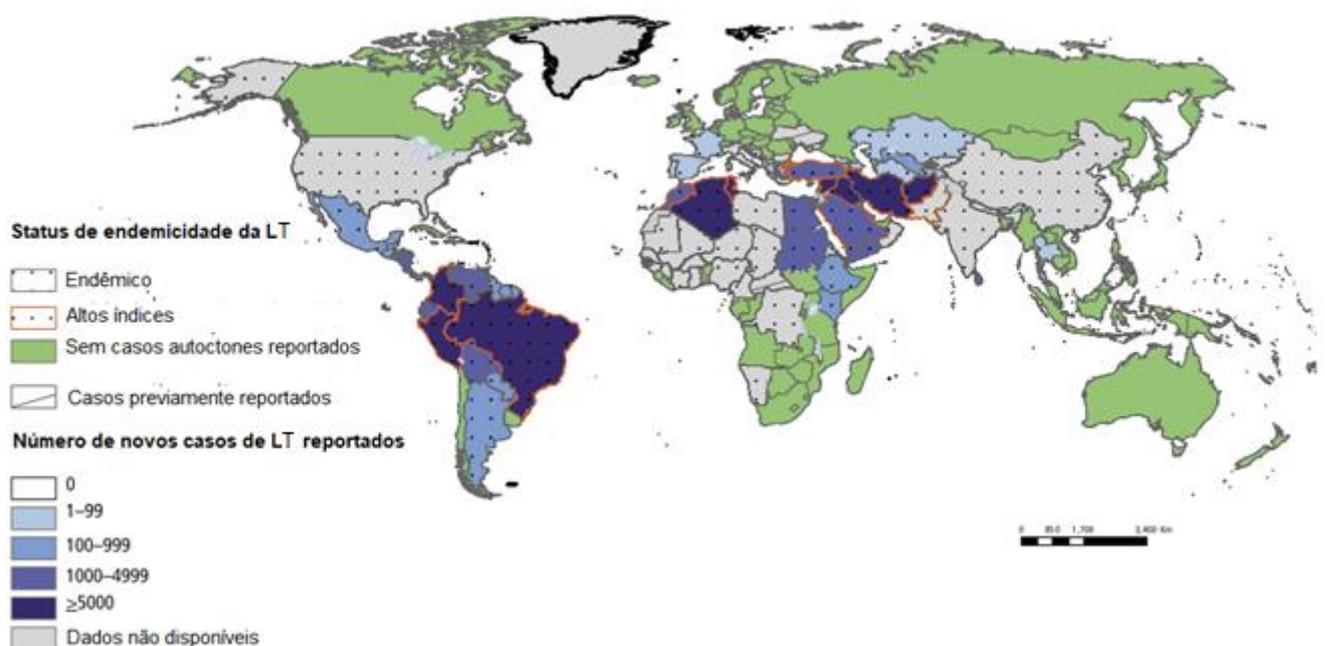


Figura 1.1 - Distribuição da leishmaniose tegumentar ao redor do mundo. (Adaptado de WHO, 2017c).

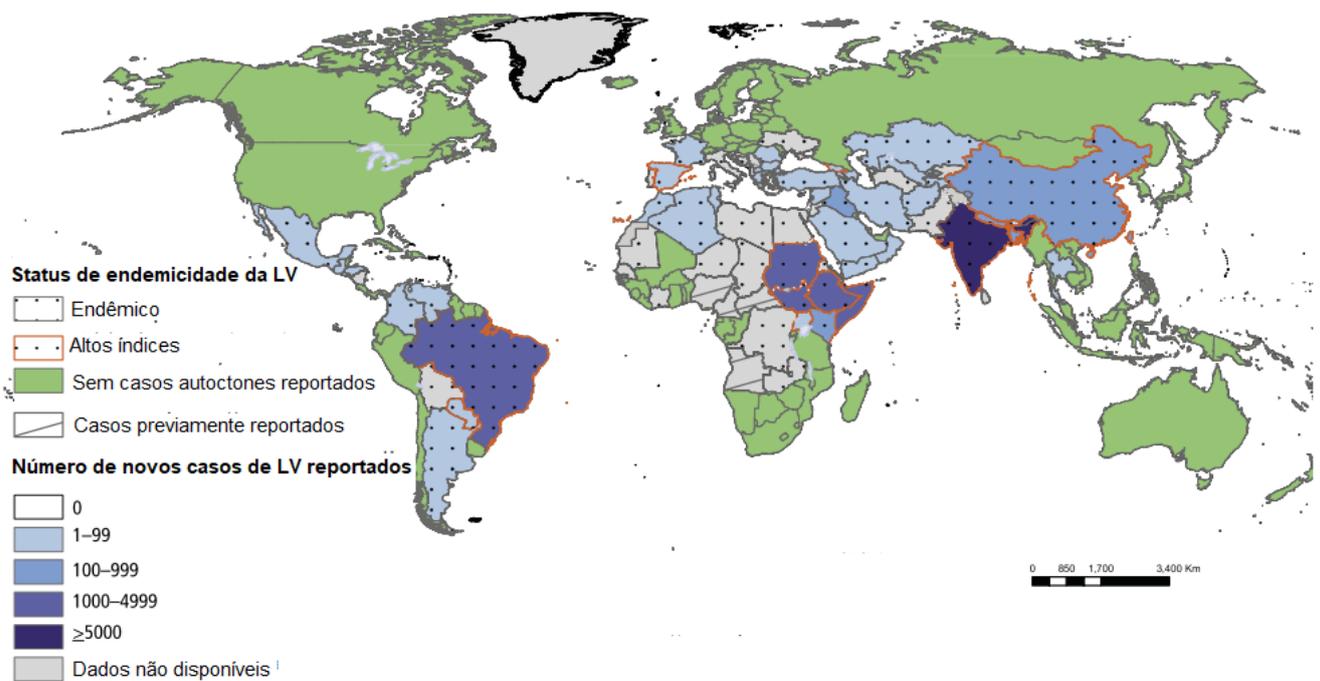


Figura 1.2 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo. (Adaptado de WHO, 2017c).

Essas doenças apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas que podem ser divididas em: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV). Ambas manifestações estão amplamente distribuídas em vários países (ALVAR et al., 2012; WHO, 2017c). Enquanto a LT é a forma mais comum da doença, a LV é a mais grave e pode ser fatal (SANTOS et al., 2008; EL-ON, 2009; WHO, 2017c).

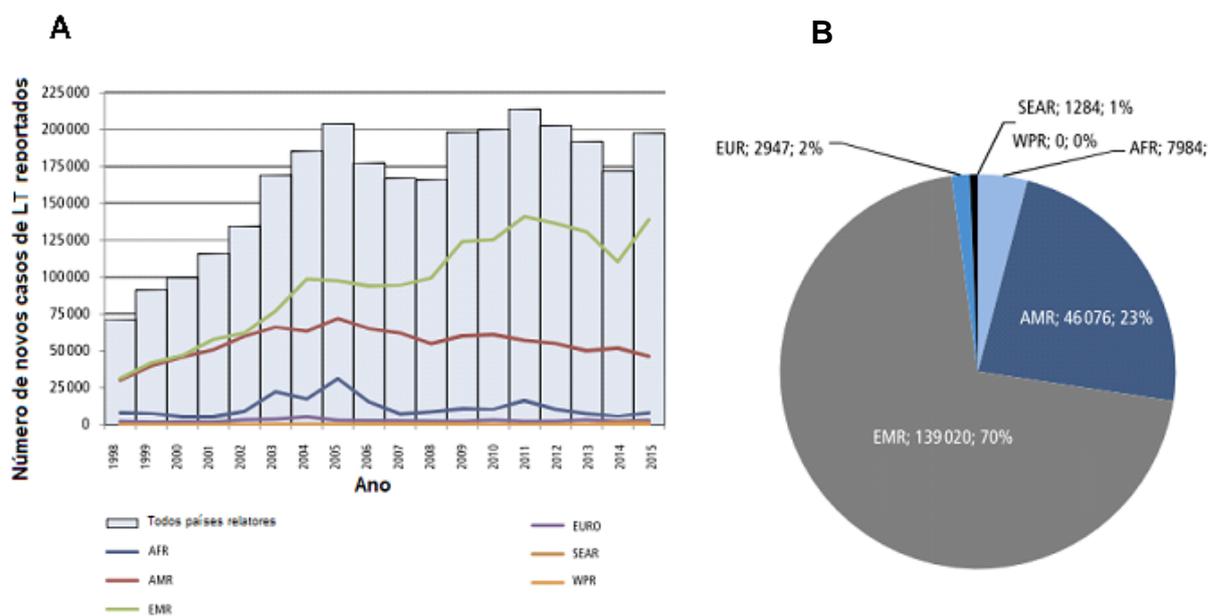


Figura 1.3 - Número de casos de LT registrados entre 1998 e 2015 (A) e somente em 2015 (B). (Modificado de WHO, 2017c). AFR = África; AMR = Américas; EMR = Mediterrâneo Oriental; EURO = Europa; SEAR = Sudeste Asiático; WPR = Pacífico Ocidental.

Os últimos dados levantados pela OMS indicam que só em 2015 foram reportados 197.552 novos casos de LT e 23.804 novos casos de LV. Mais de 90% dos novos casos de LT ocorreram no Mediterrâneo Oriental e nas Américas (principalmente Brasil, Colômbia e Peru) (Figura 1.3) (WHO, 2017c). O Brasil também participa da lista dos 5 países que compõem 75% dos casos de LT em todo mundo, juntamente com Afeganistão, República Islâmica do Irã, Iraque e República Árabe da Síria (WHO, 2017c).

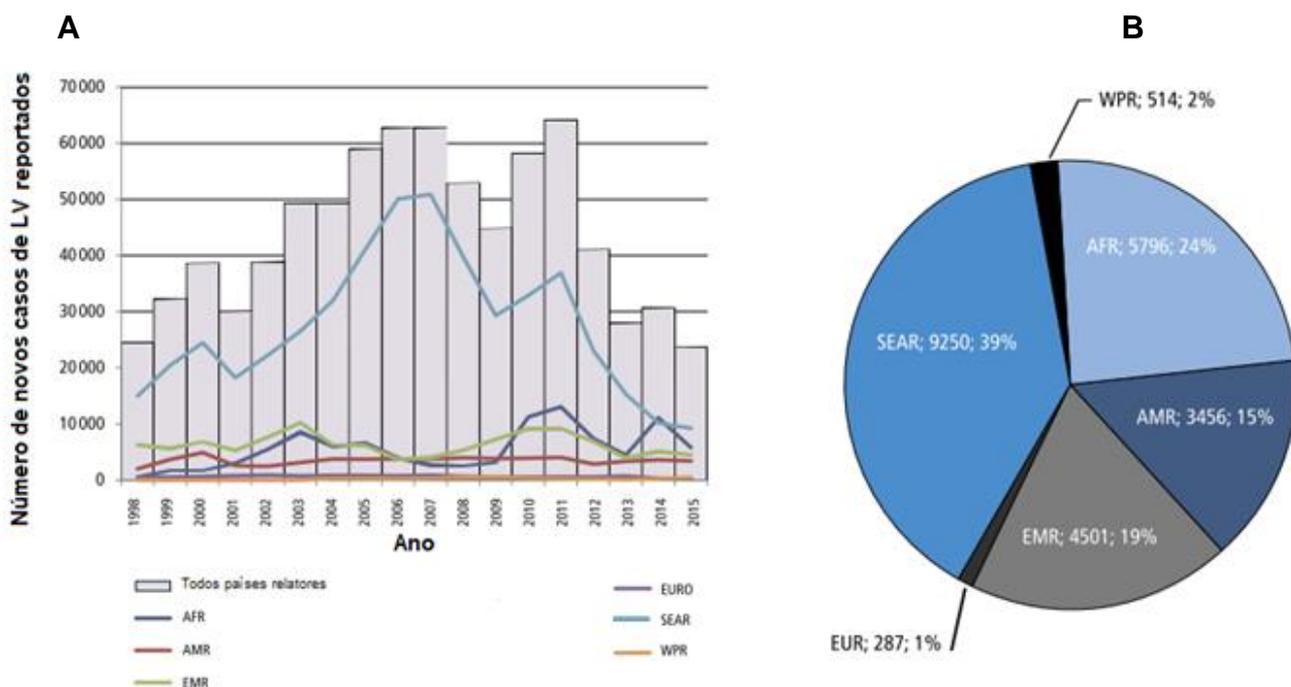


Figura 1.4 - Número de casos de LV registrados entre 1998 e 2015 (A) e somente em 2015 (B). (Modificado de WHO, 2017c). AFR = África; AMR = Américas; EMR = Mediterrâneo Oriental; EURO = Europa; SEAR = Sudeste Asiático; WPR = Pacífico Ocidental.

Para os casos de LV os números também são alarmantes. 39% dos casos foram registrados no Sudeste Asiático, 24% na África e 19% no Mediterrâneo Oriental (Figura 1.4). Ainda sim foram identificadas 3 regiões de alta incidência da LV, a saber: Leste da África (Etiópia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Uganda) reportaram 40% dos casos, o Subcontinente Indiano (Bangladesh, Índia e Nepal) 39% e Brasil, que reportou 14%. Ainda nesse contexto, o Brasil juntamente com outros 6 países representa 90% dos casos de LV em todo o mundo, ao lado de Índia, Sudão do Sul, Sudão, Etiópia, Quênia e Somália (WHO, 2017c). Ao analisar os dados epidemiológicos entre os países das Américas os dados são ainda mais alarmantes, só o Brasil registrou aproximadamente 95% dos casos de LV registrados entre o período de 2003 a 2007 e possui uma incidência anual de 4200 a 6300 de novos casos (ALVAR et al., 2012).

A LV está presente na maioria dos estados brasileiros (Figura 1.5) e no ano de 2015 foram registrados no total 3289 novos casos de LV, tendo as regiões Nordeste e Norte com maiores taxas de incidência para esse período (Tabela 1.1), sendo também as regiões com menores IDH do país segundo o Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD) (PNUD, 2016).

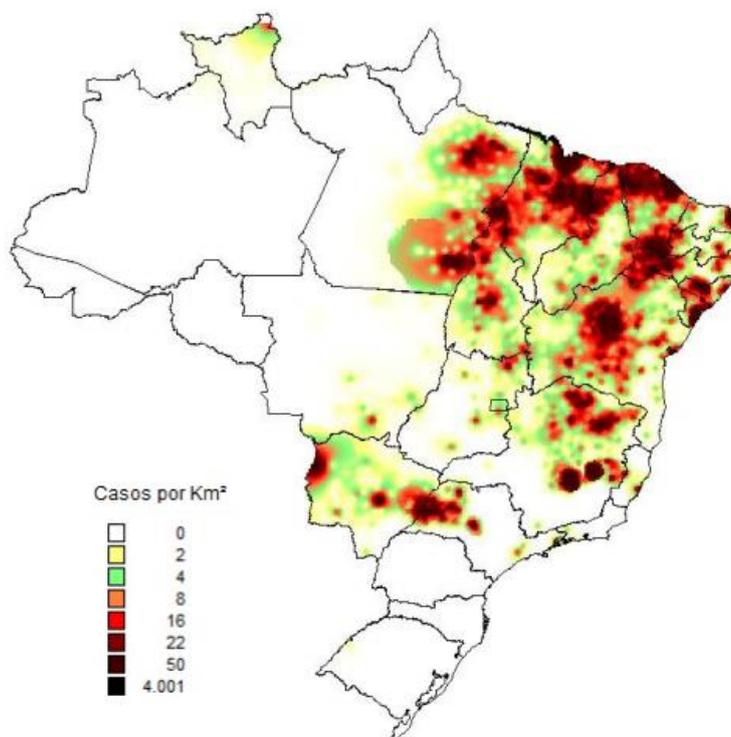


Figura 1.5 - Notificações de LV no Brasil em 2015. Fonte: SVS/MS.

Tabela 1.1 - Registros de LV no Brasil em 2015.

Região	Casos confirmados	Incidência
Nordeste	1806 54,9%	3,2
Norte	469 14,2%	2,7
Centro-Oeste	157 4,8%	1
Sudeste	538 16,4%	0,6
Sul	5 0,1%	0
UF ignorada	314 9,5%	-
Total	3289 100%	-

Fonte: Sinan/SVS/MS

1.3. Vetores das leishmanioses

As formas clínicas das leishmanioses são transmitidas durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo (ordem Diptera, família Psychodidea, subfamília Phlebotominae). Estima-se que aproximadamente 30 diferentes espécies de flebotomíneos são capazes de transmitir as leishmanioses (GHORBANI; FARHOUDI, 2018) e aproximadamente 20 transmitem as leishmanioses ao homem (DESJEUX, 2004). São insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002). Os flebotomíneos adultos são adaptados a viver em locais escuros e úmidos e se alimentam de fontes naturais de açúcar, como seiva vegetal, sua principal fonte de carboidratos. Porém, as fêmeas também necessitam de alimentação sanguínea para a ovogênese (ADLER, 1964; SCHLEIN; WARBURG, 1986; KILLICK-KENDRICK, 1999).

Dois gêneros de flebotomíneos são responsáveis por transmitir a *Leishmania* para os hospedeiros vertebrados: *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Figura 1.6A) e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Figura 1.6B) (NEUBER, 2008). Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos: roedores, endentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem.



Figura 1.6 - Vetores das leishmanioses. (A) *Lutzomyia*; (B) *Phlebotomus*. (Disponível em: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs1.html>).

1.4 Parasito *Leishmania*

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez por Leishman e Donovan, no final do século XIX (ROSS, 1903). Esses tripanosomatídeos apresentam uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários formas celulares bem definidas durante seu ciclo biológico: amastigotas e promastigotas (Figura 1.7) (CHANG; FONG, 1983).

As formas amastigotas apresentam-se tipicamente ovoides ou esféricas. O cinetoplasto em forma de bastão pequeno – situado na maioria das vezes próximo do núcleo – é distinto da forma promastigota. Não há flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, uma invaginação da superfície do parasito. As formas promastigotas são alongadas, da sua região anterior (bolsa flagelar) emerge um flagelo livre. No citoplasma, o núcleo assemelha-se ao existente na forma amastigota. O cinetoplasto é geralmente ovoide e situado entre a extremidade da região anterior e o núcleo, variando bastante em sua posição (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002).

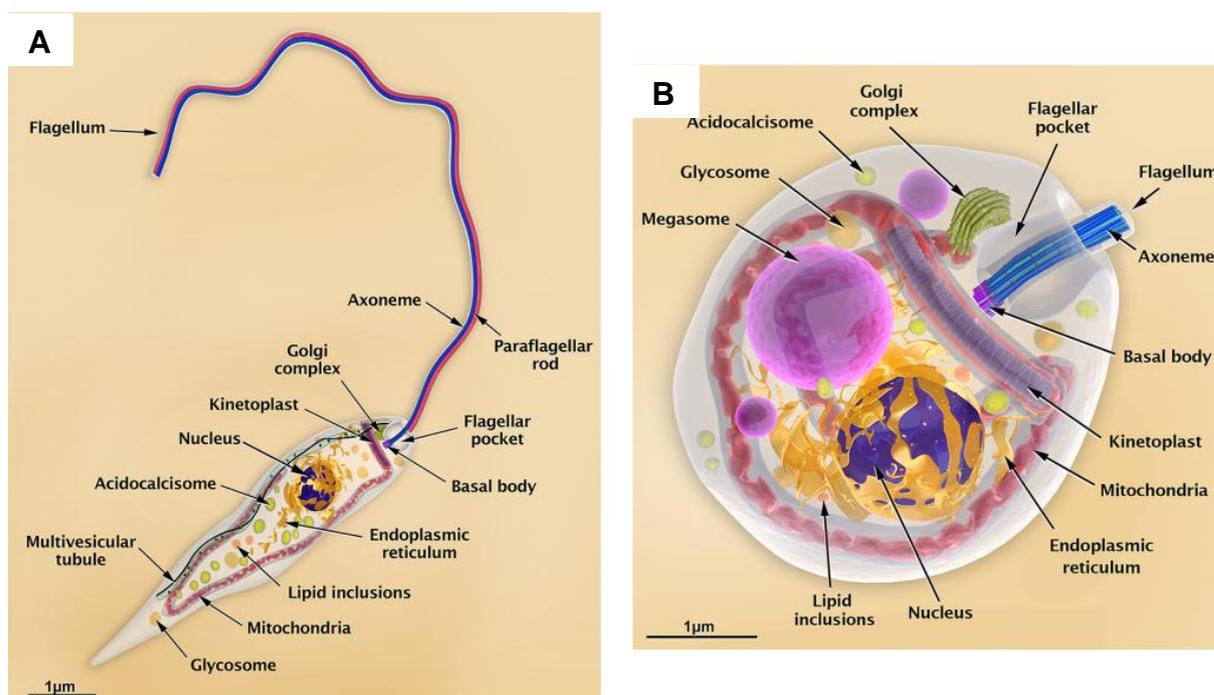


Figura 1.7 – Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania*. Figura esquemática mostrando o núcleo, cinetoplasto, flagelo e mitocôndria de forma (A) promastigota e (B) amastigota. Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez pelo Major William Boog Leishman e pelo Capitão Charles Donovan, (Figura 1.8A e B) no final do século XIX. Após atender um paciente proveniente da Índia que

apresentava febre, esplenomegalia e febre, *sir* Leishman realizou uma punção do baço e observou corpúsculos ovais de aproximadamente 2-3µm de diâmetro (LEISHMAN, 1903). Ainda em 1903, pouco tempo após a sua publicação, um outro médico, Charles Donovan, realizou a análise *post-mortem* de três amostras consecutivas de pacientes da Índia e encontrou corpúsculos semelhantes aos descritos anteriormente por Leishman, que passaram a ser conhecidos como corpúsculos Leishman-Donovan (LEISHMAN, 1903; BHATTACHARYYA, 1994). Nesse mesmo ano o pesquisador militar inglês Roland Ross batizou o gênero desses protozoários como *Leishmania* (Figura 1.8C) (ROSS, 1903).

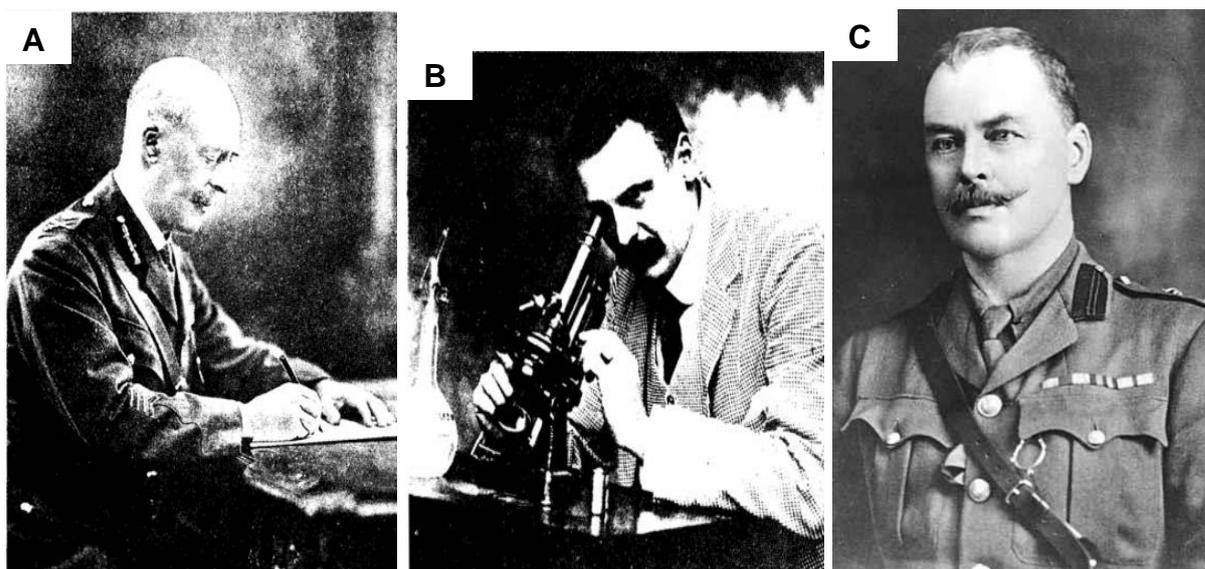


Figura 1.8 – Taxonomistas do gênero *Leishmania*: (A) Sir William Boog Leishman, (B) Charles Donovan e (C) Ronald Ross. Fonte: BHATTACHARYYA, 2010; <http://www.europeanmedical.info/parasitology/development-of-protozoology.html>

1.5 Ciclo biológico

Uma característica marcante, comum a todas as espécies de *Leishmania*, é a capacidade de estabelecer o parasitismo intracelular, preferencialmente em fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado (CHANG, 1983; CHANG; FONG, 1983; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). A Figura 1.9 retrata o ciclo biológico da *Leishmania*. Durante o repasto sanguíneo dos flebotomíneos, os amastigotas presentes nos macrófagos da pele, no líquido intersticial (devido ao rompimento dos macrófagos) ou no sangue ao serem sugados, se transformam em promastigotas procíclicos, os quais se multiplicam por divisão binária, no trato digestivo do inseto vetores (NEUBER, 2008).

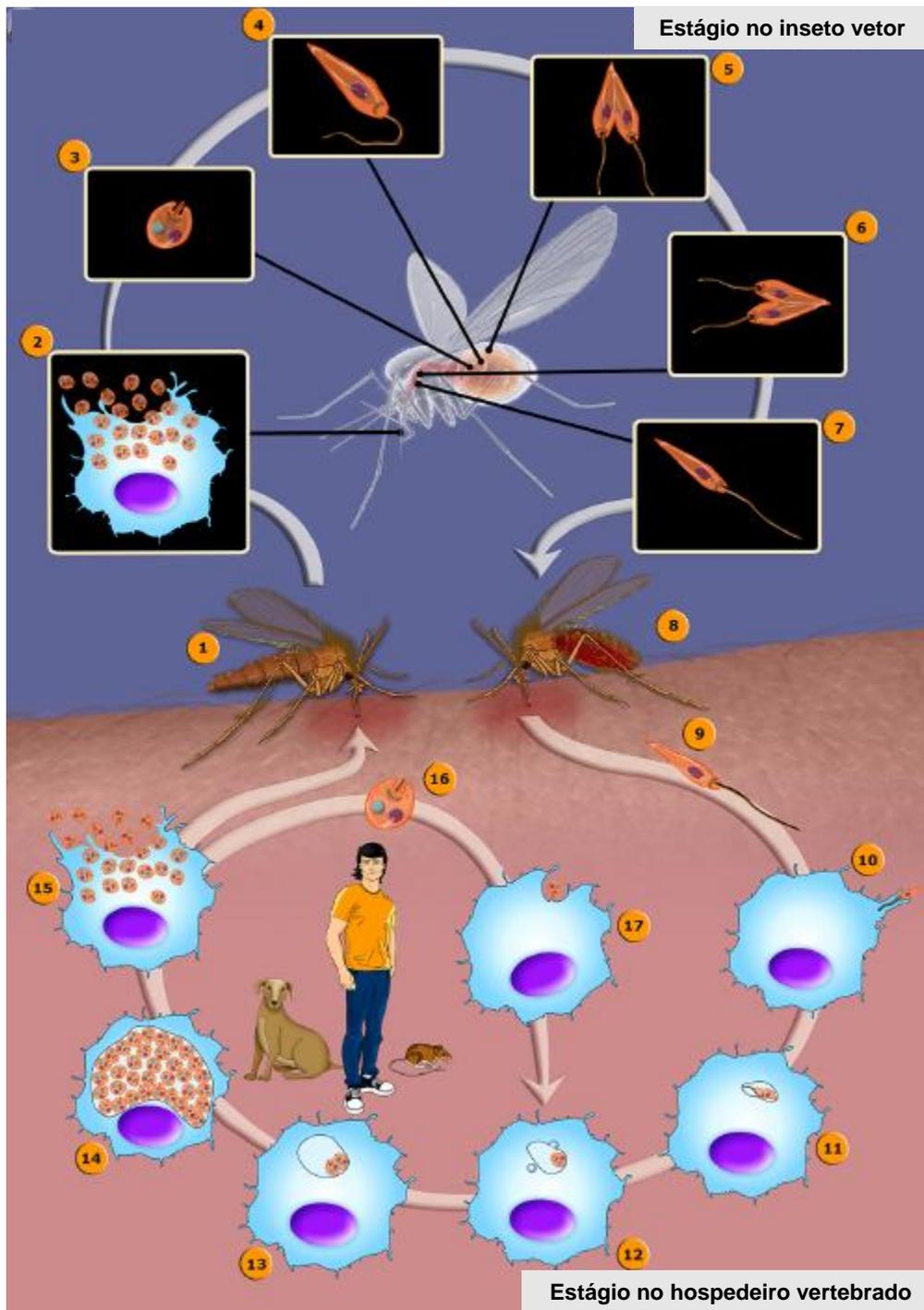


Figura 1.9 - Ciclo biológico da *Leishmania*. Adaptado de TEIXEIRA et al., 2013.

Os promastigotas sofrem subsequentes modificações morfológicas e bioquímicas, passando de um estágio não infectivo (procíclico) para um infectivo (metacíclico) – este processo é denominado metaciclogênese –, migrando para a faringe (Figura 1.9 1-8) (SACKS, 1989; SACKS; KAMHAWI, 2001). Quando o vetor infectado realiza o repasto sanguíneo, regurgita os promastigotas infectivos (metacíclicos), então estas formas serão fagocitadas pelas células fagocitárias mononucleares do hospedeiro, principalmente macrófagos. Durante a fagocitose, os

promastigotas são englobados em fagossomos que se fundem com endossomos e lisossomos, formando fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos (Figura 1.9 9-12) (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002). Dentro do fagolisossomo os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam e causam a lise do macrófago (Figura 1.9 13-15). Estes amastigotas livres poderão infectar outros macrófagos, continuando o ciclo (Figura 1.9 16) (LAINSON; SHAW; SILVEIRA, 1987; GLEW et al., 1988).

1.6 Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas por apresentarem um amplo espectro de lesões e manifestações clínicas, e isso se deve a grande variedade de espécies patogênicas, cepa, bem como o perfil de resposta imunológica do hospedeiro vertebrado. A interação entre o parasito e a resposta imune pode influenciar diretamente em uma resposta de maior ou menor gravidade, que associado a espécie do parasito poderá desencadear lesões que acometerá o tegumento cutâneo e/ou mucoso ou parasitar os órgãos internos (PACE, 2014).

Dessa forma, as leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV), sendo que a LT ainda pode ser subdividida quanto às características e local das lesões em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose recidiva cútis (LRC), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (TURETZ et al., 2002; NEUBER, 2008; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LAULETTA LINDOSO, 2012).

1.6.1 Leishmaniose cutânea localizada

A LCL é a forma mais prevalente da doença e é causada principalmente por espécies de *Leishmania* que são consideradas dermatrópicas (GOTO; LINDOSO, 2012). São caracterizadas por lesões únicas, geralmente no local onde fora realizado o repasto sanguíneo do flebotomíneo como mãos, pernas ou rostos (NEUBER, 2008; DAVID; CRAFT, 2009). São lesões ulceradas e indolores e com bordas bem delimitadas (Figura 1.10). Dependendo do tipo de interação parasito x hospedeiro, em alguns casos podem haver uma evolução para outra manifestação clínica (GOTO; LINDOSO, 2010).



Figura 1.10 - Leishmaniose cutânea localizada. Fonte: GOTO; LINDOSO, 2010.

1.6.2 Leishmaniose recidiva cútis

A LRC é caracterizada por lesões ao redor ou no interior de cicatrizes causadas por LCL. Essas lesões são representadas por pápulas confluentes e/ou nódulos que geralmente não ulceram. (BITTENCOURT et al., 1993; GOTO; LINDOSO, 2012). Nessa forma clínica, novas pápulas e nódulos aparecem na margem da cicatriz após 1-2 anos da cura da lesão aguda (WHO, 2012a).



Figura 1.11 - Leishmaniose recidiva cútis. Fonte: GOTO; LINDOSO, 2012.; TURETZ et al., 2002

1.6.3 Leishmaniose disseminada

A forma disseminada da leishmaniose cutânea é relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos (GOTO; LINDOSO, 2010). Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem duas ou mais áreas não contíguas do corpo (Figura 1.12). As razões para o desenvolvimento da LD ainda não foram estabelecidas, entretanto, fatores do parasito, hospedeiro e ambientais podem favorecer a disseminação do parasito no hospedeiro (TURETZ et al., 2002).



Figura 1.12 - Leishmaniose disseminada. Fonte: TURETZ et al., 2002.

1.6.4 Leishmaniose mucocutânea

A LM é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faringiana, frequentemente envolvendo lesões desfigurantes (Figura 1.13). Na maioria dos casos, ela resulta da evolução crônica da forma cutânea, curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (NEUBER, 2008; GOTO; LINDOSO, 2010). Infecções causadas por *L. braziliensis* podem sofrer metástase para membrana mucosa, dando origem à forma mucocutânea da doença (NEUBER, 2008).



Figura 1.13 - Leishmaniose mucocutânea Fonte: NEUBER, 2008.

1.6.5 Leishmaniose cutâneo-difusa

A LCD constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Inicia-se com uma lesão única que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações espalhadas pelo corpo, que se diferem das lesões da forma disseminada por serem não-ulceradas, resultante da disseminação do

parasito através dos vasos linfáticos, ou por migração de macrófagos infectados (Figura 1.14) (REITHINGER et al., 2007).



Figura 1.14 - Leishmaniose cutâneo-difusa. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013.

1.6.6 Leishmaniose dérmica pós-calazar

A LDPC é uma seqüela que pode acometer indivíduos afetados pela LV. Essa manifestação é bem caracterizada por máculas cutâneas, pápulas, úlceras, nódulos ou placas espalhadas pelo corpo (Figura 1.15) e frequentemente surgem após o tratamento com antimonial pentavalente (ZIJLSTRA et al., 2003; MUSA et al., 2008; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).



Figura 1.15 - Leishmaniose dérmica pós calazar. Fonte: ZIJLSTRA et al., 2003.

1.6.7 Leishmaniose visceral

A forma mais grave das leishmanioses é a LV. A sua manifestação depende da espécie de *Leishmania* envolvida e do estado imunológico do hospedeiro (NEUBER, 2008). Devido ao viscerotropismo destes parasitos, os indivíduos acometidos apresentam comprometimento de diversos órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea (Figura 1.16). Caracteriza-se por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia e hepatomegalia, podendo provocar óbito nos casos não tratados (OSMAN; KAGER; OSKAM, 2000; MALTEZOU, 2010; GHORBANI; FARHOUDI, 2018).



Figura 1.16 - Leishmaniose visceral. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014.

1.7 Quimioterapia para as leishmanioses

A quimioterapia para o tratamento das leishmanioses pouco sofreu alterações ao longo do tempo. A primeira proposta para o tratamento dessas doenças foi instituída por Gaspar Vianna, médico e pesquisador do Instituto de Patologia Experimental de Manguinhos. Inconformado com a inexistência de tratamento eficaz para as leishmanioses, em 1912 Gaspar Vianna implementou a utilização do antimonial de tartarato de potássio e antimônio – o tártaro emético –, um antimonial trivalente bastante utilizado empiricamente para o tratamento de várias doenças, para o tratamento das leishmanioses (VIANNA, 1912; REZENDE, 2009). Desde então, os antimoniais sofreram uma série de modificações a fim de diminuir os seus efeitos tóxicos.

1.7.1 Antimoniais pentavalentes

A alteração mais significativa empregada a fim de reduzir os efeitos colaterais do antimônio trivalente (Sb^{3+}) foi realizada somente na década de 40, quando o Sb^{3+} foi substituído pela sua forma pentavalente (Sb^{5+}), que reduziu significativamente os efeitos indesejados causados pela toxicidade, melhorou a solubilidade e aumentou a sua estabilidade (GOODWIN, 1995; SINGH; SIVAKUMAR, 2004). Atualmente, os antimoniais são disponibilizados comercialmente em duas formulações: antimoniato de N-metil-D-glucamina (antimoniato de meglumina) (Glucantime®) que contém 81mg Sb^{5+} /mL e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) que contém 100mg Sb^{5+} /mL (WHO, 2010), sendo considerados, no Brasil, os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014).

Esses fármacos são administrados por via intramuscular ou endovenosa, com esquemas terapêuticos de longos dias e requer o deslocamento do paciente até a unidade de saúde, trazendo desconforto e aumento no custo do tratamento. No

Brasil, recomenda-se a administração de 10-20mg/Sb⁵⁺/kg/dia por períodos que variam de 20-40 dias a depender da idade do paciente e da forma clínica por ele apresentada (Tabela 1.2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014).

Uma vez na corrente sanguínea, os antimoniais pentavalente são distribuídos em alta concentração no fígado e baço. No fígado, eles são biotransformados em seu estado trivalente e cerca de 50% do antimônio é excretado a partir de 24 a 76 horas pela urina (STEMMER, 1976; CHULAY; FLECKENSTEIN; SMITH, 1988). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente elucidado, mas sua ação leishmanicida depende da redução *in vivo* da forma pentavalente para a forma trivalente. Entretanto, há indicativos de que este composto iniba enzimas glicolíticas e a oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas do parasito, reduzindo a formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (BERMAN, 1988).

Além da dificuldade da via de administração desses fármacos, efeitos tóxicos tem sido associados ao tratamento com esses fármacos, tais como: cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, pancreatite (GASSER et al., 1994; SUNDAR et al., 1998; LYRA et al., 2016) e ototoxicidade (VALETE-ROSALINO et al., 2014). Há ainda um aumento nos relatos de casos de resistência e falha terapêutica, principalmente em países como a Índia, Quênia e Sudão (PONTE-SUCRE et al., 2017).

Não havendo uma melhora da sintomatologia com o tratamento feito pelos antimoniais pentavalentes, ou em pacientes SIDA/HIV positivos ou grávidas é recomendada a administração dos fármacos de segunda escolha. No Brasil os fármacos de segunda linha para o tratamento das leishmanioses se baseia no uso da anfotericina B e as pentamidinas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014).

1.7.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico antifúngico poliênico com uma alta potência *in vitro* e *in vivo* sendo utilizado como primeira escolha em alguns países no mundo (GOTO; LINDOSO, 2010), mas no Brasil é utilizado como segunda escolha para os casos de pacientes não responsivos ao tratamento com os antimoniais pentavalente ou na impossibilidade do seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). É comercializada em frascos com 50mg de desoxicolato sódico liofilizado de anfotericina B. Por apresentar uma baixa solubilidade recomenda-se a diluição do fármaco apenas no momento do uso. No Brasil é indicada a administração de

1mg/kg/dia em dias alternados com a dose máxima de 1 a 3g por infusão endovenosa lenta. A sua utilização requer hospitalização prolongada e um acompanhamento rigoroso (MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014).

Sua atividade leishmanicida é atribuída a sua afinidade pelo ergosterol, um esterol amplamente encontrado na membrana de *Leishmania* e ausente em membranas de células de mamíferos formando assim poros na membrana do parasito, levando-os a morte (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). No entanto, esse composto também se liga em menores proporções ao colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos, induzindo efeitos adversos sobre os pacientes, como: anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, calafrios, febre, flebite, anemia, convulsões, anorexia e nefrotoxicidade (CARVALHO; ARRIBAS; FERREIRA, 2000).

Devido a esses efeitos colaterais novas formulações lipídicas desse fármaco possibilitaram uma diminuição dos efeitos tóxicos e maior efetividade. Estas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Formulações lipossomais de anfotericina B constituem o tratamento de primeira escolha em países endêmicos no sul da Europa e em outros países desenvolvidos. No Brasil o seu uso está licenciado apenas para a leishmaniose visceral. Contudo, essas formulações apresentam um alto custo, dificultando sua utilização em países pobres, nos quais a escolha do tratamento depende mais do custo do que da eficácia ou toxicidade (MALTEZOU, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.7.3 Pentamidina

A pentamidina pertence ao grupo das diamidinas aromáticas. É uma poliamina que inicialmente foi utilizada para o tratamento de pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (SINGH; SIVAKUMAR, 2004) e atualmente é utilizada como segunda escolha no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral resistentes aos antimoniais (PISCOPO; MALLIA, 2006) e no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral em países do Novo Mundo (GOTO; LINDOSO, 2010), podendo também ser utilizada como o medicamento de primeira escolha (DAVID; CRAFT, 2009). Esse fármaco é comercializado em duas formulações: isotionato de

pentamidina (di-β-hidroxietano sulfonato) e mesilato de pentamidina (di-β-hidroximetilssulfonato) que se apresenta em frasco ampola contendo 300mg/sal. É recomendada a administração de 4mg/kg/dia por via intramuscular profunda, de dois em dois dias, não ultrapassando a dose total de 2g (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O mecanismo de ação desse fármaco ocorre através da interação de compostos catiônicos com o DNA ou nucleotídeo e seus derivados, interferindo na captação de poliaminas essenciais para a síntese do DNA, além de induzir alterações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial e consequentemente a morte do parasito.

O fato deste medicamento ter ação sobre o metabolismo da glicose pode haver durante o tratamento hipoglicemia seguida de hiperglicemia (COSTA, 1993; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010). Além de outros sintomas como dores locais, dores de cabeça, hipotensão, síncope, náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Tabela 1.2 - Esquema terapêutico para o tratamento das Leishmanioses no Brasil.

Formas clínicas	Antimoniais pentavalentes		Anfotericina B		Pentamidina	
	Dose (mg/kg/dia)	Período	Dose (mg/kg/dia)	Dose máxima*	Dose (mg/kg/dia)	Dose máxima*
LCL	10-20	20 dias	1	1-1,5g	4	2g
LD	10-20	20 dias	1	1-1,5g	4	2g
LM	20	20 dias	1	2,5-3g	4	2g
LCD	20	20dias	1	1-1,5g	4	2g
LV	20	20-40 dias	1	3g	4	2g

*LCL = Leishmaniose cutânea localizada, LD = Leishmaniose disseminada, LM = Leishmaniose mucocutânea, LCD = Leishmaniose cutâneo-difusa, LV = Leishmaniose visceral. * Dose máxima acumulada para o tratamento. Adaptado de GOTO; LINDOSO, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013, 2014*

1.7.4 Miltefosina

A miltefosina é um alquil fosfolipídio e foi o primeiro fármaco utilizado no tratamento das leishmanioses a ser administrado por via oral. Como parte do seu mecanismo de ação, esse composto se liga à membrana plasmática, é internalizado pela célula do hospedeiro e induz alterações significativas em seu metabolismo, modulação em receptores de superfície e ativação de fosfolipase (PARIS et al., 2004; BERMAN, 2008; PANDEY et al., 2009). Além disso, estudos vêm mostrando a capacidade da miltefosina em mediar uma via de sinalização para o processo de morte celular programada por apoptose (DORLO et al., 2012).

O esquema terapêutico proposto para o tratamento com a miltefosina inclui uma monoterapia por via oral durante 28 dias com a dose de 2,5mg/kg/dia. Os problemas relacionados à ampla utilização da miltefosina incluem seu potencial teratogênico e a ocorrência de resistência. A resistência à miltefosina pode aparecer facilmente durante o tratamento devido a mutações pontuais que levam a diminuição no acúmulo do composto no interior da célula (MALTEZOU, 2010) devido ao alto tempo de meia vida desse fármaco (150 a 200 horas) (PANDEY et al., 2009)

Além disso, a miltefosina desencadeia efeitos colaterais adversos durante o tratamento, como náuseas, vômitos, enjoos, dores de cabeça e diarreia. Ressalta-se ainda, o alto custo deste composto como um fator que limita sua utilização (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). No Brasil o tratamento com miltefosina para o tratamento das leishmanioses ainda não foi liberado pelo Ministério da Saúde, porém recentemente, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento por meio da Nota Técnica Conjunta n° 001/2016 MAPA/MS registrou o Milteforan™ para o tratamento da leishmaniose visceral em cães (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2016).

1.7.5 Paromomicina

A paromomicina é um aminoglicosídeo com atividade leishmanicida, que inibe a síntese protéica e altera a fluidez e permeabilidade de membrana. Esse composto tem sido utilizado por via parenteral no tratamento da leishmaniose cutânea no Novo e Velho Mundo. Quando associada com cloreto de metilbenzetônio, o uso tópico da paromomicina foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea do Velho Mundo (GOTO; LINDOSO, 2010). Os efeitos adversos encontrados nos pacientes tratados com essas formulações foram erupções cutâneas e prurido local (SUNDAR;

CHAKRAVARTY, 2008). Quando administrada por via intramuscular, o tratamento com a paromomicina pode apresentar casos de nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade (JAIN; JAIN, 2013).

1.8 Pesquisa e desenvolvimento de fármacos

A Tabela 1.3 ilustra resumidamente as problemáticas atuais para o tratamento das leishmanioses. De uma forma geral os fármacos atualmente utilizados na clínica demonstram severos efeitos colaterais, casos de resistência e/ou falha terapêutica além de apresentarem casos de resistência associados a esses tratamentos. Sendo assim, se fazem urgentes mais estudos que visem a busca por novos alvos terapêuticos e de novos compostos químicos que possam ser utilizados na clínica.

Tabela 1.3 - Desvantagens dos tratamentos utilizados na clínica para o tratamento das leishmanioses

Fármacos	Principais efeitos colaterais	Observações
Antimoniais pentavalentes	Cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e pancreatite	Altos índices de resistência e falha terapêutica
Anfotericina B	Nefrotoxicidade	Alta toxicidade
Anfotericina B lipossomal	Nefrotoxicidade	Alto custo
Pentamidina	Náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade	-
Miltefosina	Nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade	Alto tempo de meia vida
Paromomicina	Nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade	-

Adaptado de JAIN; JAIN, 2013.

Na busca por alternativas para o tratamento das leishmanioses tem surgido uma série de novas estratégias, agentes quimioterápicos, produtos naturais e terapia combinada (JAIN; JAIN, 2013).

As etapas de triagem de um novo agente quimioterápico incluem metodologias que podem se basear em uma triagem fenotípica ou triagem baseada em alvo. A primeira consiste em uma abordagem com a finalidade de se investigar o efeito de compostos diretamente na viabilidade do parasito. Essa foi a metodologia utilizada para a pesquisa e desenvolvimento da maioria das novas entidades químicas aprovadas pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no período entre 1998

e 2008 (SWINNEY; ANTHONY, 2011). Fármacos que estão atualmente em estudos clínicos contra algumas doenças tropicais negligenciadas foram descobertos através desse processo, como é o caso do nitroimidazol, fexinidazol e oxaborole para as tripanossomíases africanas. Para a malária, a MMV (*Medicines for Malaria Venture*) possui uma série de novos compostos no desenvolvimento pré-clínico e clínico, a maioria dos quais foi descoberta através de triagem fenotípica (GILBERT, 2013)

Já a triagem baseada no alvo é realizada através de uma busca racional contra um alvo definido de interesse que na maioria das vezes envolve uma proteína associada a uma via específica. Este alvo deve ser identificado e validado para que possa ser de relevância funcional e farmacológico. Dentre as ferramentas utilizadas para a busca de novos fármacos e novos alvos estão os métodos clássicos como a contagem direta, absorvância, fluorescência e citometria de fluxo. Já os métodos mais modernos incluem bioluminescência (com parasitos transgênicos), HTS (*high-throughput screening*), HCl (*high-content imaging*) e ensaios *ex vivo* (ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017).

1.9 Terapia combinada

Nas estratégias que vem sendo estudadas para a pesquisa e desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses encontram-se um perfil para o um fármaco ideal. No qual esse composto deve possuir características como: boa biodisponibilidade, seguro, administrados por via oral, com esquemas terapêuticos curtos e que possibilite a interação com outros fármacos (BLAS et al., 2002; WHO, 2007, 2012a, 2017a; CHATELAIN; IOSET, 2011; JAIN; JAIN, 2013).

O estudo de combinação de fármacos pode ser definido como associação de dois ou mais fármacos para um tratamento com o objetivo de diminuir as doses em relação à administração dos fármacos sozinhos e, conseqüentemente, diminuir os efeitos tóxicos e obter efeitos aditivos ou sinérgicos para combater a resistência adquirida esperada ou minimizar a possibilidade do desenvolvimento de resistência (FITZGERALD et al., 2006; KARJALAINEN; REPASKY, 2016)

Nessa busca, entidades como a *Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi)* vem realizando estudos clínicos com a combinação entre os fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses a fim de propor um novo

horizonte para o combate dessas doenças. Nos últimos 10 anos foram registrados novos protocolos e esquemas terapêuticos foram propostos (Tabela 1.4).

Tabela 1.4 - Estudos de terapia combinada contra as leishmanioses

Ano	Forma Clínica	Local	Fase Clínica	Associação	Referência
2008	LV	Índia	3	Ambisome + Miltefosina Ambisome + Paromomicina Miltefosina + Paromomicina	(SUNDAR et al., 2011) *NCT00696969
2008	LT	Bolívia	2	Miltefosina + Imiquimode	- *NCT01380314
2010	LV	Quênia e Sudão	2	Ambisome + Estibogluconato de sódio Ambisome + Miltefosina	(OMOLLO et al., 2011; WASUNNA et al., 2016) *NCT01067443
2010	LV	Bangladesh	3	Ambisome + Miltefosina Ambisome + Paromomicina Miltefosina + Paromomicina	(RAHMAN et al., 2017) *NCT01122771
2011	LV	Brasil	4	Ambisome + Antimoniato de meglumina	(ROMERO et al., 2017) *NCT01310738
2018	LV	Etiópia, Quênia, Sudão e Uganda	3	Paromomicina + Miltefosina Estibogluconato de sódio + Paromomicina	Ainda em fase de recrutamento *NCT03129646

Baseado no site: www.clinicaltrials.gov. * Identificador ClinicalTrials.gov.

1.10 Produtos naturais aplicados para as leishmanioses

Produtos naturais não são apenas a base para a medicina tradicional. São compostos extraídos em todo o ambiente, como oceano, florestas tropicais e fontes termais produzidos por uma série de microrganismos vivos que vão desde bactérias,

microrganismos marinhos, fungos e plantas (SCOTTI et al., 2016). Esse é um campo que vem recebendo um alto investimento das mais diversas indústrias farmacêuticas, uma vez que novos grupos de produtos naturais revelaram propriedades antiparasitárias de eficácia e seletividade surpreendentes. Nas últimas décadas a pesquisa básica forneceu um impulso à descoberta de fármacos leishmanicidas, incluindo o conhecimento da biologia, bioquímica e genoma do parasito, revolução nas técnicas químicas, avanços nas ferramentas de bioinformática, parcerias e consórcios para apoiar o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas. A evolução de fármacos de origem natural tem uma importância relevante na busca de novas alternativas terapêuticas, portanto fontes naturais representam uma grande oportunidade para o descobrimento de novos medicamentos para o tratamento de algumas doenças parasitárias (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003).

As plantas oferecem fontes valiosas para a triagem de metabolitos secundários bioativos que produzem compostos farmacologicamente úteis. Estas substâncias podem ser fonte de conhecimento para a síntese de derivados com melhor perfil terapêutico (POLONIO; EFFERTH, 1998; NDJONKA et al., 2013).

Diversas classes de produtos naturais vem se destacando no decorrer dos anos. O uso de alcalóides vem demonstrando propriedades antiparasitárias em *L. amazonensis* e *L. donovani in vitro e in vivo*. Já os terpenos tem sido amplamente estudados para a terapia antimalária. Um outro grupo que vem recebendo bastante destaque são os fenóis. Estes são compostos químicos orgânicos caracterizados pela presença de uma hidroxila ligada a um anel aromático. Alguns fenóis como a chalcona e quinonas tem apresentado excelente atividade antiprotozoária, demonstrando efeito em *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* e *Leishmania* (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003).

1.10.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo grande e complexo de compostos que pertencem ao grupo dos polifenóis (HOENSCH; OERTEL, 2012). Eles consistem em um núcleo flavan com dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono (Figura 1.17) (LEHANE; SALIBA, 2008).

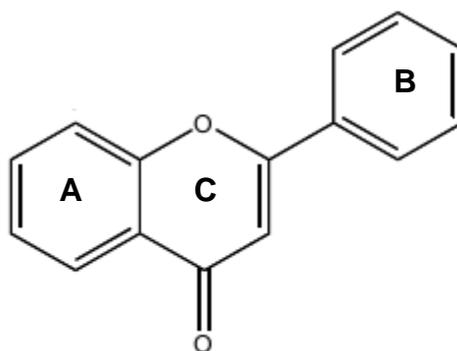


Figura 1.17 - Estrutura básica de um flavonoide. Adaptado de LEHANE; SALIBA, 2008.

São metabólitos secundários presentes em frutas, vegetais, vinho, chá e café e são classificados como: flavona, flavononas, flavonoides, flavonóis, antocianidinas, isoflavonoides e neoflavonoides (LEHANE; SALIBA, 2008; CZAPLIŃSKA; CZEPAS; GWOŹDZIŃSKI, 2012; HOENSCH; OERTEL, 2012). Nas plantas, os flavonoides desempenham papéis importantes nas raízes, no transporte de auxina, no desenvolvimento da parte aérea, na polinização, na modulação de espécies reativas de oxigênio, no crescimento e proteção contra patógenos. Os flavonoides interagem com diversos alvos, atribuindo-lhes atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antineoplásicas e tripanosomicidas (GÜIDA et al., 2007; LEHANE; SALIBA, 2008; ABOULAILA; YOKOYAMA; IGARASHI, 2010; HOENSCH; OERTEL, 2012; WESTON; MATHESIUS, 2013).

A epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Figura 1.18) é a principal catequina do chá verde, representando um total de 50%-80% de suas catequinas. O chá verde, originado a partir da *Camellia sinensis*, contém compostos biologicamente ativos, tais como polifenóis, metilxantinas e óleos essenciais. A maioria de suas ações biológicas, tais como a redução dos níveis de lipídios plasmáticos, efeitos antiinflamatórios, atividades *antimicrobianas*, antineoplásicas e antioxidantes, estão relacionadas com a fração de polifenóis, ou seja, as catequinas. Entre estes, a EGCG tem recebido considerável atenção por causa destes potentes efeitos terapêuticos (KHAN et al., 2006).

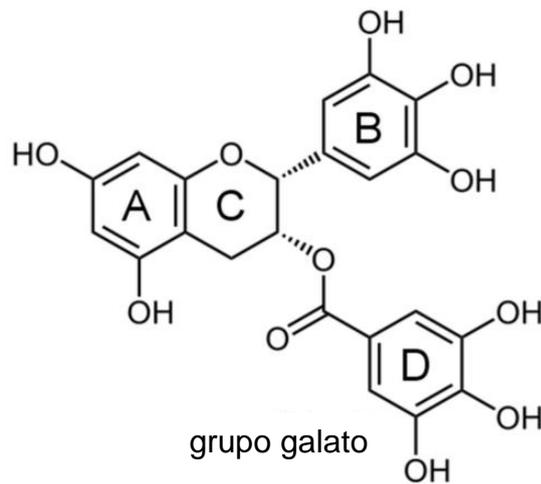


Figura 1.18 - Estrutura química da EGCG. Adaptado de: MERELES; HUNSTEIN, 2011

O efeito da EGCG já foi demonstrado em *Babesia microti* (ABOULAILA; YOKOYAMA; IGARASHI, 2010), tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* e em modelo murino da doença de Chagas na fase aguda (GÜIDA et al., 2007), bem como na atividade *in vitro* em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* e em modelo experimental murino de leishmaniose tegumentar. Parte do seu mecanismo de ação já foi determinado, sabe-se que alguns flavonoides possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, causando danos mitocondriais. E nesses parasitos já foi relatado que a EGCG causa morte celular através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio desencadeando na diminuição do potencial de membrana mitocondrial e subsequente morte do parasito (INACIO et al., 2012, 2014; INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013).

1.11 Tripanotona redutase e o balanço redox

Os protozoários parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* e possuem duas formas biológicas distintas, a forma promastigota que é flagelada e encontrada no inseto vetor e a forma amastigota, que é encontrada no interior das células fagocíticas mononucleares do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Juntamente com eosinófilos, neutrófilos e células natural *killer*, os fagócitos mononucleares são a primeira linha de defesa para a eliminação dessas parasitos (UNANUE; ALLEN, 1987). Numa tentativa de eliminar os parasitos invasores, as células efetoras – como os macrófagos ativados – geram uma cascata de sinalização que levam a produção de intermediários como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (ROS). Como resposta a esse combate, a enzima NADPH oxidase desses macrófagos reage com o substrato NADPH, tendo como produto

dessa reação a formação do ânion superóxido (O_2^-). O O_2^- , por sua vez, é espontaneamente convertido pela superóxido dismutase em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser convertido em radical hidroxila (OH^\cdot), ácido hipocloroso ($HOCl$) e peroxinitrito ($ONOO^-$).

A sobrevivência desses parasitos nesse ambiente completamente hostil só é possível graças a um mecanismo de defesa baseado na manutenção dos níveis intracelulares de radicais livres, com a redução de dissulfetos e a neutralização de hiperóxidos (FAIRLAMB; CERAMI, 1992; TOVAR et al., 1998; PAL; BANDYOPADHYAY, 2012) (Figura 1.19).

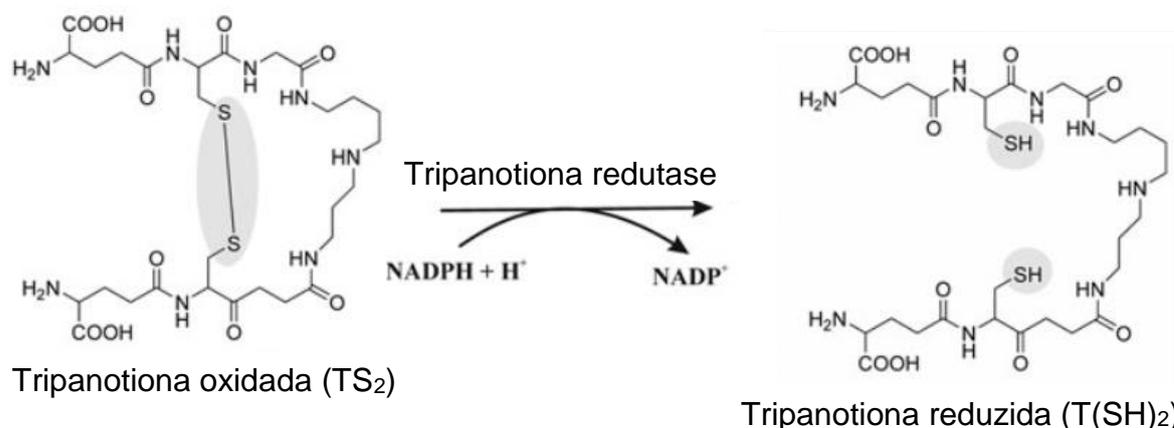


Figura 1.19 - Reação da tripanotione reductase. A tripanotione oxidada é convertida em uma reação de oxidação pela tripanotione reductase para a tripanotione reduzida utilizando o NADPH como cofator. Adaptado de PAL; BANDYOPADHYAY, 2012.

Essa manutenção ocorre na maioria dos sistemas biológicos por reações eficientes de óxido-redução envolvendo a glutathione e a glutathione reductase. Entretanto, a glutathione reductase não é encontrada em tripanosomatídeos, e a principal enzima envolvida nesses processos é a tripanotione reductase (TR) (EC 1.8.1.12), uma enzima NADPH-dependente que é responsável por manter a tripanotione em sua forma reduzida (FAIRLAMB; HENDERSON; CERAMI, 1989; KRAUTH-SIEGEL; JACOBY; SCHIRMER, 1995). A tripanotione reduzida (T(SH)₂) é a molécula chave para o metabolismo redox em tripanosomatídeos, pois participa como doadora de elétrons em diversas vias (Figura 1.20).

A tripanotione reductase foi inicialmente descrita em 1985 por Fairlamb e Cerami em *T. brucei*, *T. cruzi*, *Crithidia fasciculata* e *L. mexicana* num estudo que tinha como objetivo caracterizar uma enzima análoga a glutathione reductase encontrada em mamíferos e que fosse responsável pela manutenção do balanço redox desses parasitos e garantisse a sua sobrevivência no interior do vacúolo

parasitóforo (FAIRLAMB; CERAMI, 1985). A partir desse trabalho, a relevância da TR como um importante alvo seletivo para a quimioterapia de doenças causadas por protozoários da família Tripanosomatidae foi rapidamente reconhecida no meio acadêmico, sendo publicadas diversas revisões que abordavam essencialmente esse tema (HENDERSON; FAIRLAMB, 1987; LEID; SUQUET; TANIGOSHI, 1989; MURGOLO; CERAMI; HENDERSON, 1989; FAIRLAMB, 1990a, 1990b).

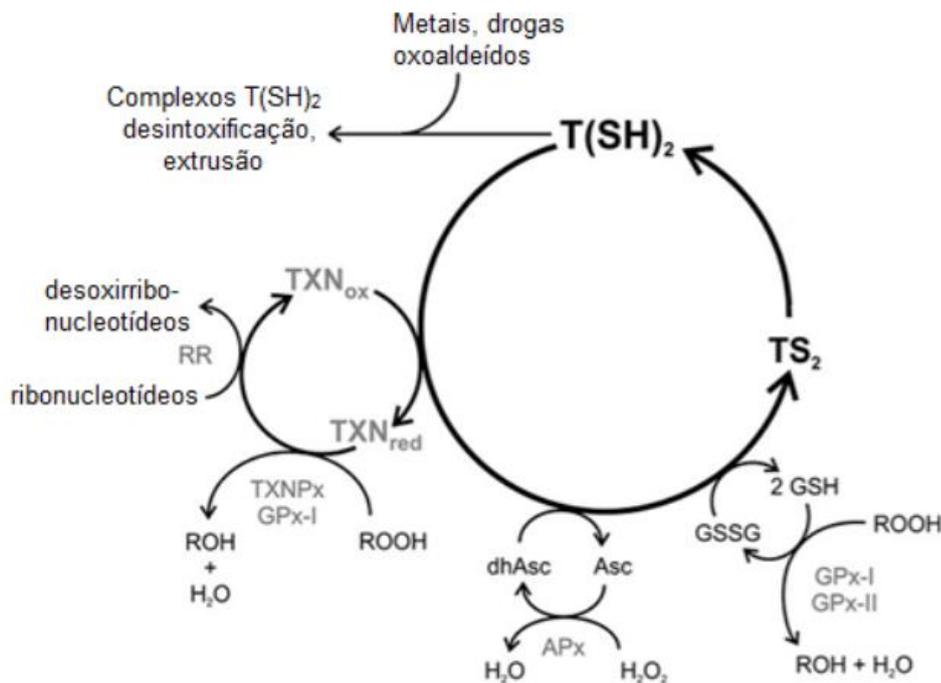


Figura 1.20 - Reações dependentes da tripanotona redutase. A tripanotona é mantida na sua forma reduzida ($T(SH)_2$), numa reação catalisada pela tripanotona redutase (TR). $T(SH)_2$ pode reduzir a triparredoxina (TXN), desidroascorbato (dhAsc) para ascorbato (Asc), glutatona oxidada (GSSG) para a glutatona reduzida (GSH). Através destes intermediários, $T(SH)_2$ participa na síntese de desoxirribonucleotídeos e decomposição de peróxidos. $T(S)_2$ também pode interagir diretamente com eletrófilos na desintoxificação do oxoaldeídos, metais e drogas. RR = redutase ribonucleotídeo; ROOH = hidroperóxidos; TXNPx = triparredoxina peroxidase; GPx-I, GPx-II = glutatona- peroxidase; APx = peroxidase dependente de ascorbato. Adaptado IRIGOÍN et al., 2008.

Estruturalmente a TR é um dímero, onde cada subunidade possui 491 aminoácidos (Figura 1.21). Cada monômero é formado por 3 diferentes domínios: domínio FAD (resíduos 1-160; 289-360) (Figura 1.22B), domínio NADPH (resíduos 161-289) (Figura 1.22C) e domínio de interface (resíduos 361-488) (Figura 1.22D) (COLOTTI; ILARI, 2011).

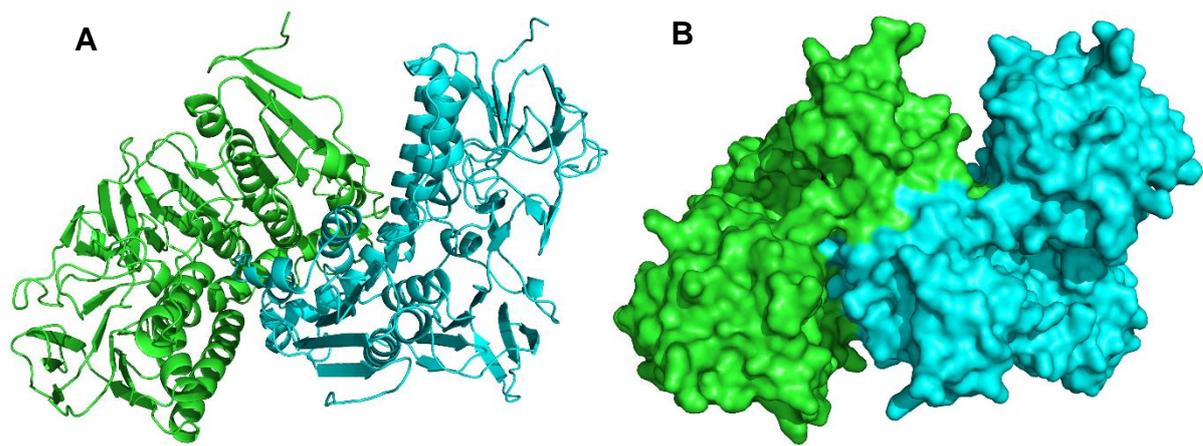


Figura 1.21 - Estrutura conformacional 3D da tripanotona redutase. A estrutura da TR utilizada foi a pdb 4ADW. Cada subunidade da enzima está representada pelas cores verde e azul. Representação em (A) cartoon e (B) superfície. A imagem foi gerada utilizando o programa PyMOL.

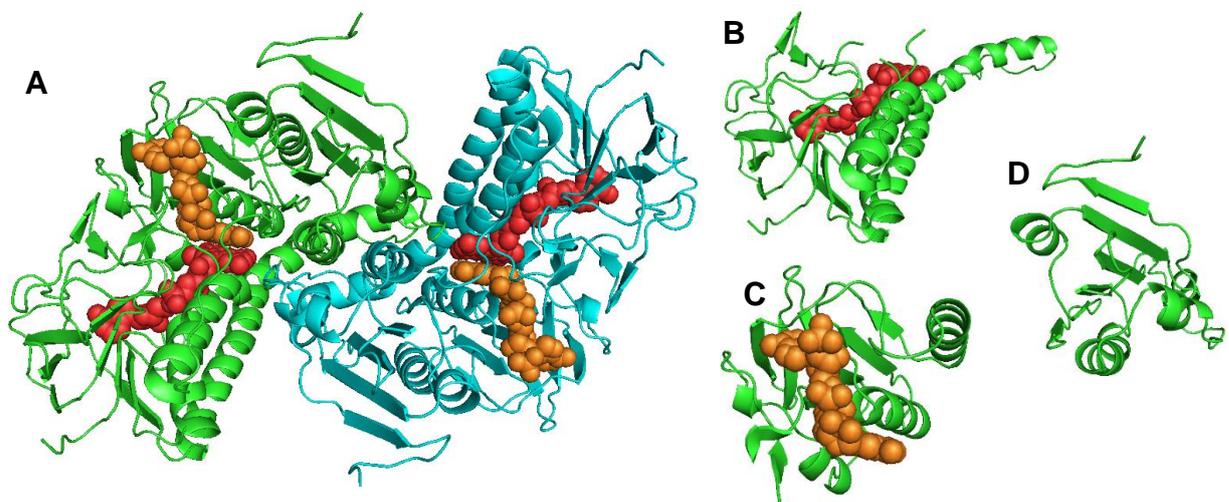


Figura 1.22 - Domínios da tripanotona redutase. A estrutura da TR utilizada foi a pdb 4ADW. Cada subunidade da enzima está representada pelas cores verde e azul. Os domínios da TR estão representados a seguir: (B) Domínio FAD, o FAD está representado em vermelho; (C) Domínio NADPH, o NADPH em laranja; e (D) Domínio de interface. A imagem foi gerada utilizando o programa PyMOL.

Funcionalmente a TR e a glutathione redutase – presente em mamíferos – são extremamente semelhantes. Porém estruturalmente elas apresentam aproximadamente 40% de similaridade. O *pocket* catalítico da TR é bastante grande e revestido de resíduos hidrofóbicos e carregados eletronegativamente, enquanto que os resíduos presentes no sítio da glutathione redutase são carregados positivamente. Essa diferença pode ser a principal razão da seletividade para a busca de novos compostos para o tratamento das leishmanioses (ILARI et al., 2017).

Após a ligação do NADPH e a consequente transferência do elétron para FAD, a redução da ponte de dissulfeto Cys52-Cys57 ocorre pela formação de um complexo de transferência de carga transitória entre a flavina e o tiolato da Cys57. Após a entrada de tripanotona oxidada no sítio ativo da TR, a Cys52 ataca

nucleofilicamente a ponte dissulfeto de tripanotona oxidada, formando com ela um dissulfeto misto, que é resolvido pelo ataque de Cys57 a Cys52. Finalmente, ocorre a formação da ponte dissulfeto Cys52-Cys57 e a liberação de tripanotona reduzida. Um quarto resíduo essencial neste mecanismo é Glu-466, o qual foi demonstrado ser essencial na orientação da histidina catalítica na reação descrita acima (HUNTERL et al., 1992; ILARI et al., 2017) (Figura 1.23).

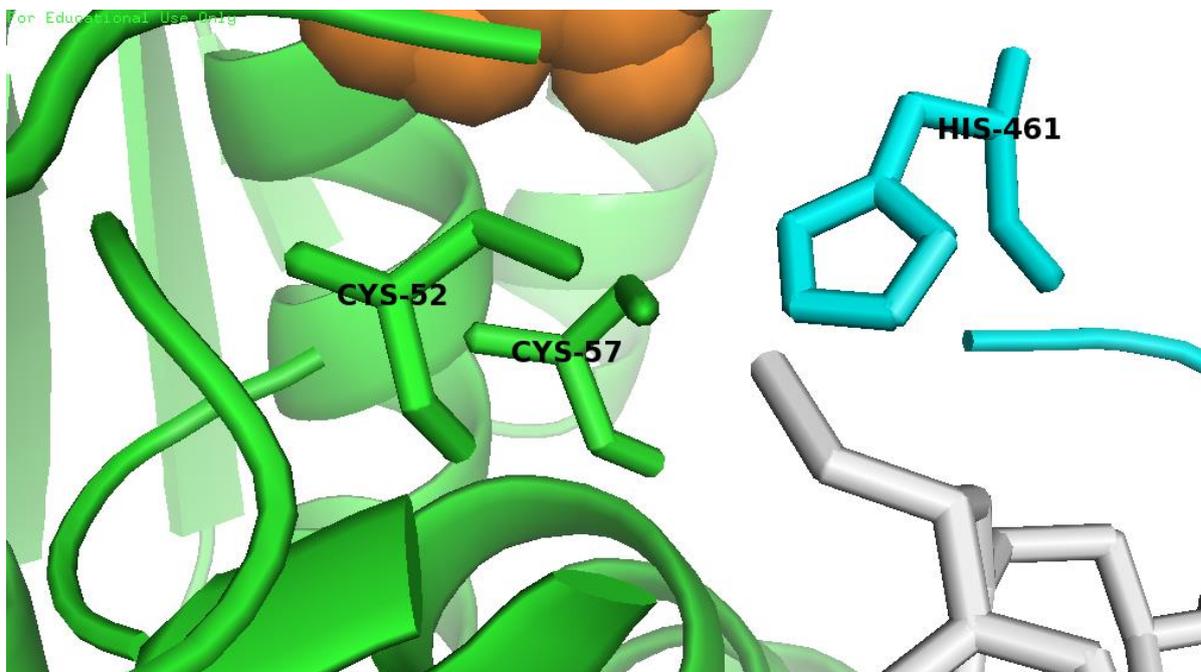


Figura 1.23 - Sítio ativo da tripanotona redutase. A estrutura da TR utilizada foi a pdb 4ADW. Cada subunidade da enzima está representada pelas cores verde e azul. Em laranja, NADPH; em branco está representada a tripanotona oxidada. A imagem foi gerada utilizando o programa PyMOL.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade *in vitro* e o mecanismo molecular de ação com o envolvimento da tripanotiona redutase da epigallocatequina-3-galato (EGCG) em *Leishmania infantum* e demonstrar o efeito da EGCG em associação com os fármacos utilizados na clínica para o tratamento das leishmanioses, bem como o seu efeito terapêutico em modelo experimental murino de leishmaniose visceral.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os valores de IC₅₀ e IC₉₀ da EGCG, miltefosina e anfotericina B em promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar o tipo de interação da EGCG em terapia combinada com miltefosina ou anfotericina B em promastigotas;
- Mensurar a produção de ROS em promastigotas tratadas com EGCG;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial em promastigotas tratadas com EGCG;
- Mensurar os níveis de ATP intracelular de promastigotas tratadas com EGCG;
- Determinar a atividade enzimática da tripanotiona redutase de promastigotas tratadas com EGCG;
- Demonstrar o efeito da EGCG na TR de promastigotas de *L. infantum*;
- Realizar estudos de interação e modelagem molecular entre a EGCG e a tripanotiona redutase;
- Investigar o efeito da EGCG em amastigotas intracelulares de *L. infantum*;
- Avaliar o efeito *in vivo* da EGCG em modelo experimental murino de leishmaniose visceral.

3. Material e métodos

3.1 Fármacos

A epigalocatequina-3-galato (EGCG), miltefosina e anfotericina B foram adquiridas comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). O antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto Nacional de Infectologia (INI/FIOCRUZ).

3.2 Parasitos

Amastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP263) foram isoladas de camundongos BALB/c e mantidos como promastigotas a 26°C em meio Schneider (Sigma Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Para a manutenção dos parasitos, foram feitas passagens duas vezes por semana e mantidos sucessivamente até, no máximo, a décima passagem.

3.3 Animais

Para a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizados camundongos *Mus musculus* da linhagem BALB/c fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ). Todos os protocolos usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA L0-11/2017).

3.4 Ensaios *in vitro*

A atividade *in vitro* da EGCG foi avaliada em ambas as formas de *L. infantum*, incubando-as em diferentes concentrações do composto, por diferentes períodos. Já o efeito da miltefosina e anfotericina B foi avaliado na forma promastigota.

3.4.1 Atividade antipromastigota

O efeito da EGCG, miltefosina e anfotericina B em promastigotas de *L. infantum* foi avaliado por resazurina. Para isso, 1×10^6 parasitos/mL foram incubados com concentrações crescentes de um dos compostos (15,6µM – 1000µM; 1,56µM – 100µM e 0,02 µM – 1,25µM; respectivamente) em placa de 96 poços com volume final de 200µL por 72 horas a 26°C. A viabilidade celular foi determinada através da adição de 500µM de resazurina e incubados por 1 hora em estufa de 26°C. Em seguida, as células viáveis foram mensuradas em fluorímetro (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com comprimento de onda excitação de 560nm e de emissão de 590nm. O cálculo do IC₅₀ e do IC₉₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica não linear no programa *GraphPad Prism 7.0*.

3.4.2 Terapia combinada

A associação da EGCG com os fármacos utilizados na clínica para o tratamento das leishmanioses sobre promastigotas de *L. infantum* foi avaliada pelo método de isoblograma (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). As concentrações dos fármacos (EGCG/miltefosina ou EGCG/anfotericina B) foram preparadas em proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 seguidas de diluições seriadas (base 2) com um volume final de 200µL em placa de 96 poços partindo de uma concentração máxima de 1000µM, 100µM e 1,25µM para EGCG, miltefosina e anfotericina B, respectivamente. As placas foram incubadas por 72 horas em estufa a 26°C. Em seguida, a viabilidade celular foi determinada fluorimetricamente por resazurina. Para cada proporção, o IC₅₀ e IC₉₀ foi calculado para cada um dos fármacos. O efeito da combinação entre EGCG/miltefosina ou EGCG/anfotericina B foi avaliado através do Índice da Concentração Inibitória Fracionada (FICI), obtido através da seguinte equação:
$$\sum FICI = \left(\frac{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } A+B}{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } A} \right) + \left(\frac{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } B+A}{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } B} \right)$$
. A média da soma dos valores do FICI para cada proporção foi interpretada como sinérgica para valores ≤ 0,5; aditiva para valores > 0,5 e < 4 e antagônica para valores > 4 como recomendado por Odds (ODDS, 2003).

3.4.3 Atividade antiamastigota

A atividade da EGCG sobre amastigotas intracelulares de *L. infantum* foi avaliada em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após a lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI (Sigma Aldrich) a 4°C suplementado com 10% SFB, 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina, glutamina (1mM) e piruvato (0,5mM). Posteriormente, 500µL de 2x10⁶ células/mL foram adicionadas a placa de 24 poços contendo 1 lamínula por poço e incubados por 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Em seguida, os poços foram lavados com RPMI a 37°C para a remoção das células não aderentes. Os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* na proporção de 5:1 (5 promastigotas para 1 macrófago), e incubadas por 4 horas a 37°C e 5% CO₂. Após a infecção, os poços foram lavados com meio RPMI a 37°C para a retirada dos parasitos livres e, em seguida, incubados por 72 horas a 37°C e 5% CO₂ juntamente com concentrações crescentes de EGCG (3µM – 24µM) e 2% de soro equino inativado. Após o período de incubação, as lamínulas foram submetidas à coloração pelo corante hematológico InstantProv (Newprov, Curitiba, Brasil) e a atividade antiamastigota foi

avaliada microscopicamente contando, pelo menos, 200 macrófagos por amostra. O resultado foi expresso pela porcentagem do índice de infecção (IF), obtido pela seguinte equação: $IF = \frac{\% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{amastigotas totais}}{\text{macrófagos totais}}$. O cálculo do IC₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 7.0*.

3.5 Mecanismo de ação

O estudo do mecanismo de ação de promastigotas tratadas com EGCG foi realizado investigando diferentes parâmetros biológicos e bioquímicos do parasito, como o acúmulo de H₂O₂, a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, a determinação dos níveis de ATP intracelular e a inibição da tripanotona redutase.

3.5.1 Dosagem de H₂O₂

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de *L. infantum* tratados com concentrações crescentes de EGCG foi avaliada pela utilização do *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina) e peroxidase (Invitrogen, Eugene, EUA) conforme adaptado de Menna-Barreto e colaboradores (MENNA-BARRETO et al., 2009). Promastigotas de *L. infantum* foram cultivados durante 72 horas na ausência ou presença de concentrações crescentes de EGCG (125µM, 250µM e 500µM). Após esse período, as culturas foram lavadas com HBSS e ajustadas a 2x10⁷ promastigotas/mL. Em seguida, 50µL dessa solução foi distribuída em placa de 96 poços, adicionado 50µL da solução de trabalho (*Amplex Red* 10µM, peroxidase 2U/mL e digitonina 64µM) e incubado por 30 minutos no escuro a 26°C. Para quantificar essa produção foi realizada uma curva padrão de H₂O₂ (0,08µM – 5µM). Logo após a leitura foi analisada colorimetricamente em um comprimento de onda de 590nm.

3.5.2 Determinação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de *L. infantum* tratadas com EGCG foi determinado fluorimetricamente utilizando o JC-1(iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbo-cianina) (Sigma Aldrich). Dessa forma, os parasitos foram incubados na ausência ou na presença de diferentes concentrações de EGCG por 72 horas (125µM – 500µM). Em seguida, as células foram lavadas e ajustadas para 1x10⁷ células/mL em tampão HBSS e incubadas com 10µg/mL de JC-1 por 10 minutos no escuro a 26°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos, ressuspensas em 1 mL de

HBSS e 200µL dessa solução foram distribuídas em placa negra de 96 poços. Os valores do potencial mitocondrial foram obtidos por espectrofluorimetria nos seguintes comprimentos de onda: 480 e 530/590 excitação e emissão, respectivamente. Os valores foram obtidos pela razão da emissão entre a fluorescência vermelho/verde (590/530). Para o controle positivo foi adicionado 20µM de FCCP (carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona), um desacoplador da membrana mitocondrial, por 20 minutos.

3.5.3 Avaliação nos níveis de ATP intracelular

A concentração intracelular de ATP em promastigotas de *L. infantum* foi avaliada conforme o protocolo do ensaio luminescente *CellTiter-Glo* (Promega, Wisconsin, EUA). As células foram tratadas em concentrações crescentes de EGCG por 72 horas e, após esse período, lavadas em PBS e ajustadas para a concentração de 1×10^7 promastigotas/200µL. Em seguida, 50µL da amostra foi transferida para uma placa de 96 poços, homogeneizada com o mesmo volume do reagente *CellTiter-Glo* e incubada no escuro por 10 minutos. Para quantificar essa produção foi realizada uma curva padrão de ATP (48,8nM – 781,25nM). A bioluminescência foi mensurada com a utilização do luminômetro GloMax®-Multi Microplate Multimode Reader (Promega).

3.5.4 Inibição da tripanotiona redutase

A capacidade da EGCG de inibir a tripanotiona redutase foi avaliada através do ensaio enzimático pelo método de Ellman e pelo estudo de interação e docagem molecular.

3.5.4.1 Ensaio enzimático da tripanotiona redutase

A atividade da tripanotiona redutase (TR) foi avaliada pela reação de Ellman (HAMILTON et al., 2003), que se baseia na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) a 2TNB(2-nitro-5-ácidotiobenzóico) pela tripanotiona reduzida $[T(SH)_2]$, levando a tripanotiona oxidada $[T(S)_2]$ que será regenerada para a $T(SH)_2$ pela TR. Para a obtenção da fração solúvel, promastigotas de *L. infantum* foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos, logo após o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em coquetel inibidor de proteases contendo Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8, sacarose 250mM, KCl 10mM, PMSF 1mM e E-64 10µM. Após a ressuspenso, a solução foi submetida a choque térmico com nitrogênio líquido, centrifugada a 17.500 g e o sobrenadante foi considerado

como a fração solúvel. A concentração de proteína foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (ThermoScientific). O meio de reação para avaliar a atividade enzimática foi composto por: Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NADPH 0,1mM; tripanotona oxidada (T[S]₂) 1μM e DTNB 0,1mM. A EGCG foi adicionada ao meio de reação em concentrações crescentes (7,8μM - 1000μM). A reação foi iniciada com a adição da fração solúvel na concentração final de 0,4mg/mL. A atividade da TR (formação do 2TNB-) foi avaliada colorimetricamente com comprimento de onda de 410nm (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) no tempo de 25 minutos. Como controle positivo para o ensaio foi utilizado 50μM de clomipramina, um conhecido inibidor da tripanotona redutase (RICHARDSON et al., 2009).

3.5.4.2 *Docking molecular*

Com o objetivo de estudar a interação da EGCG diretamente na tripanotona redutase foi realizado um estudo de *docking* molecular. Nesse intuito, foram utilizados como entrada as estruturas da EGCG e da tripanotona redutase obtidas através da base de dados online PubChem (CID 65064) e PDB (4ADW), respectivamente. Para o estudo, os ligantes FAD, NADPH e tripanotona reduzida foram removidos da estrutura original 4ADW. O estado de protonação foi assinalado no servidor ProKa em pH 7,4 utilizando campo de força AMBER (http://nbc-222.ucsd.edu/pdb2pqr_2.0.0/) (DOLINSKY et al., 2004). Para o assinalamento da carga dos ligantes foi utilizado o servidor PRODRG (<http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/cgi-bin/prodrg/submit.html>) (SCHÜTTELKOPF; VAN AALTEN, 2004). Em seguida, a busca por conformações de menor energia e/ou maior prevalência foi realizada através do programa Autodock 4.2. Foi realizada a busca por 500 conformações utilizando os parâmetros de algoritmo genético lamarckiano. O mapa eletrostático da TR foi calculado através da ferramenta APBS em pH 7,4 (<http://www.poissonboltzmann.org/>). As análises das interações realizadas com o programa PyMOL e a ferramenta Poseview (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de/>).

3.6 **Ensaio *in vivo***

Para avaliar a atividade da EGCG *in vivo*, camundongos BALB/c (5 animais por grupo) foram mantidos sob condições livre de patógenos específicos e inoculados com 2x10⁶ parasitos/100μL de promastigotas de *L. infantum* em fase estacionária por via intraperitoneal. Após 7 dias de infecção, os animais foram

separados em diferentes grupos e tratados por 5 dias consecutivos com diferentes doses. O esquema terapêutico proposto para o tratamento com a EGCG foi realizado pela administração por via oral duas doses ao dia do composto de 6,25mg/kg, 12,5 mg/kg ou 25mg/kg, atingindo uma dose máxima por dia de 12,5mg/kg/dia, 25mg/kg/dia e 50mg/kg/dia, respectivamente. O antimoniato de meglumina foi administrado por via intramuscular com a dose de 50mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina por via intramuscular e ao grupo controle não tratado foi administrado PBS (veículo da EGCG) por via oral. Os animais permaneceram 18 dias sem tratamento e após esse período foram eutanasiados de acordo com o Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ, totalizando 30 dias de experimento. O fígado dos animais foi retirado, pesado e macerado em meio de Schneider com 20% de SFB para a análise da carga parasitária pelo método de diluição limitante (LDA). A suspensão das células resultante foi diluída em série e o número de parasitos viáveis foi estimado a partir da maior diluição para a qual promastigotas cresceram após 7 dias de incubação a 26° C.

3.7 Análises estatísticas

Os estudos estatísticos dos dados foram realizados utilizando o teste *t* de Student e o teste de ANOVA pós-teste de Bonferroni usando o programa de computador *Graphpad Prima 7*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

4. Resultados

As leishmanioses representam um grave problema para a saúde pública atualmente devido a várias problemáticas como: ampla distribuição geográfica, diversas manifestações clínicas, elevados índices de mortalidade (na leishmaniose visceral), arsenal terapêutico limitado com casos de resistência já relatados em diferentes partes do mundo entre outras. Em 2007 foi realizado a 16ª Assembleia Mundial de Saúde, na qual foi proposto um plano de ação para o controle das várias doenças tropicais negligenciadas (WHO, 2012). Nesse contexto, foi emitido uma resolução na qual foi reconhecido que as leishmanioses compreendem uma das doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, bem como a gravidade da leishmaniose visceral. Dessa forma, foi estabelecido uma série de critérios necessários para a prevenção e combate das leishmanioses. Uma das estratégias que vem sendo estimuladas é a busca de novos fármacos com características essenciais que visem suprir as desvantagens e problemáticas encontradas no tratamento utilizado atualmente. Dentre essas metas estão: fármaco seguro, eficiente, com um esquema terapêutico curto, que apresente baixa toxicidade e que possibilite a interação com outros medicamentos (WHO, 2007). Ao longo dos anos o nosso grupo vem atuando na busca de novos fármacos com essas características.

4.1 Ensaios *in vitro*

Os produtos naturais vem recebendo um merecido destaque devido ao seu grande potencial terapêutico e trabalhos anteriores do nosso grupo já demonstraram a capacidade de diferentes flavonoides no combate a leishmaniose tegumentar, como a quercetina (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013), apigenina (FONSECA-SILVA et al., 2015, 2016) e a epigallocatequina-3-galato (INACIO et al., 2012, 2014; INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013). Seguindo a busca de um fármaco que apresente as características desejáveis pela OMS, decidimos investigar o efeito da EGCG em *L. infantum*, uma das espécies responsáveis pela leishmaniose visceral, *in vitro* e *in vivo* e propor o seu mecanismo de ação.

4.1.1 Atividade antipromastigota

Para dar início ao nosso estudo, estabelecemos o efeito da EGCG e a sua associação com os fármacos utilizados atualmente no combate das leishmanioses sob a forma promastigota analisando a viabilidade celular dos parasitos após o tratamento com EGCG, miltefosina ou anfotericina B pelo ensaio com a resazurina. Esse método se baseia na redução da resazurina em resorufina pelas células

metabolicamente ativas, convertendo a resazurina não fluorescente em resorufina fluorescente. Essa conversão é proporcional ao número de células viáveis, gerando uma medida quantitativa da viabilidade celular.

Portanto, incubamos por 72 horas 1×10^6 promastigotas/ml com diferentes concentrações de EGCG, miltefosina e anfotericina B e avaliamos a viabilidade celular com resazurina. A EGCG, juntamente com os outros fármacos, atuaram de forma significativa nos parasitos demonstrando um efeito dose-dependente (Figura 4.1) com valores de IC_{50} e IC_{90} de $162 \mu M$ e $262,5 \mu M$ para EGCG, $6,4 \mu M$ e $14 \mu M$ para miltefosina e $0,80 \mu M$ e $1,07 \mu M$ para anfotericina B (Tabela 4.1).

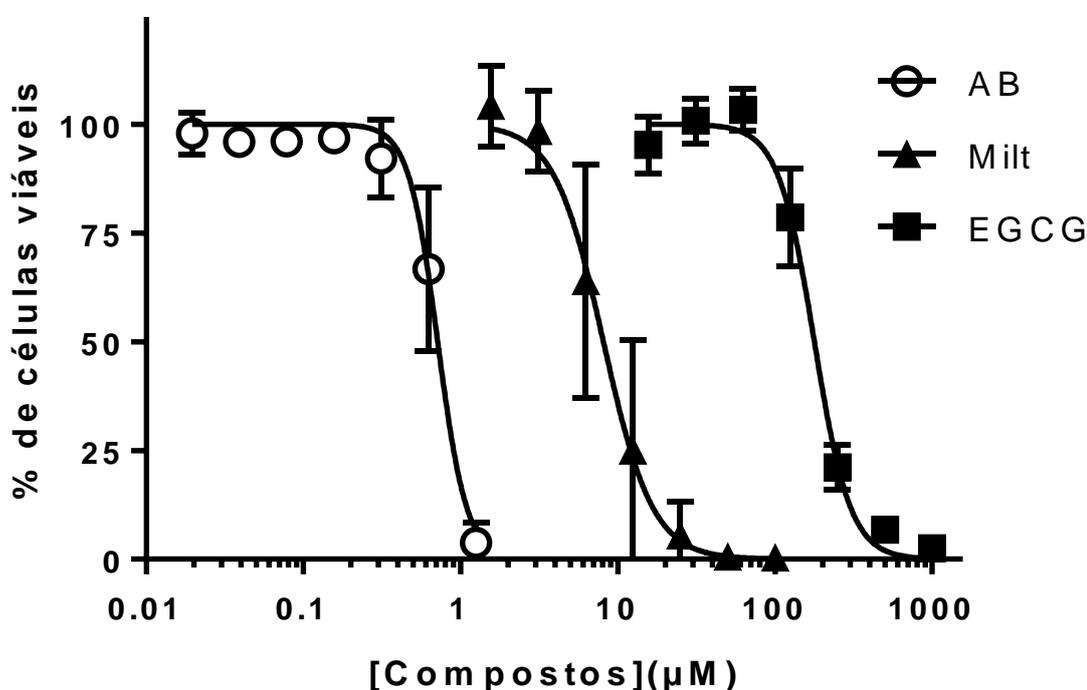


Figura 4.1 - Efeito da EGCG, miltefosina e anfotericina B na proliferação celular de promastigotas de *L. infantum*. 1×10^6 parasitos/ml foram incubados na ausência ou presença de EGCG ($15,6 \mu M$ – $1000 \mu M$) [■], miltefosina (Milt) ($1,56$ – $100 \mu M$) [▲] ou anfotericina B (AB) ($0,02$ – $1,25 \mu M$) [○] por 72 horas. A viabilidade celular foi analisada com a adição de resazurina e avaliada por fluorimetria. Os dados expressam a porcentagem de células viáveis em relação ao controle. Os valores mostram a média de 3 experimentos independentes. $P < 0,001$ (ANOVA).

Tabela 4.1 - Valores de IC_{50} e IC_{90} .

Compostos	$IC_{50}(\mu M)$	$IC_{90}(\mu M)$
EGCG	$162,0 \pm 6,6$	$262,5 \pm 11,1$
Miltefosina	$6,4 \pm 0,5$	$14,0 \pm 2,5$
Anfotericina B	$0,80 \pm 0,20$	$1,07 \pm 0,09$

4.1.2 Terapia combinada

Uma das estratégias que vem sendo utilizadas como alternativa para o tratamento clínico da leishmaniose é a associação de fármacos conhecidos, anfotericina B lipossomal/miltefosina, paramomicina/antimonial e paramomicina/miltefosina ou destes com possíveis novos compostos e possíveis substâncias que podem potencializar seu efeito. Nesse contexto, avaliamos o efeito da associação da EGCG com miltefosina ou anfotericina B em promastigotas de *L. infantum* seguindo o protocolo estabelecido por Fivelman e colaboradores (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Os parasitos foram cultivados em diferentes concentrações do fármaco sozinho ou associado e realizadas em diferentes proporções. Após 72 horas a viabilidade celular foi avaliada pelo método de rezasurina conforme descrito para a atividade em promastigotas. Para cada proporção, o IC₅₀ e IC₉₀ foi calculado para cada um dos fármacos. O efeito da combinação entre EGCG e miltefosina ou EGCG e anfotericina B foi avaliado através do somatório do Índice da Concentração Inibitória Fracional (FICI) A média do somatório do FICI ($\bar{x}\Sigma FICI$) para cada proporção foi utilizada para a classificação do tipo de interação entre os fármacos, aonde se a $\bar{x}\Sigma FICI \leq 0,5$ é considerada uma interação sinérgica; $\bar{x}\Sigma FICI > 0,5 < 4$, aditiva e antagônica $\bar{x}\Sigma FICI > 4$, como recomendado por Odds (ODDS, 2003).

Em seguida, os valores de IC₅₀ e IC₉₀ foram definidos para cada proporção juntamente com o índice de concentração inibitória fracional (FICI₅₀ e FICI₉₀) (Tabela 4.2 e Tabela 4.3).

Tabela 4.2 - Valores de IC₅₀ e FICI₅₀ da associação da EGCG com miltefosina.

EGCG/Milt	IC ₅₀ (μ M)		FICI ₅₀		$\Sigma FICI_{50}$	$\bar{x}\Sigma FICI_{50}$
	EGCG	Milt	EGCG	Milt		
5:0	162,0 \pm 6,6	-	-	-	-	
4:1	128,9 \pm 10,6	3,2 \pm 0,3	0,79 \pm 0,05	0,5 \pm 0,03	1,29	
3:2	94,4 \pm 9,6	6,3 \pm 0,6	0,58 \pm 0,03	0,98 \pm 0,0	1,56	
				0		1,30
2:3	39,6 \pm 8,4	5,9 \pm 1,3	0,24 \pm 0,04	0,92 \pm 0,1	1,16	
1:4	23,7 \pm 5,8	6,7 \pm 0,4	0,14 \pm 0,04	1,04 \pm 0,0	1,18	
				7		
0:5	-	6,4 \pm 0,5	-	-	-	

Os valores do $\Sigma FICI_{50}$ foram obtidos através dos valores do IC₅₀. Os dados são expressos em média \pm erro padrão (n=3).

Tabela 4.3 - Valores de IC_{90} e $FICl_{90}$ da associação da EGCG com miltefosina.

EGCG/Milt	$IC_{90}(\mu M)$		$FICl_{90}$		$\Sigma FICl_{90}$	$\bar{x}\Sigma FICl_{90}$
	EGCG	Milt	EGCG	Milt		
5:0	262,5±11,1	-	-	-	-	
4:1	226,0±17,6	5,6±0,4	0,86±0,0 9	0,4±0,03	1,26	
3:2	155,6±16,1	10,4±1,1	0,59±0,0 7	0,74±0,04	1,33	
2:3	75,2±14,7	11,3±2,2	0,29±0,0 5	0,80±0,2	1,09	1,23
1:4	38,7±7,6	15,5±3,0	0,15±0,0 4	1,11±0,1	1,26	
0:5	-	14,0±2,5	-	-	-	

Os valores do ΣFIC_{90} foram obtidos através dos valores do IC_{90} . Os dados são expressos em média \pm erro padrão ($n=3$).

Com os valores do IC_{50} e IC_{90} e do $FICl_{50}$ e $FICl_{90}$ de cada proporção foi obtido o isoblograma para a associação da EGCG com miltefosina (Figura 4.2 e Figura 4.3).

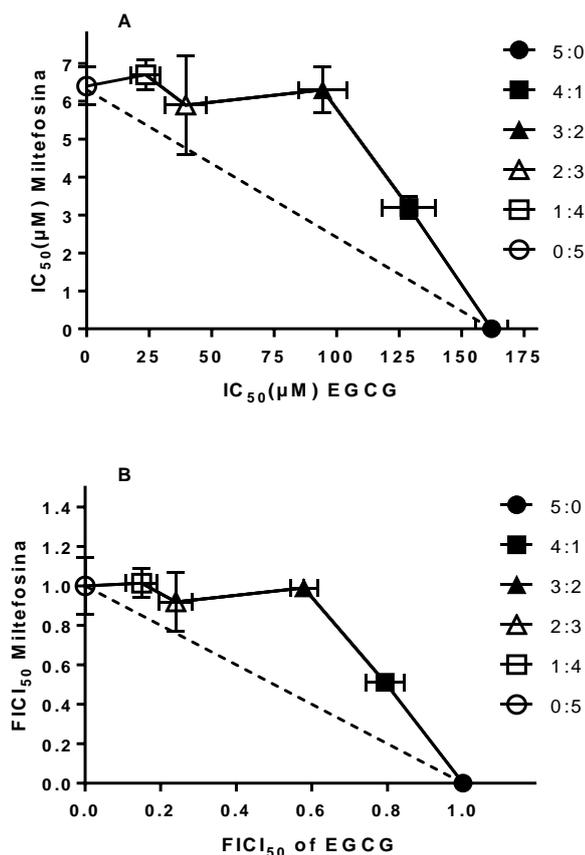


Figura 4.2 - Valores de IC_{50} e $FICl_{50}$ da associação da EGCG com miltefosina. As concentrações de EGCG com miltefosina foram preparadas em diferentes proporções (5:0 [●], 4:1 [■], 3:2 [▲], 2:3 [△], 1:4 [□] e 0:5 [○]). (A) Os valores de IC_{50} foram obtidos e o índice de concentração inibitória foi calculado. (B) A soma dos valores do $FICl_{50}$ da EGCG sozinha ou em combinação com miltefosina está representada por cada ponto da curva. Cada ponto foi comparado com a linha de aditividade (linha pontilhada).

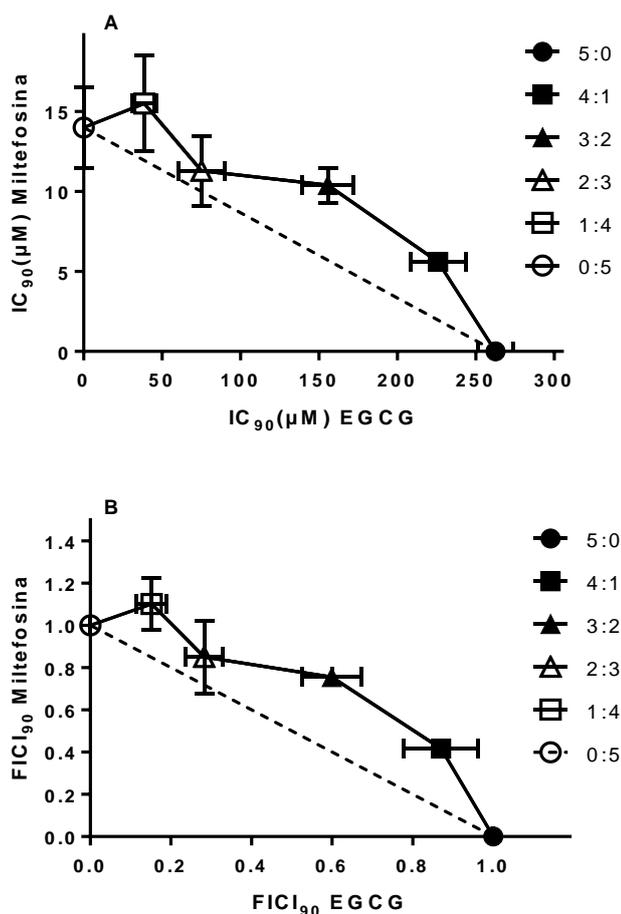


Figura 4.3 - Valores de IC₉₀ e FICl₉₀ da associação da EGCG com miltefosina. As concentrações de EGCG com miltefosina foram preparadas em diferentes proporções (5:0 [●], 4:1 [■], 3:2 [▲], 2:3 [△], 1:4 [□] e 0:5 [○]). (A) Os valores de IC₉₀ foram obtidos e o índice de concentração inibitória foi calculado. (B) A soma dos valores do FICl₉₀ da EGCG sozinha ou em combinação com miltefosina está representada por cada ponto da curva. Cada ponto foi comparado com a linha de aditividade (linha pontilhada).

Os valores obtidos da $\bar{x}\Sigma FICl_{50}$ e $\bar{x}\Sigma FICl_{90}$ da combinação da EGCG com miltefosina foram de 1,3 (Tabela 4.2) e 1,23 (Tabela 4.3). Esses valores demonstraram que a combinação de EGCG mais miltefosina obteve efeito aditivo.

A mesma metodologia foi empregada para determinar o efeito da associação da EGCG com a anfotericina B. Os valores de IC₅₀ e IC₉₀ foram definidos para cada proporção juntamente com o índice de concentração inibitória fracional (FICl₅₀ e FICl₉₀) (Tabela 4.4 e Tabela 4.5).

Tabela 4.4 - Valores de IC_{50} e $FICI_{50}$ da associação da EGCG com anfotericina B.

EGCG/AB	$IC_{50}(\mu M)$		$FICI_{50}$		$\Sigma FICI_{50}$	$\bar{x}\Sigma FICI_{50}$
	EGCG	AB	EGCG	AB		
5:0	162,0±6,6	-	-	-	-	1,00
4:1	151,2±3,5	0,05±0,00	0,93±0,04	0,06±0,00	0,99	
3:2	147,6±13,7	0,12±0,01	0,91±0,05	0,15±0,03	1,06	
2:3	132,5±8,8	0,25±0,02	0,82±0,05	0,31±0,04	1,13	
1:4	66,8±5,1	0,33±0,02	0,41±0,04	0,42±0,07	0,83	
0:5	-	0,80±0,2	-	-	-	

Os valores do $\Sigma FICI_{50}$ foram obtidos através dos valores do IC_{50} . Os dados são expressos em média \pm erro padrão (n=3).

Tabela 4.5 - Valores de IC_{90} e $FICI_{90}$ da associação da EGCG com anfotericina B.

EGCG/AB	$IC_{90}(\mu M)$		$FICI_{90}$		$\Sigma FICI_{90}$	$\bar{x}\Sigma FICI_{90}$
	EGCG	AB	EGCG	AB		
5:0	262,5±11,1	-	-	-	-	1,04
4:1	257,4±17,9	0,08±0,00	0,98±0,05	0,07±0,00	1,05	
3:2	275,7±16,8	0,23±0,01	1,05±0,02	0,21±0,02	1,26	
2:3	197,9±2,5	0,37±0,00	0,75±0,02	0,35±0,04	1,10	
1:4	89,7±2,5	0,44±0,01	0,34±0,01	0,41±0,06	0,75	
0:5	-	1,07±0,09	-	-	-	

Os valores do $\Sigma FICI_{90}$ foram obtidos através dos valores do IC_{90} . Os dados são expressos em média \pm erro padrão (n=3).

Com os valores do IC_{50} e IC_{90} e do $FICI_{50}$ e $FICI_{90}$ de cada proporção foi obtido o isoblograma para a associação da EGCG com anfotericina B (Figura 4.4 e Figura 4.5).

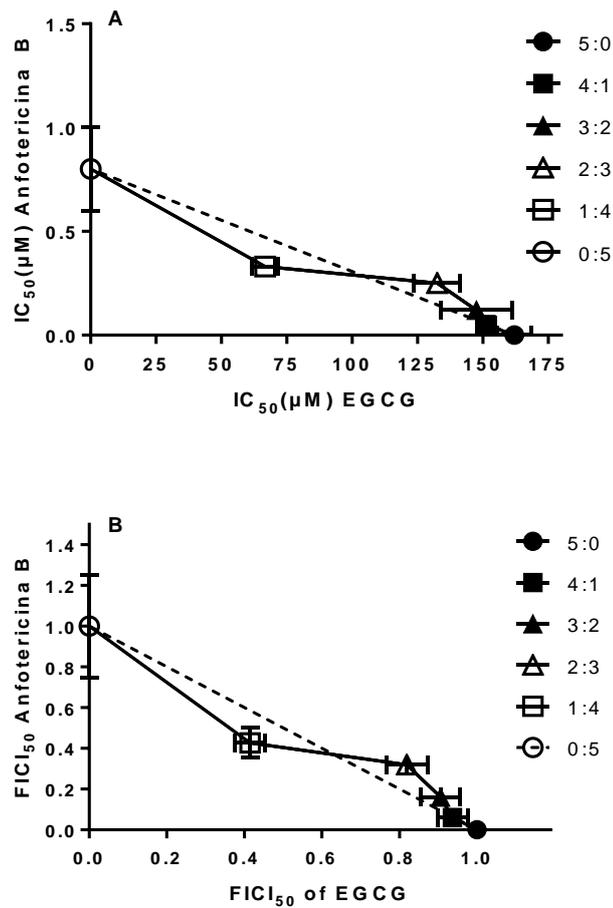


Figura 4.4 - Valores de IC₅₀ e FIC₅₀ da associação da EGCG com anfotericina B. As concentrações de EGCG com anfotericina B foram preparadas em diferentes proporções (5:0 [●], 4:1 [■], 3:2 [▲], 2:3 [△], 1:4 [□] e 0:5 [○]). (A) Os valores de IC₅₀ foram obtidos e o índice de concentração inibitória foi calculado. (B) A soma dos valores do FIC₅₀ da EGCG sozinha ou em combinação com anfotericina B está representada por cada ponto da curva. Cada ponto foi comparado com a linha de aditividade (linha pontilhada).

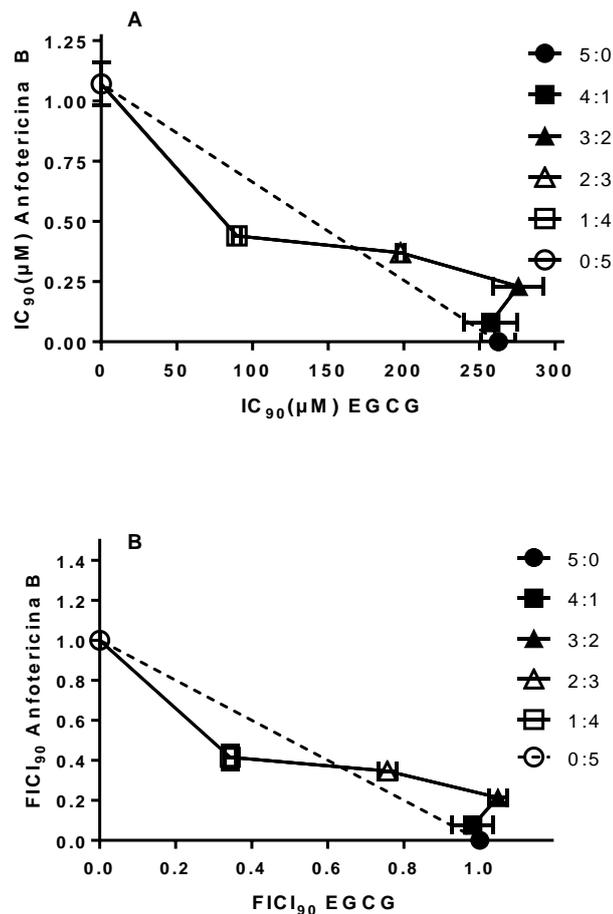


Figura 4.5 - Valores de IC_{90} e $FICl_{90}$ da associação da EGCG com anfotericina B. As concentrações de EGCG com anfotericina B foram preparadas em diferentes proporções (5:0 [●], 4:1 [■], 3:2 [▲], 2:3 [△], 1:4 [□] e 0:5 [○]). (A) Os valores de IC_{90} foram obtidos e o índice de concentração inibitória foi calculado. (B) A soma dos valores do $FICl_{90}$ da EGCG sozinha ou em combinação com anfotericina B está representada por cada ponto da curva. Cada ponto foi comparado com a linha de aditividade (linha pontilhada).

Os valores da $\bar{\Sigma}FICl_{50}$ e $\bar{\Sigma}FICl_{90}$ da combinação da EGCG com anfotericina B foram de 1,00 (Tabela 4.4) e 1,04 (Tabela 4.5). Esses valores demonstraram que a combinação de EGCG mais anfotericina B obteve efeito aditivo.

4.2 Estudo do mecanismo de ação

Para que um determinado composto siga adiante no desenvolvimento de um novo medicamento é necessário que tenha um mecanismo de ação definido (KATSUNO et al., 2015). Nesse intuito, investigamos o mecanismo de ação da EGCG em promastigotas de *L. infantum*.

4.2.1 Dosagem de H₂O₂

Os flavonoides são amplamente reconhecidos pelo seu alto potencial terapêutico, onde em diversos modelos experimentais ocorrem o envolvimento de

espécies reativas de oxigênio como parte do seu mecanismo de ação (LI et al., 2009; SUH et al., 2010; BISHAYEE et al., 2013) Anteriormente o nosso grupo já havia demonstrado o acúmulo de espécies reativas de oxigênio em *L. braziliensis* após o tratamento com EGCG (INACIO et al., 2014). Dessa forma, investigamos a concentração de H₂O₂ em promastigotas de *L. infantum* na ausência ou na presença de EGCG por AmplexRed, um marcador que é capaz de reagir especificamente com H₂O₂, gerando um produto fluorescente, resorufina, que quando excitado é capaz de emitir uma fluorescência em um comprimento de onda específico. Portanto, aumento nos níveis de intensidade de fluorescência estaria relacionado com um aumento nos níveis de H₂O₂.

Após os parasitos serem incubados por 72 horas com diferentes concentrações de EGCG (125µM – 500µM), as células foram lavadas e ressuspensas em HBSS e a concentração de H₂O₂ foi determinada. O tratamento com EGCG induziu uma produção significativa nos níveis de H₂O₂ de maneira dose-dependente, aumentando aproximadamente 7 vezes o acúmulo de H₂O₂ em relação ao controle não tratado (Figura 4.6).

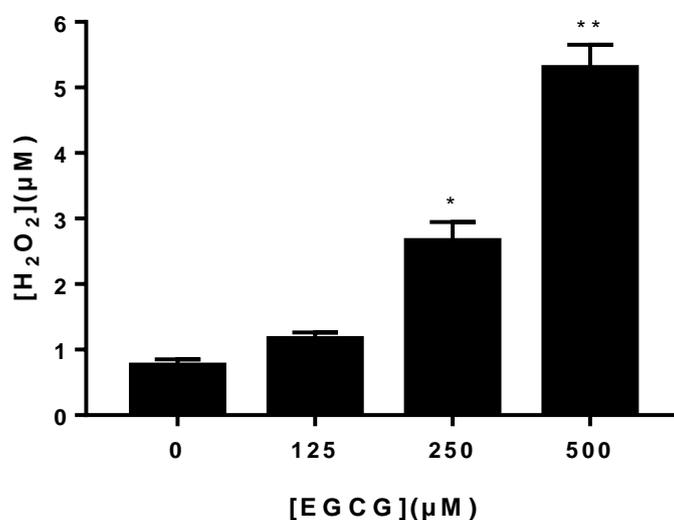


Figura 4.6 - Produção intracelular de H₂O₂. Promastigotas de *L. infantum* foram incubadas com diferentes concentrações de EGCG por 72 horas. A dosagem foi feita após as células serem lavadas e incubadas com Amplex Red por 30 minutos e a leitura foi realizada em fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 560nm e emissão de 590nm. Os dados foram expressos pela média ± erro padrão da concentração de H₂O₂ presente nas células (n=3). ANOVA p<0,0001. Diferença significativa em relação ao controle * p<0,001, ** p<0,0001.

4.2.2 Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Diferentes grupos já correlacionaram que um aumento nos níveis de ROS pode desencadear uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (FIDALGO; GILLE, 2011; GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2012) e uma característica geral de todos os tripanosomatídeos é que eles apresentam uma única mitocôndria, isso torna esta organela atrativa como alvo terapêutico, pois está diretamente envolvida na produção de ATP através da fosforilação oxidativa. Nos metazoários, mitocôndrias viáveis podem compensar o mau funcionamento daquelas que foram danificadas. Entretanto, em *Leishmania*, o processo de sobrevivência está relacionado diretamente com o funcionamento dessa única organela e, em última instância, de sua cadeia respiratória (GLEW et al., 1988; SHAHA, 2006).

Devido a essa importância, investigamos o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. infantum* utilizando o marcador fluorescente JC-1. Quando o $\Delta\Psi_m$ está intacto, a diferença de potencial gerada através da membrana mitocondrial interna (negativa do lado interno) leva ao acúmulo de substâncias solúveis em lipídeos dentro da mitocôndria. Dessa forma, em altos $\Delta\Psi_m$, o corante lipofílico JC-1 se acumula e forma agregados no interior da mitocôndria, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no estado agregado o corante fluoresce vermelho. A emissão de fluorescência vermelha derivada da formação de agregados é, portanto, indicativa de um alto $\Delta\Psi_m$. Em células com danos mitocondriais ou alterações no $\Delta\Psi_m$, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e acumulando-se no citoplasma emitindo uma fluorescência verde. Assim, a formação e manutenção de agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico. A razão entre a fluorescência vermelha/verde (590/530) representa o potencial de membrana mitocondrial.

O tratamento com EGCG desencadeou uma diminuição dose dependente no potencial de membrana mitocondrial desses promastigotas. É possível observar na concentração de 500 μ M de EGCG uma diminuição altamente significativa do $\Delta\Psi_m$, de aproximadamente 86% em relação ao controle não tratado (Figura 4.7). Como controle positivo foi utilizado FCCP 20 μ M, eu conhecido desacoplador da membrana mitocondrial.

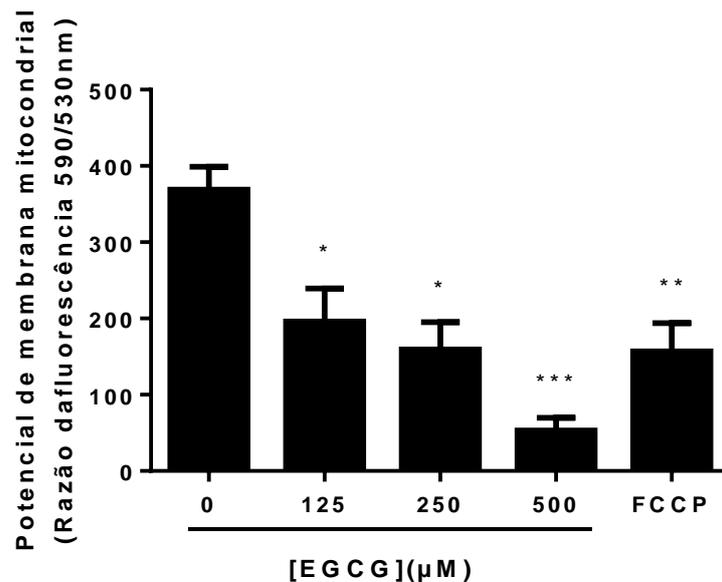


Figura 4.7 - Determinação do potencial de membrana mitocondrial. Promastigotas de *L. infantum* foram cultivados na ausência ou na presença de concentrações crescentes de EGCG por 72 horas foram incubados com 10µg/mL de JC-1. Os resultados foram obtidos fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação 480nm e emissão 530nm e 590nm. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão da razão entre os comprimentos de onda emissão 590nm/530nm. O controle positivo foi realizado com 20µM de FCCP (n=3). ANOVA $p < 0,001$. Diferença significa em relação ao controle. * $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p > 0,001$.

4.2.3 Determinação dos níveis de ATP intracelular

Já é bem descrito na literatura que alterações bioquímicas que levem para uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial dispara uma série de eventos que podem resultar na diminuição dos níveis intracelulares de ATP (FIDALGO; GILLE, 2011). Dessa forma, seguimos o estudo do mecanismo de ação da EGCG em promastigotas determinando os níveis de ATP intracelular pelo ensaio bioluminescente CellTiter-Glo. Esse reagente utiliza a luciferase para quantificar o ATP. A luciferase presente no reagente usa a luciferina e ATP das células como substrato de uma reação que produz a oxiluciferina, liberando energia em forma de luz que é captada pelo luminômetro. A intensidade do sinal luminescente dessa reação é proporcional à produção de ATP.

Portanto, promastigotas de *L. infantum* incubadas na ausência ou na presença de concentrações de EGCG por 72 horas foram lavadas e incubadas com o reagente CellTiter-Glo. A EGCG diminuiu significativamente a concentração intracelular de ATP desses parasitos exibindo um perfil dose dependente. É possível observar que na maior concentração utilizada a EGCG causou uma diminuição de aproximadamente 60% em relação ao controle não tratado (Figura 4.8).

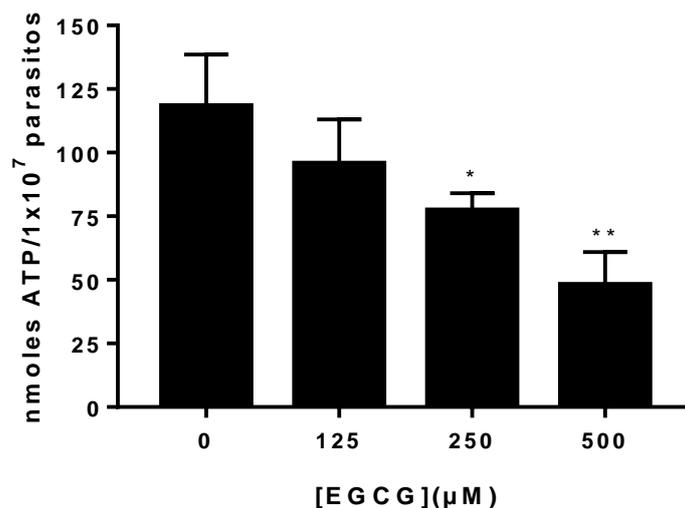


Figura 4.8 - Determinação dos níveis de ATP intracelular. Promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com concentrações crescentes de EGCG por 72 horas. Em seguida, as células lavadas e ajustadas para $1 \times 10^7 / 200 \mu\text{L}$. $50 \mu\text{L}$ de parasitos foram acrescentados a volumes iguais do reagente CellTiter-Glo e a bioluminescência foi obtida pelo luminômetro. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão da concentração de ATP intracelular dos parasitos ($n=3$). ANOVA $< 0,0001$. Diferença significativa em relação ao controle * $p < 0,005$, ** $p < 0,0001$.

4.2.4 Inibição da tripanotiona redutase

Em qualquer organismo vivo há a necessidade de um sistema responsável pela neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS). Nos tripanosomatídeos em geral, esse papel é desempenhado pela enzima tripanotiona redutase (TR), uma enzima presente somente nessa família e ausente em mamíferos. Essa característica a torna um excelente alvo terapêutico seletivo (FAIRLAMB; CERAMI, 1992). Os dados até aqui demonstram uma participação das ROS no mecanismo de ação da EGCG em promastigotas de *L. infantum* levando a perda do potencial de membrana mitocondrial e diminuição nos níveis de ATP intracelular. Com base nisto investigamos a participação da principal enzima do balanço redox desse parasito por dois métodos distintos: ensaio enzimático e modelagem molecular.

4.2.4.1 Ensaio enzimático da tripanotiona redutase

O ensaio enzimático realizado para investigar a capacidade da EGCG em inibir a atividade da TR de promastigotas de *L. infantum* foi mensurado pela reação de Ellman, que se baseia na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) a 2TNB(2-nitro-5-ácido tiobenzóico) pela tripanotiona reduzida $[T(SH)_2]$, levando a tripanotiona oxidada $[T(S)_2]$ que será regenerada para a $T(SH)_2$ pela TR.

Dessa forma, adicionamos a fração solúvel do extrato de promastigotas de *L. infantum* em diferentes concentrações de EGCG e analisamos o resultado pela

reação de Ellman. A EGCG inibiu significativamente a atividade da TR, demonstrando um perfil dose dependente com uma inibição de aproximadamente 65% em relação ao controle não tratado e um K_i de $511\mu\text{M}$ (Figura 4.9). Como controle positivo foi utilizado $50\mu\text{M}$ de clomipramina, um inibidor competitivo da tripanotona redutase (RICHARDSON et al., 2009)

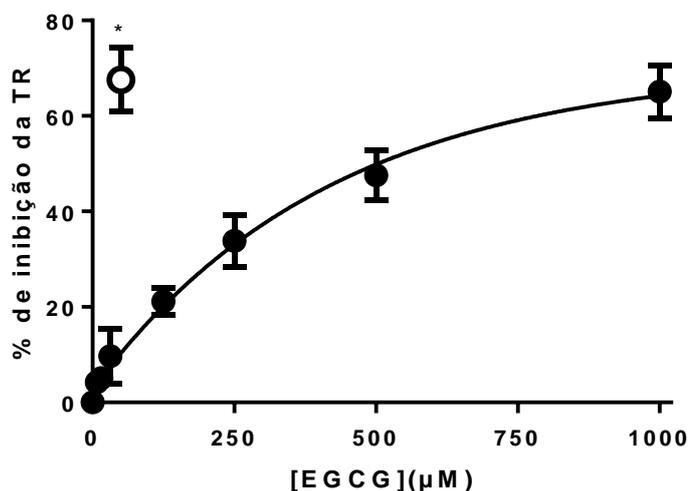


Figura 4.9 - Efeito da EGCG sobre a atividade da enzima tripanotona redutase. A atividade da EGCG na inibição da tripanotona redutase foi avaliada através do método de Ellman. Para isso, foi obtido um extrato parasitário de promastigotas de *L. infantum* que foi em seguida lisado, centrifugado e ressuspendido em tampão Tris-Hepes 40mM. Paralelamente, concentrações crescentes de EGCG ($7,8\mu\text{M}$ - $1000\mu\text{M}$) foram utilizadas para dosar a atividade da TR no extrato solúvel de promastigotas de *L. infantum*. A reação foi disparada com a adição de $0,4\text{mg/mL}$ de fração solúvel e incubada por 25 minutos. O controle positivo foi realizado com $50\mu\text{M}$ de clomipramina. Os resultados foram obtidos colorimetricamente com o comprimento de onda de 410nm . Dados expressos através da média \pm erro padrão da porcentagem de inibição da tripanotona redutase. ($n=3$). ANOVA $<0,0001$. Diferença significativa em relação ao controle * $p<0,001$.

4.2.4.2 Docking molecular

A inibição da enzima tripanotona redutase pela EGCG foi corroborada através de cálculos de *docking* molecular. Dessa forma, realizamos a docagem em duas regiões distintas (Figura 4.10), uma que compreende a área do sítio catalítico de interação do substrato com a enzima (Figura 4.10A) e a outra região compreende o local de interação do sítio de ligação do cofator (Figura 4.10B). Essas áreas consistem em duas fendas catalíticas carregadas negativamente ou positivamente para o local de interação do substrato (Figura 4.10A) ou do cofator (Figura 4.10B), respectivamente.

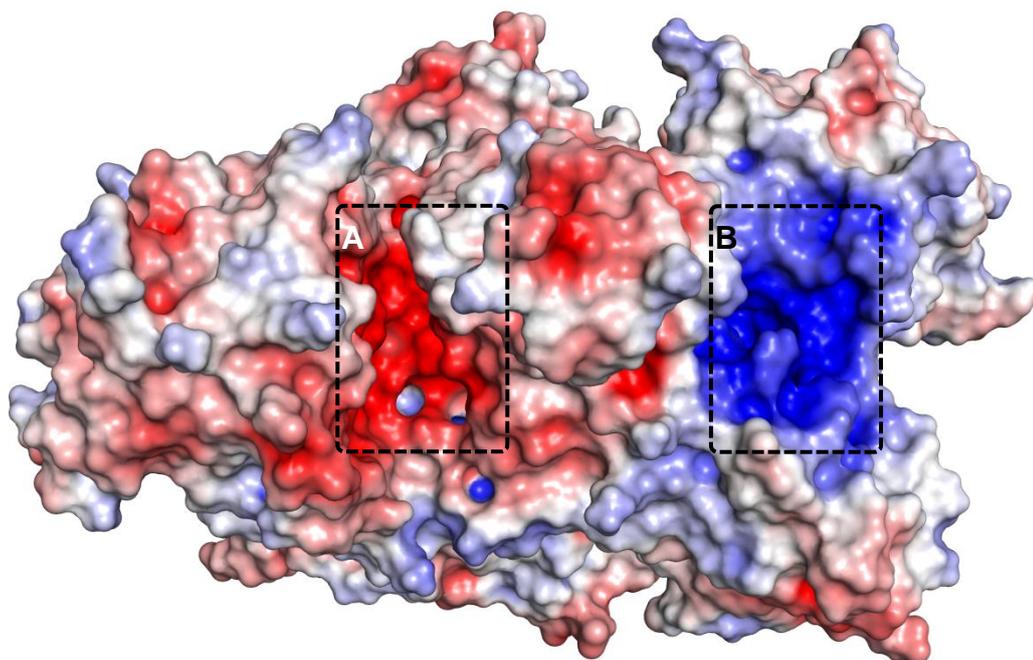


Figura 4.10 - Região para o estudo do docking. A TR de *L. infantum* foi escolhida a partir do site do Protein Data Bank, com o código de acesso 4ADW. A TR está representada pelo mapa de superfície eletrostática utilizando a ferramenta APBS. As áreas representadas em vermelho indicam regiões de superfície com potencial negativo, enquanto que as áreas em azul indicam regiões de superfície com potencial positivo. Duas regiões foram destacadas: (A) área para o estudo de interação da EGCG com o sítio catalítico e (B) área para o estudo da interação da EGCG no sítio do NADPH.

Para nos certificar dos parâmetros utilizados no estudo de docagem, realizamos um *redocking* dos ligantes cristalográficos nas áreas correspondentes a Figura 4.10. Nesse tipo de estudo o ligante utilizado no cálculo de *docking* é a estrutura que foi cristalizada juntamente com a enzima para os estudos de determinação de estrutura.

Dessa forma, demos de entrada a tripanotiona reduzida – que é o produto da reação da TR – presente na estrutura 4ADW e calculamos o *redocking* na região de interação entre a enzima e o substrato (Figura 4.10A). Conforme esperado, nossos cálculos demonstraram uma interação desfavorável entre a tripanotiona reduzida e a TR (Figura 4.11). O perfil linear dos *clusters* – agrupamento de conformações semelhantes – e altos valores de ΔG demonstram a inespecificidade da interação. Essa característica pode se dar ao fato da tripanotiona reduzida ser o produto da reação entre a tripanotiona oxidada e a TR.

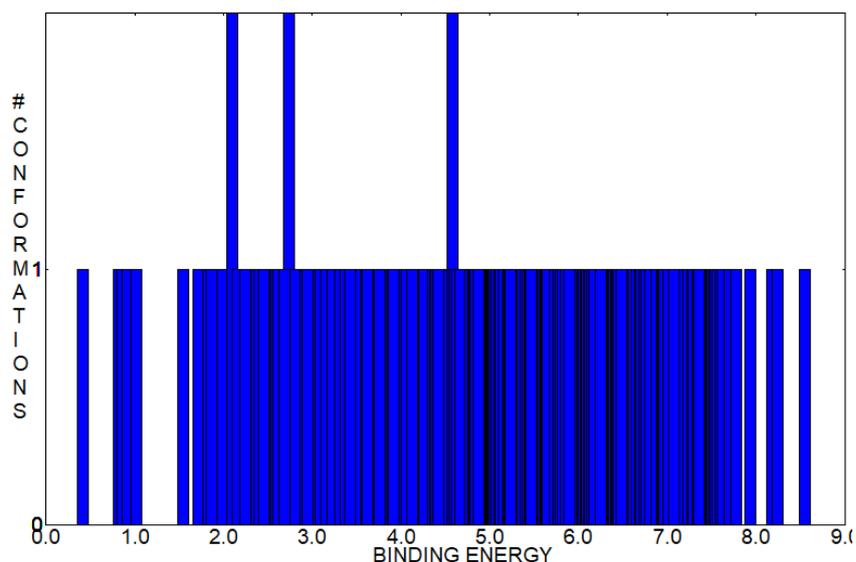


Figura 4.11 - Cluster do estudo de redocking entre a tripanotona reduzida e o sítio catalítico da TR. O redocking foi calculado utilizando a tripanotona reduzida da estrutura 4ADW como ligante na região do sítio catalítico da TR. Cada barra azul representa um cluster, grupo de estruturas com conformações semelhantes ($RMS < 2\text{\AA}$). O eixo da abcissa corresponde ao número de conformações presentes em cada cluster e o eixo da ordenada indica os valores de ΔG (kcal/mol) de cada cluster. A interação foi calculada utilizando o programa AutoDock 4.2.

O estudo do redocking do NADPH foi eficiente em demonstrar uma conformação do cofator bastante semelhante à estrutura da cristalografia da TR com RMS de $1,94\text{\AA}$, ΔG $-6,21$ kcal/mol e K_i estimado de $28,22\mu\text{M}$ (Figura 4.12A).

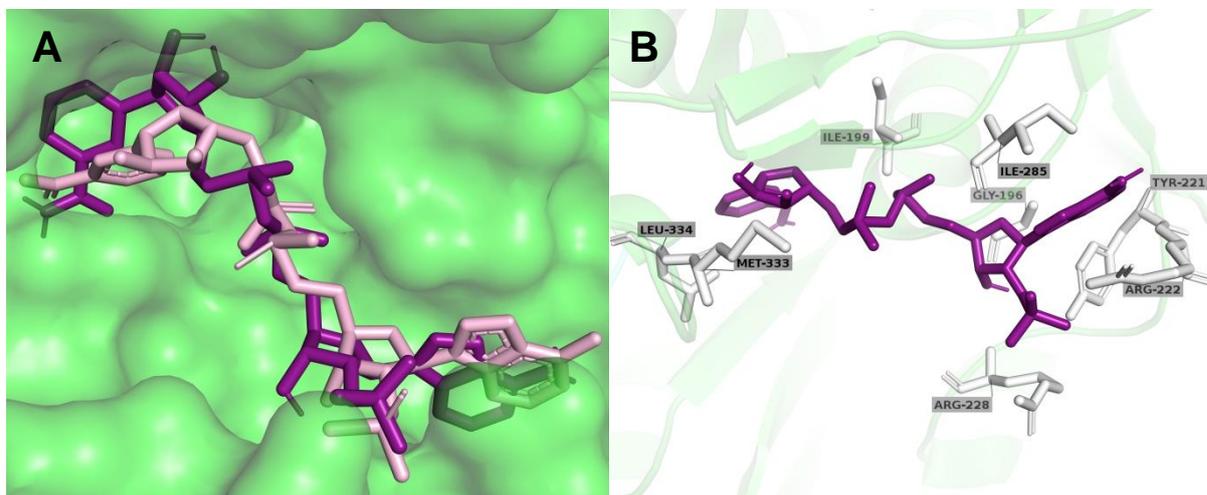


Figura 4.12 - Estudo de redocking entre o NADPH e o sítio do cofator da TR. (A) A TR está representada em superfície na cor verde. O NADPH proveniente da cristalografia da estrutura 4ADW está em bastão roxo claro enquanto o NADPH resultante do cálculo do redocking está representado em roxo escuro. (B) O NADPH está interagindo com os aminoácidos presentes no domínio do cofator (em branco). A interação foi calculada utilizando o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL.

Além disso, esse cálculo demonstrou a interação do NADPH com diversos resíduos importantes no mecanismo de oxirredução realizado pela TR. Os aminoácidos Tyr221, Arg222, Arg238 e Met333 participam do mecanismo de

reconhecimento entre a TR e o NADPH enquanto a Tyr198 e Arg222 estão envolvidas nas alterações conformacionais decorrentes dessa interação. Podemos observar na Figura 4.12B a interação do cofator com os resíduos Tyr221, Arg222, Arg238 e Met333. Esses dados confirmam que os parâmetros padrão utilizados para os cálculos de *docking* com algoritmo genético lamarckiano estão corretos.

Devido ao estudo de *redocking* utilizando resultado da catálise (produto, tripanotona reduzida) do substrato (tripanotona oxidada) apresentar valores de energia livre elevados realizamos um *docking* com o substrato – tripanotona oxidada – obtido da plataforma PubChem (CID 115098). Das conformações obtidas, obtivemos dois resultados: um que apresentou menor energia (Figura 4.13A; C; E) e outro que apresentou maior prevalência (Figura 4.13B;D;F). Os valores de ΔG e K_i foram de -5,84kcal/mol e 52,44 μ M para as conformações de menor energia, e -3,68kcal/mol e 2,1mM para as conformações de maior probabilidade (Tabela 4.6). A conformação de menor energia demonstrou interações com os resíduos Ser109, Thr397, Leu399, Pro462, Ser464 e Glu466. Dentre esses, a Ser109 e Glu466 são descritos por participarem do mecanismo de interação entre o substrato e a TR (HUNTERL et al., 1992; COLOTTI et al., 2013)

Uma vez validado e definido os parâmetros para o estudo da interação de ligantes no sítio ativo da tripanotona redutase, investigamos a interação da EGCG diretamente no sítio catalítico dessa enzima. A EGCG se ligou no sitio ativo da TR interagindo com diversos aminoácidos, preenchendo a fenda catalítica e localizou-se na interface entre as duas subunidades (Figura 4.14). Conforme observado na Tabela 4.6 os valores de ΔG e K_i dessa interação que foram de -6,95kcal/mol e 8,10 μ M, respectivamente. A EGCG apresentou interação com a Ser109, um resíduo envolvido em alterações estruturais que resultam na ampliação do sítio ativo da TR e do reconhecimento com o substrato dessa enzima. Como controle positivo, calculamos a interação da clomipramina no sitio catalítico da TR. A clomipramina também interagiu no sítio catalítico (Figura 4.15) e apresentou valores de ΔG e K_i de -4,59kcal/mol e 435,39 μ M, respectivamente (Tabela 4.6).

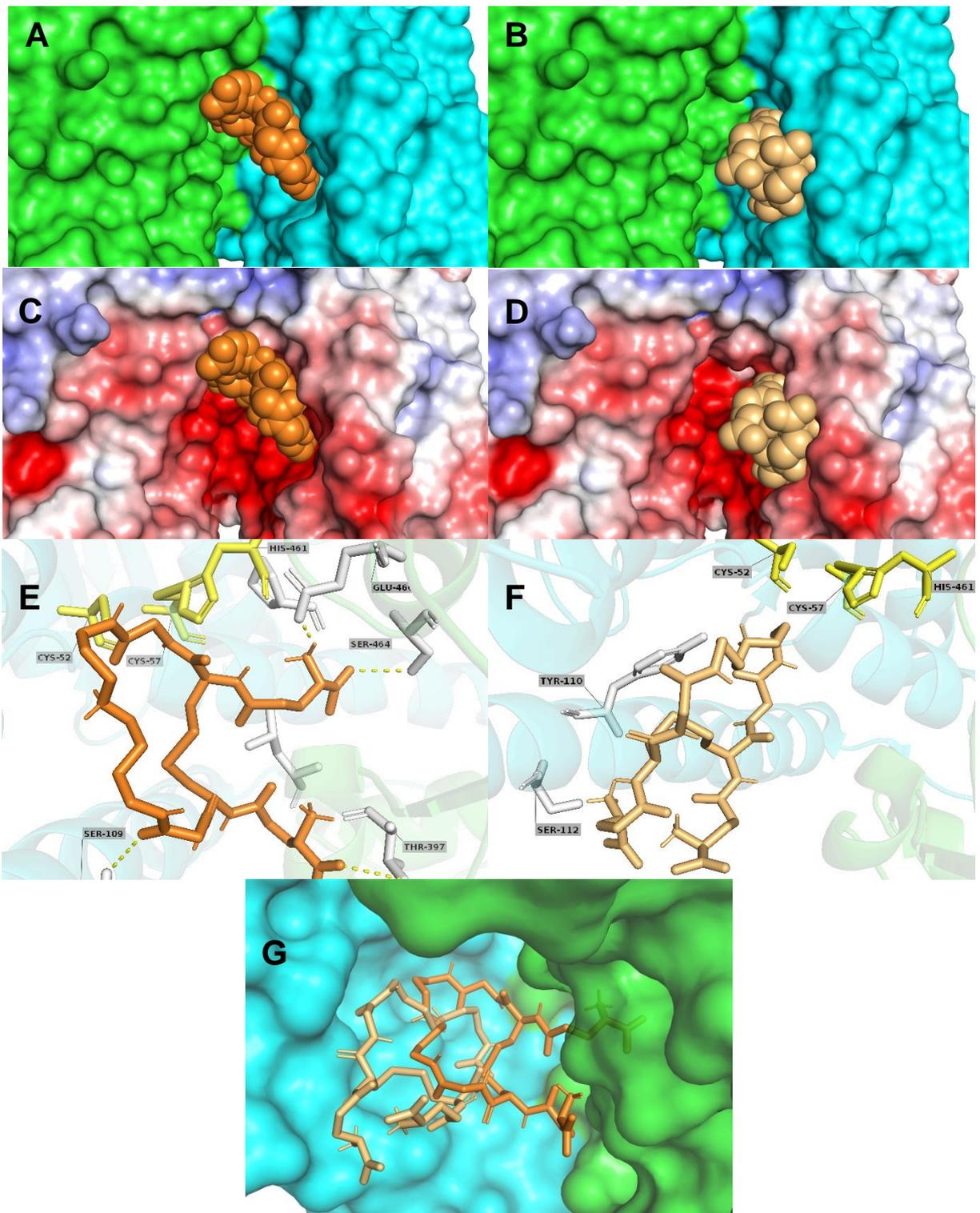


Figura 4.13- Interação da tripanotonia oxidada no sítio catalítico da TR. O receptor (TR) está no mesmo ângulo de visualização em (A), (B), (C) e (D). (A), (B), (E), (F) e (G): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (C) e (D): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. A conformação de menor energia e maior prevalência está representada pelas cores laranja escuro e laranja claro, respectivamente. (E) e (F): A tripanotonia oxidada está próxima dos aminoácidos presentes no sítio (em branco) e com o sítio catalítico (em amarelo). As linhas tracejadas em amarelo indicam interações dos ligantes com a cadeia lateral dos resíduos. (G) Co-localização da tripanotonia oxidada de menor energia e maior prevalência. O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL.

. Docking no sítio catalítico									
Moléculas	Menor energia					Maior prevalência			
	ΔG (kcal/mol)	Ki	Rank (cluster/total)	#Conformações	ΔG (kcal/mol)	Ki	Rank (cluster/total)	#Conformações	
Tripanotiona oxidada	-5,84	52,44μM	1/203	8	-3,68	2,1mM	26/203	55	
EGCG	-6,95	8,10μM	1/85	61	-6,95	8,10μM	1/85	61	
Clomipramina	-4,69	362,83μM	1/16	43	-4,59	435,39	2/16	253	
. Docking no sítio do cofator									
Moléculas	Menor energia					Maior prevalência			
	ΔG (kcal/mol)	Ki	Rank (cluster/total)	#Conformações	ΔG (kcal/mol)	Ki	Rank (cluster/total)	#Conformações	
EGCG	-8,02	1,32 μM	1/37	78	-6,73	11,62 μM	6/37	135	
Clomipramina	-5,59	79,56μM	1/24	139	-5,59	79,56μM	1/24	139	

Tabela 4.6 – Cálculos do estudo de docking no sítio catalítico e no sítio do cofator. #Conformações = número de conformações.

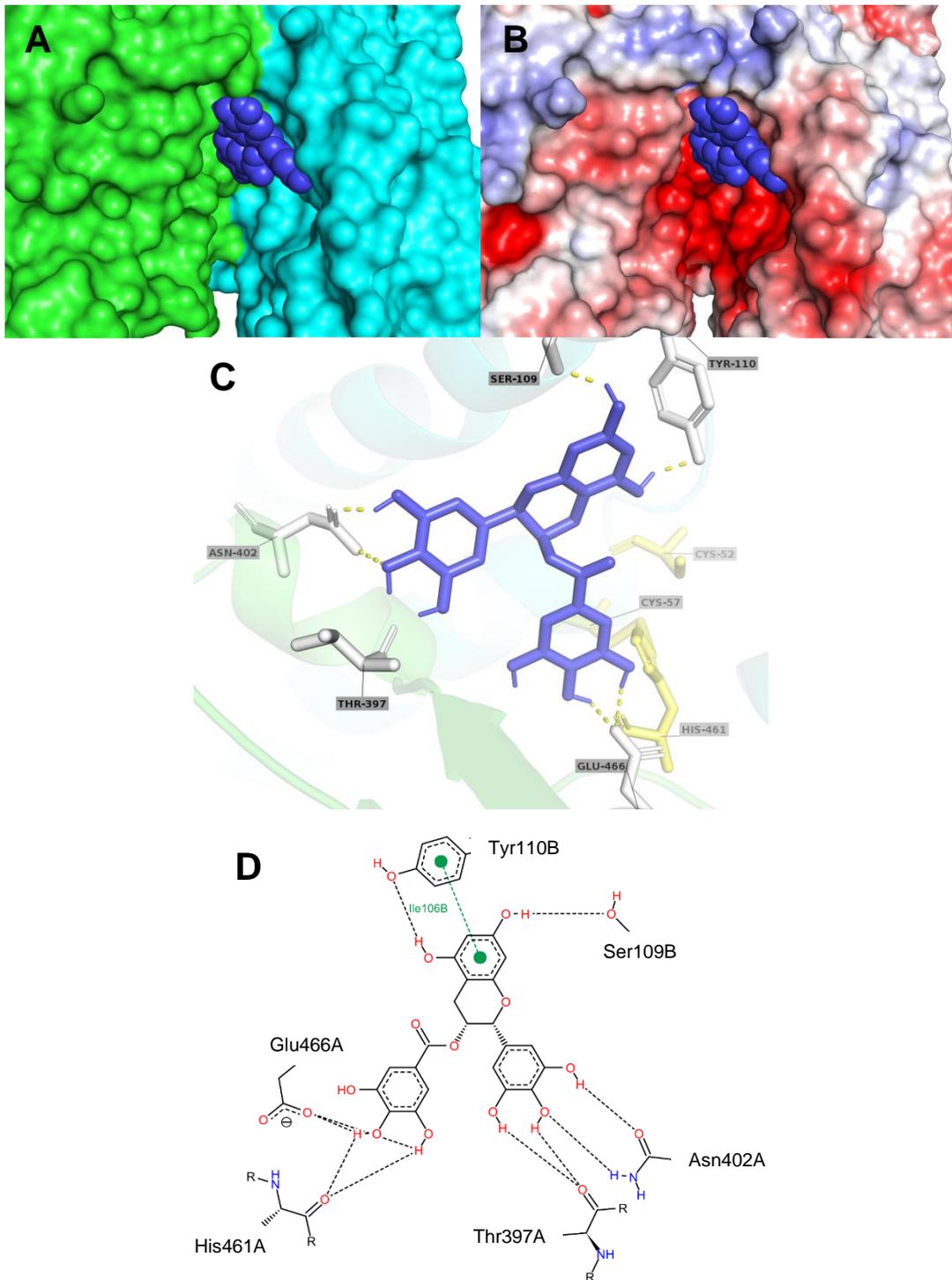


Figura 4.14 - Interação da EGCG no sítio catalítico da TR. O receptor (TR) está no mesmo ângulo de visualização em (A) e (B). (A) e (C): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (B): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. (A), (B) e (C): a EGCG está representada em azul escuro. (C): a EGCG está interagindo com os resíduos em branco e próxima a tríade catalítica (em amarelo). As linhas tracejadas em amarelo indicam interações da EGCG com a cadeia lateral. O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL. (C) representação da interação em 2D pela ferramenta Poseview. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. As linhas verdes tracejadas representam as interações com anéis aromáticos.

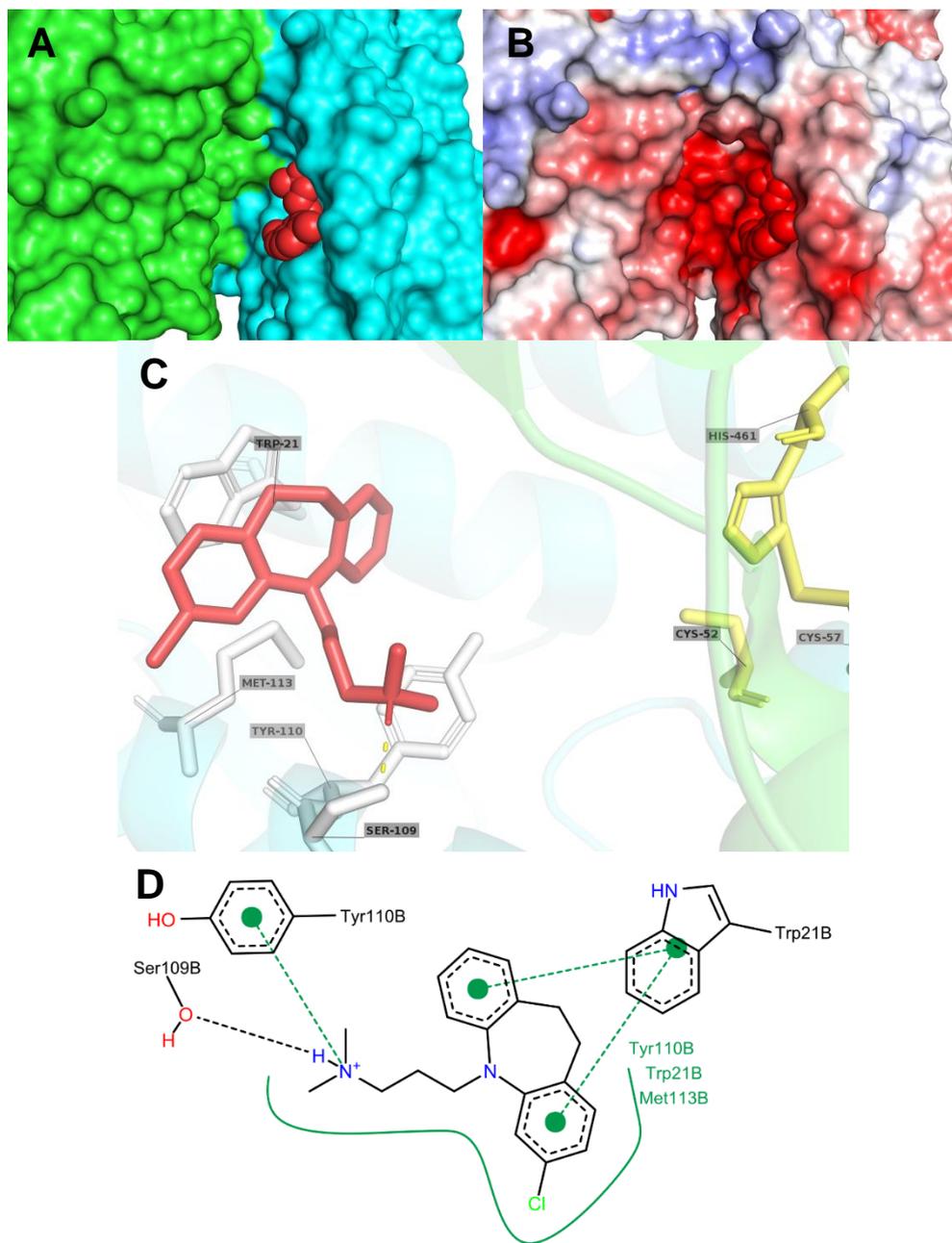


Figura 4.15 - Interação da clomipramina no sítio catalítico da TR. O mesmo posicionamento pode ser observado em (A) e (B). (A) e (C): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (B): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. (A), (B) e (C): a clomipramina está representada em vermelho. (C): a clomipramina está interagindo com os resíduos em branco e próxima a tríade catalítica (em amarelo). As linhas tracejadas em amarelo indicam interações da clomipramina com a cadeia lateral. O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL. (D) representação da interação em 2D pela ferramenta Poseview. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. As linhas verdes tracejadas representam as interações com anéis aromáticos. As linhas verdes representam as interações hidrofóbicas do ligante com os aminoácidos.

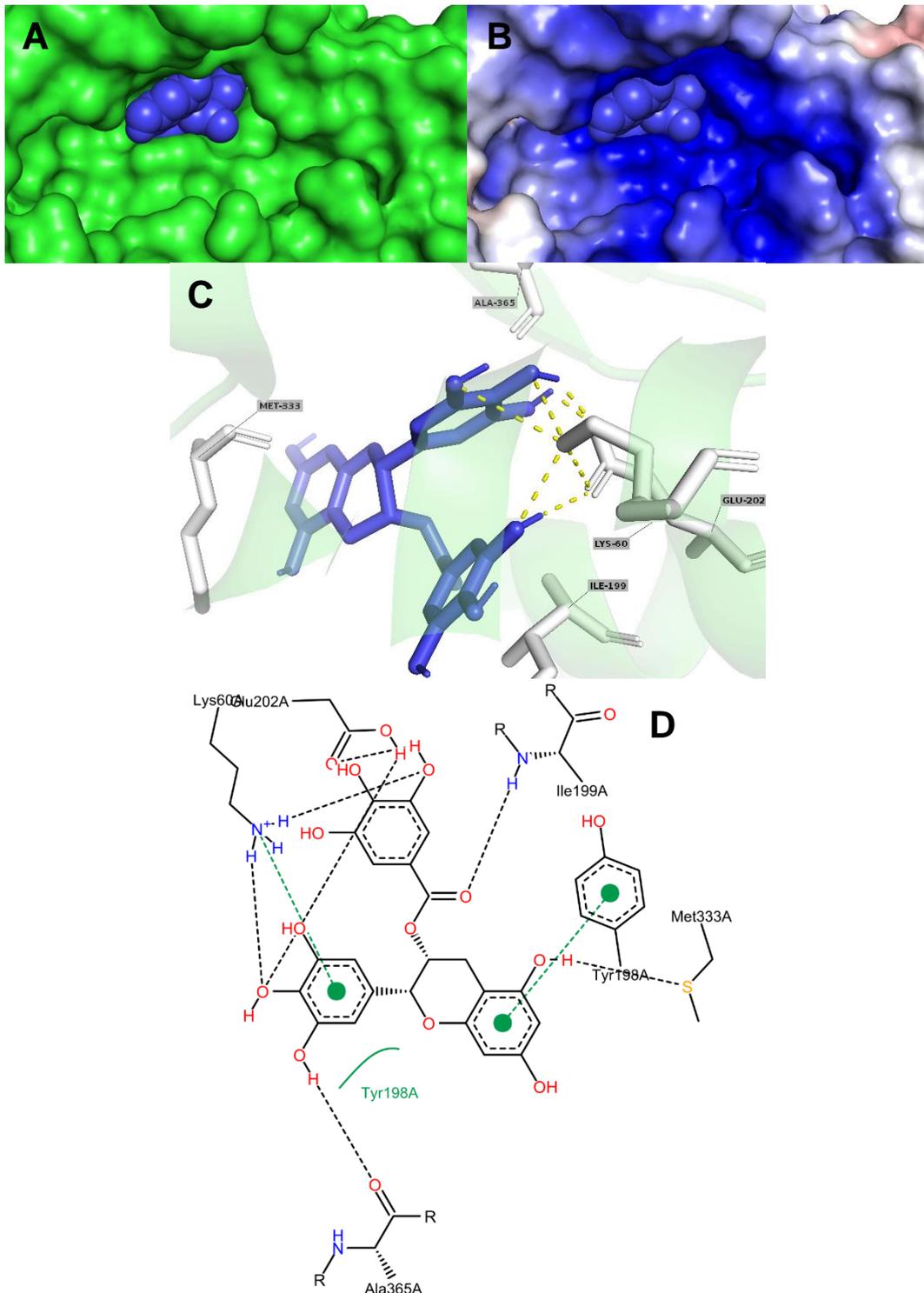


Figura 4.16 - Interação da EGCG de menor energia no sítio do cofator. O mesmo posicionamento pode ser observado em (A) e (B). (A) e (C): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (B): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. (C) A EGCG está representada em azul escuro e está interagindo com os aminoácidos em branco e com as cadeias laterais desses resíduos (linha tracejada amarela). O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL. (D) representação da interação em 2D pela ferramenta Poseview. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. As linhas verdes tracejadas representam as interações com anéis aromáticos. As linhas verdes representam as interações hidrofóbicas do ligante com os aminoácidos.

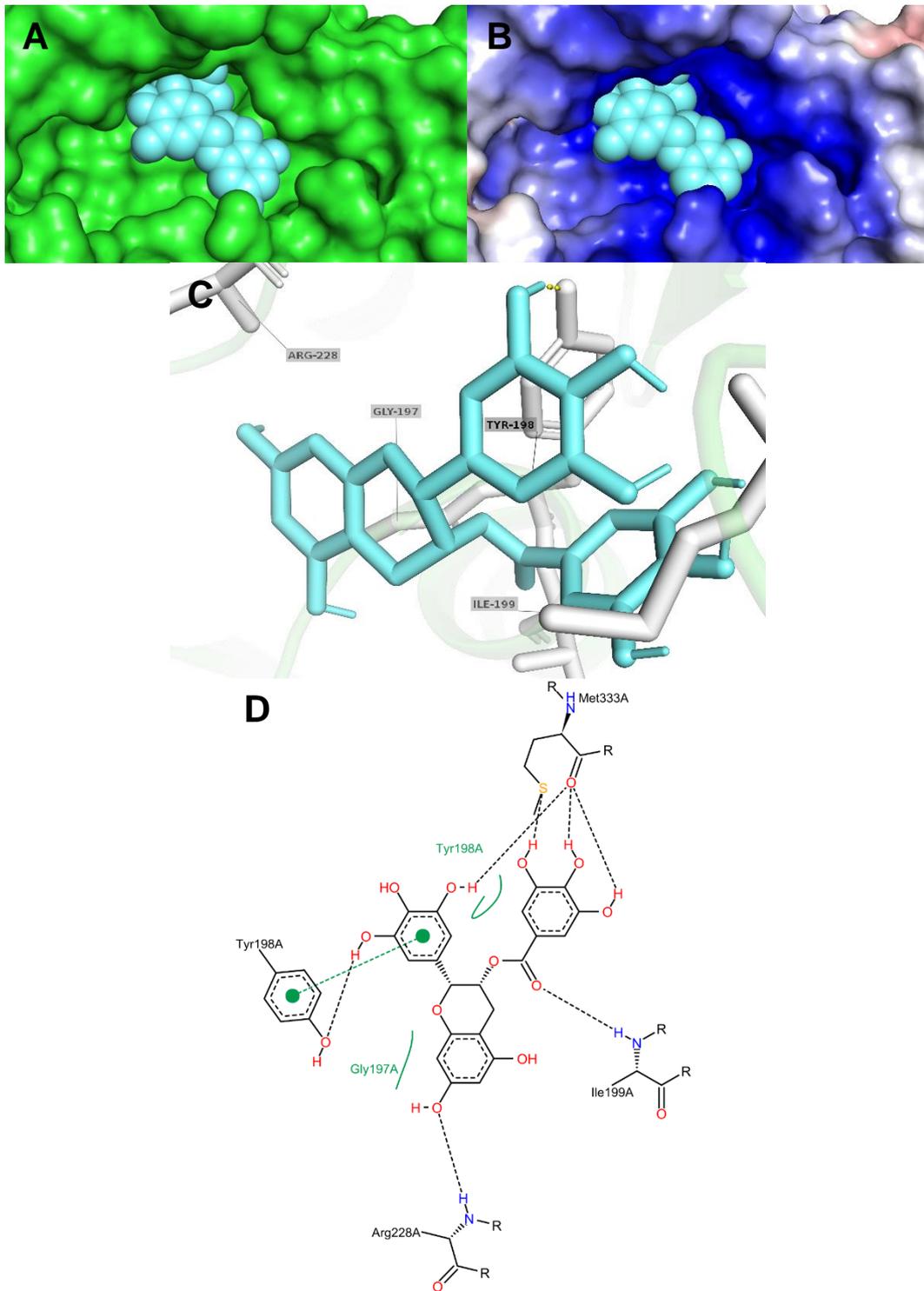


Figura 4.17 - Interação da EGCG de maior prevalência no sítio do cofator. O mesmo posicionamento pode ser observado em (A) e (B). (A) e (C): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (B): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. (C) A EGCG está representada em azul claro e está interagindo com os aminoácidos em branco e com as cadeias laterais desses resíduos (linha tracejada amarela). O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL. (D) representação da interação em 2D pela ferramenta Poseview. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. As linhas verdes tracejadas representam as interações com anéis aromáticos. As linhas verdes representam as interações hidrofóbicas do ligante com os aminoácidos.

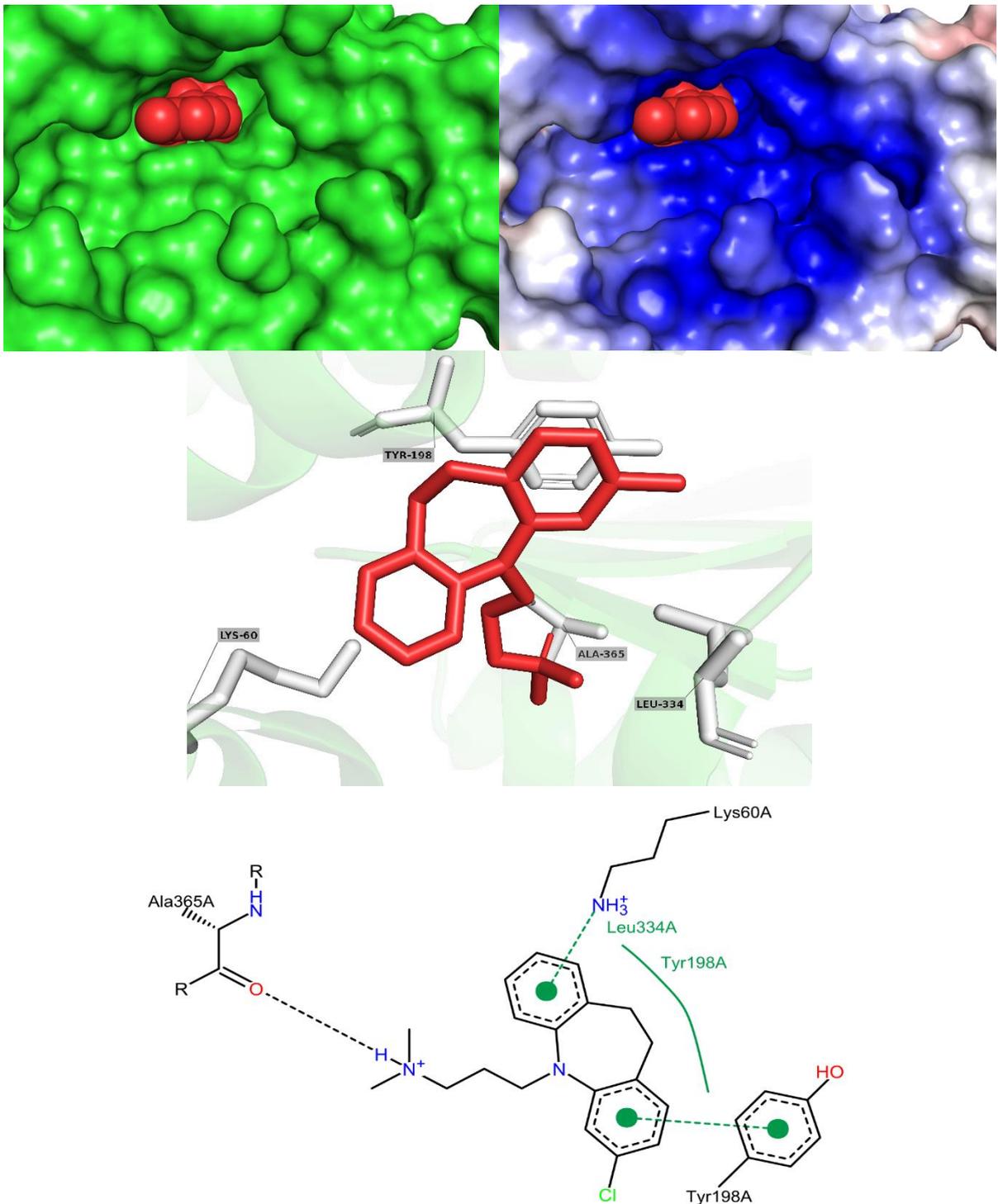


Figura 4.18 - Interação da clomipramina no sítio do cofator. O mesmo posicionamento pode ser observado em (A) e (B). (A) e (C): a TR está indicada nas cores verde e azul para cada subunidade. (B): a TR está representada pela superfície eletrostática em pH 7,4 calculado pela ferramenta APBS. A variação das cores vermelho e azul indicam regiões de potencial negativo e positivo na superfície do receptor, respectivamente. (C) A clomipramina está representada em vermelho e está interagindo com os aminoácidos em branco. O cálculo da interação foi realizado com o programa AutoDock 4.2 e a imagem foi gerada no PyMOL. (D) representação da interação em 2D pela ferramenta Poseview. As linhas tracejadas representam as ligações de hidrogênio entre o aminoácido e o ligante. As linhas verdes tracejadas representam as interações com anéis aromáticos. As linhas verdes representam as interações hidrofóbicas do ligante com os aminoácidos.

Após demonstrar a capacidade da EGCG em se ligar no sítio catalítico da TR, decidimos investigar a interação desse composto no sítio de ligação do cofator NADPH. Essas análises foram realizadas na região B da Figura 4.10.

A EGCG mostrou-se eficiente em interagir no sítio do cofator exibindo duas conformações (Figura 4.16 e Figura 4.17) com valores de ΔG e K_i de -8,02kcal/mol e 1,32 μ M, e -6,73kcal/mol e 11,62 μ M respectivamente (Tabela 4.6). A clomipramina, utilizada como controle positivo, também interagiu com diferentes aminoácidos do sítio de ligação do cofator (Figura 4.18) e demonstrou valores de ΔG e K_i de -5,59kcal/mol e 76,56 μ M, respectivamente (Tabela 4.6).

4.3 Efeito terapêutico da EGCG

Nos últimos anos a OMS e outros órgãos – como o DNDi e TDR – vem incentivando a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento das leishmanioses e estabeleceram uma série características desejáveis para esse tratamento. Dentre essas características estão: fácil administração, seguro e eficácia em um esquema terapêutico de curto tratamento (WHO, 2007). Uma vez demonstrada a atividade da EGCG em promastigotas de *L. infantum* e descrito parte do seu mecanismo de ação, seguimos avançando investigando o seu potencial terapêutico. Dessa maneira, demonstramos o efeito da EGCG em amastigota intracelular e o seu efeito *in vivo* em modelo experimento murino de leishmaniose visceral.

4.3.1 Atividade anti-amastigota

Os parasitos do gênero *Leishmania* possuem em seu ciclo biológico duas formas distintas: a forma promastigota, encontrada no inseto vetor, e a forma amastigota, que é encontrada nas células fagocíticas do hospedeiro vertebrado e é a responsável pela manutenção da doença no mamífero e, portanto, considerada a forma de maior relevância clínica. Sendo assim, demos continuidade ao nosso estudo investigando o efeito da EGCG em amastigota intracelular.

Para isso, recolhemos macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, infectamos promastigotas de *L. infantum* e tratamos por 72 horas com EGCG. Após esse período, as células foram coradas e o índice de infecção, que correlaciona o percentual de macrófagos infectados com o número de amastigotas, foi estabelecido por contagem direta microscópio de luz. A EGCG diminuiu o índice de infecção de

maneira dose dependente, demonstrando um valor de IC₅₀ de 3,8μM e uma inibição de 90% na concentração de 24μM (Figura 4.19).

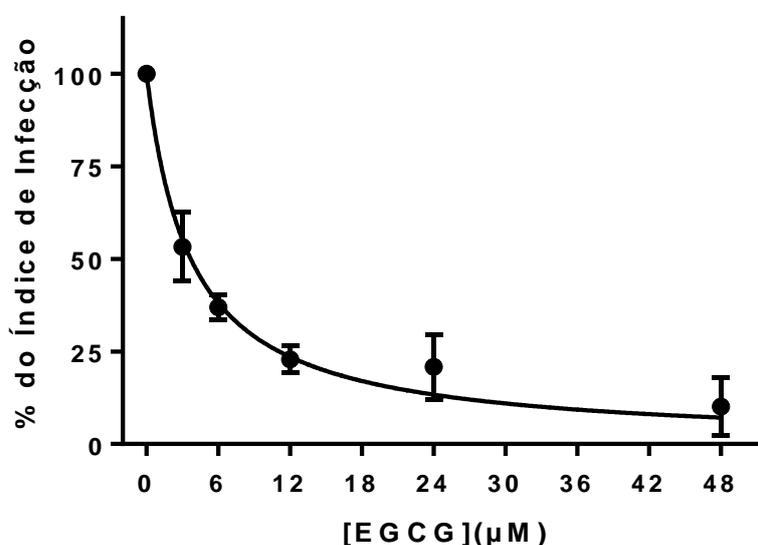


Figura 4.19 - Atividade anti-mastigota da EGCG. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. infantum* e incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de EGCG (3μM-48μM) por 72 horas a 37°C e 5% CO₂. A média do índice de infecção do controle (0) = 221,2. Dados expressos como média ± erro padrão. (n=3). ANOVA <0,0001.

4.3.2 Atividade *in vivo*

Avaliamos o potencial *in vivo* da EGCG em modelo murino de leishmaniose visceral experimental. Camundongos BALB/c foram infectados (dia 0) e realizamos um curto período de tratamento (dia 8 ao dia 12) com doses de EGCG administradas por via oral duas vezes ao dia, seguido de um longo período sem tratamento (dia 13 ao dia 30) até ser feita a eutanásia, determinação da carga parasitária.

Foi observada uma diminuição significativa da carga parasitária do fígado dos animais que receberam o tratamento por via oral da EGCG em relação ao grupo dos camundongos sem tratamento. Igualmente o grupo tratado com Sb⁵⁺ por via intramuscular apresentou uma redução significativa da carga parasitária, porém não apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com 25mg/kg/dia e nem com 50mg/kg/dia de EGCG (Figura 4.20A). A EGCG ainda foi capaz de reduzir de modo dose dependente em aproximadamente 92% o número de parasitos na maior dose administrada e demonstrou um valor de ED₅₀ e ED₉₀ de 14,01mg/kg/dia e 18,8mg/kg/dia nesse órgão (Figura 4.20B).

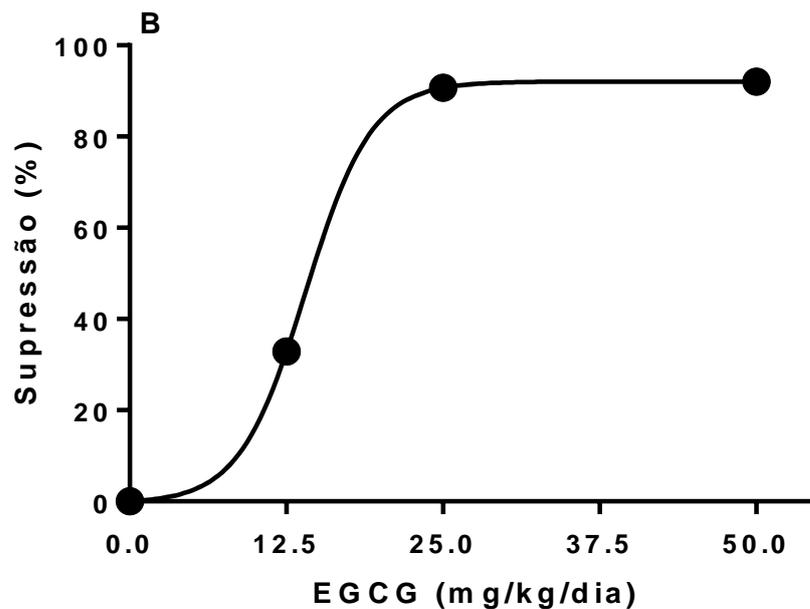
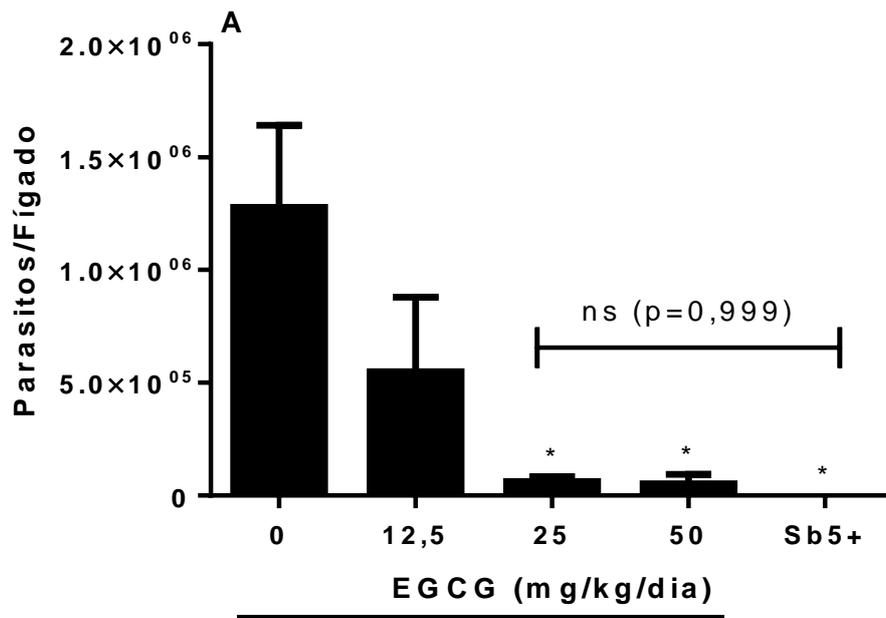


Figura 4.20 - Atividade *in vivo* da EGCG. Camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. infantum* e após 7 dias foi dado início ao tratamento por 5 dias. Após os animais permanecerem 18 dias sem tratamento os animais foram eutanasiados. (A) O fígado foi recolhido, macerado e a carga parasitária foi determinada pelo ensaio de diluição limitante. Os dados foram obtidos pela média \pm erro padrão do total de parasitos ($n=5$). ANOVA $<0,005$. * Diferença significativa em relação ao controle $p<0,005$. ns = não significativo. (B) A supressão da carga parasitária foi determinada através da porcentagem de inibição dos parasitos presentes no fígado.

5. Discussão

Infelizmente as doenças tropicais negligenciadas ainda são um grave problema para a saúde pública no mundo. Ao todo surgem aproximadamente 1 bilhão de novos casos por ano associados a esse grupo de patologias (NDJONKA et al., 2013; WHO, 2017a). Nesse grupo, as leishmanioses se mostram altamente presentes. Essas são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Presentes em 98 países, são responsáveis por uma incidência anual de 1,6 milhão de novos casos no qual 350 milhões de pessoas vivem em local de risco de contrair a doença. Devido ao fato de serem consideradas doenças negligenciadas, os indivíduos mais acometidos são os que vivem nas regiões mais pobres, com baixo IDH, carência de saneamento básico e em contato próximo com vetores infecciosos. Dados do Ministério da Saúde e da Secretaria de Vigilância Sanitária revelam que há a prevalência dessa doença nas regiões Nordeste e Norte e, não coincidentemente, são as regiões com menores IDH do país (PNUD, 2016).

Dentre as diversas manifestações clínicas que as leishmanioses podem apresentar, a leishmaniose visceral é a forma mais agressiva da doença na qual o indivíduo acometido certamente vem a óbito caso não receba o diagnóstico e tratamento adequado. Nesse cenário, temos o desprazer de sermos responsáveis por 95% dos casos de LV das Américas e, juntamente com outros 6 países, representamos 90% dos casos registrados de LV ao redor do mundo (ALVAR et al., 2012; WHO, 2017c).

Desde o advento dos antimoniais pentavalentes na década de 40 que esse grupo de medicamentos são considerados a primeira linha que compõe o escasso arsenal terapêutico para as leishmanioses. Outros medicamentos como a anfotericina B, pentamidina e, mais recentemente, a miltefosina dão um reforço na clínica para o combate dessas doenças (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Mesmo com todos os esforços empenhados na terapia das leishmanioses ainda há a necessidade da pesquisa e desenvolvimento de novos compostos eficazes para o controle dessas patologias, uma vez que o arsenal terapêutico atualmente disponível apresentam graves problemas relacionados a alta toxicidade, elevado custo, vias de administração intramuscular ou endovenosas, além de serem registrados em alguns países ao redor do mundo o desenvolvimento de resistência aos fármacos de primeira escolha e falha terapêutica (JAIN; JAIN, 2013).

Nesse intuito, muito tem se discutido sobre novas abordagens e estratégias para o desenvolvimento de alternativas para o tratamento das leishmanioses. Além

do incentivo a busca de novas entidades químicas eficazes no controle dessas doenças, o estudo de associação de fármacos tem se mostrado altamente promissor. Estudos clínicos em diferentes fases têm sido realizados com sucesso na combinação entre fármacos utilizados na clínica para a terapia das leishmanioses. A exemplo disso pode-se destacar a associação da anfotericina B lipossomal com miltefosina, paramomicina com antimonial pentavalente, paramomicina associada com miltefosina ou destes com possíveis novas drogas e possíveis substâncias que podem potencializar seu efeito.

Os produtos naturais são compostos extraídos de todo o ambiente e produzidos por uma gama de microrganismos vivos que vão desde bactérias até fungos e plantas (SCOTTI et al., 2016). Esse grupo de compostos vem recebendo atenção devido as mais diversas propriedades farmacológicas a elas associadas, sendo um amplo campo para a oportunidade do descobrimento de novos medicamentos para o tratamentos de doenças parasitárias (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; NDJONKA et al., 2013).

Nesse campo, os flavonoides vêm demonstrando candidatos promissores. Essa classe de metabólitos secundários tem sido amplamente utilizados em estudos para a terapia de câncer, antibióticos, antifúngicos e antiprotozoários (HAVSTEEN, 2002; LEHANE; SALIBA, 2008; CZAPLIŃSKA; CZEPAS; GWOŹDZIŃSKI, 2012). A epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um flavonoide e a principal catequina do chá verde de *Camellia sinensis* e vários artigos reforçam o seu potencial terapêutico. Já foi descrito que a EGCG pode atuar em diferentes microrganismos protozoários, em *Babesia microti* (ABOULAILA; YOKOYAMA; IGARASHI, 2010), em *T. cruzi in vitro* e *in vivo* (GÜIDA et al., 2007) e nos últimos anos a EGCG vem sendo alvo de pesquisa do nosso grupo para o estudo do seu efeito *in vitro* e em modelo experimental murino de leishmaniose tegumentar induzida por *L. amazonensis* ou *L. braziliensis*, bem como parte do seu mecanismo de ação no qual supõe-se que esse composto atue diretamente nos parasitos e desencadeie um aumento nos níveis de ROS, causando, conseqüentemente, uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial e morte do parasito (INACIO et al., 2012, 2014; INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013).

Contudo, a causa do aumento nos níveis de ROS ainda não está completamente claro. Somado a isso, devido a preconização da Organização Mundial da Saúde em combater a forma mais grave da leishmaniose, esse trabalho

teve como objetivo elucidar o mecanismo de ação da EGCG buscando identificar a causa para o acúmulo de ROS e demonstrar o efeito da associação da EGCG com fármacos utilizados na clínica para o combate das leishmanioses, bem como estudar o seu efeito *in vivo* em modelo experimental de leishmaniose visceral murina.

Para dar início ao estudo da EGCG em associação com os fármacos utilizados na clínica no combate as leishmanioses, avaliamos o efeito direto da EGCG, miltefosina e anfotericina B em promastigotas de *L. infantum*. Após incubarmos os parasitos por 72 horas a viabilidade celular foi quantificada por resazurina. Os 3 compostos foram eficazes na inibição dos parasitos. Os valores de IC₅₀ para a EGCG foi de 162µM. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que em promastigotas de *L. braziliensis* a EGCG demonstrou um IC₅₀ de 278µM (INACIO et al., 2014), já em *L. amazonensis* foi calculado um valor de IC₅₀ em 120 horas foi 63µM (INACIO et al., 2012), revelando o amplo espectro de ação da EGCG por atuar em diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Os valores de IC₅₀ para miltefosina e anfotericina B foram 6,4µM e 0,8µM, respectivamente e IC₉₀ 262,5µM para EGCG, 14µM para miltefosina e 1,07µM para anfotericina B (Figura 4.1 e Tabela 4.1). Esses valores estão próximos ao encontrados em 2014 por Trinconi e colaboradores que estimaram valores de IC₅₀ de 19,9µM e 118,5nM para miltefosina e anfotericina B, respectivamente, em promastigotas de *L. amazonensis* (TRINCONI et al., 2014). O baixo IC₅₀ da anfotericina B também corrobora com os relatos na literatura que a descreve como o fármaco mais potente disponível comercialmente para o combate das leishmanioses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Sendo reconhecido o efeito direto dos fármacos em promastigotas de *L. infantum* seguindo o protocolo estabelecido em nosso bioensaio, damos continuidade ao nosso estudo avaliando o efeito da combinação da EGCG com miltefosina ou anfotericina B. O emprego da terapia combinada vem sendo utilizada com sucesso em diversos estudos já na fase clínica (Tabela 1.4). Além disso, diferentes esquemas terapêuticos atualmente são baseados na combinação de fármacos, como, por exemplo, nos antibióticos e na quimioterapia retroviral. Essa estratégia apresenta as mais variadas vantagens quando comparada a monoterapia. A associação de compostos pode diminuir as chances do desenvolvimento de resistência, diminuir a toxicidade e diminuir os custos do tratamento (FITZGERALD et al., 2006; KARJALAINEN; REPASKY, 2016).

A metodologia utilizada para a determinação do efeito entre a EGCG com a miltefosina ou anfotericina B foi baseada no protocolo estabelecido por Fivelman e colaboradores (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004). Resumidamente, a associação é estudada através do preparo de diferentes proporções entre os fármacos (no nosso caso, EGCG + miltefosina, ou EGCG + anfotericina B), indo de 5:0 (isto é, 5 partes de EGCG e 0 parte de miltefosina ou anfotericina B), 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 até 0:5. Para cada fármaco foi definido a concentração máxima de 1mM para EGCG, 100µM para miltefosina e 1,25µM para anfotericina B. Dessa forma, a proporção de 5:0 corresponde a 1mM de EGCG, 4:1 corresponde a 800µM de EGCG mais 20µM de miltefosina ou 0,25µM de anfotericina B, 3:2 corresponde a 600µM de EGCG mais 40µM de miltefosina ou 0,5µM de anfotericina B, 2:3 corresponde a 400µM de EGCG mais 60µM de miltefosina ou 0,75µM de anfotericina B, 1:4 corresponde a 200µM de EGCG ou 80µM de miltefosina ou 1µM de anfotericina B e, por fim, 0:5 corresponde ao fármaco da combinação sozinho, 100µM de miltefosina ou 1,25µM de anfotericina B.

Para cada proporção foi realizada uma diluição seriada, dessa forma pode-se calcular o valor de IC₅₀ e IC₉₀ para cada fármaco sozinho ou associado. Uma vez determinado os valores de ICs, utilizamos a equação $\sum FICI = \left(\frac{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } A+B}{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } A} \right) + \left(\frac{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } B+A}{IC_{50} \text{ ou } IC_{90} \text{ de } B} \right)$ para determinar o somatório do Índice de Concentração Inibitória Fracional (FICI), que nada mais é do que a razão entre o IC₅₀ ou IC₉₀ do fármaco associado e o IC₅₀ ou IC₉₀ do fármaco sozinho. Realizada essa etapa, é calculada a média dos valores de FICI de cada combinação e gerado a média desses valores. Para valores da $\bar{\Sigma}FIC \leq 0,5$; aditiva para valores $> 5 - 4$ e antagônica para valores > 4 como recomendado por Odds (ODDS, 2003).

Após realizarmos todas essas análises chegamos aos valores da $\bar{\Sigma}FIC_{50}$ e $\bar{\Sigma}FIC_{90}$ de 1,30 e 1,23 para a associação da EGCG com a miltefosina (Tabela 4.2 e Tabela 4.3; Figura 4.2 e Figura 4.3) e $\bar{\Sigma}FIC_{50}$ e $\bar{\Sigma}FIC_{90}$ de 1,00 e 1,04 para a associação da EGCG com anfotericina B (Tabela 4.4 e Tabela 4.5; Figura 4.4 e Figura 4.5). Esses valores indicam que a combinação da EGCG com miltefosina ou anfotericina B é do tipo aditiva, no qual o efeito dos fármacos associados é a soma do efeito dos fármacos sozinhos.

A terapia combinada vem sendo estudada e aplicada em diferentes espécies do gênero *Leishmania* e em diferentes modelos *in vivo*. Trinconi e colaboradores

descreveram um efeito aditivo para a combinação entre o tamoxifeno e anfotericina B em amastigota e promastigota de *L. amazonensis* (TRINCONI et al., 2014). Semelhantemente, Mesquita e colaboradores relataram um efeito aditivo em amastigota intracelular de *L. infantum* com a combinação da nitazoxanida com anfotericina B, ou glucantime, ou miltefosina, ou sitamaquina (MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014). Seifert e Croft demonstraram um efeito aditivo em amastigota intracelular de *L. donovani* e no efeito *in vivo* na combinação entre a miltefosina e anfotericina b, ou sitamaquina, ou paromomicina, ou estibogluconato de sódio (SEIFERT; CROFT, 2006). Anos depois, o estudo da associação entre a miltefosina e anfotericina B lipossomal, ou paromomicina foi realizado em etapas clínicas. Sundar e colaboradores realizaram teste clínicos de fase 3 na Índia utilizando a estratégia terapêutica da combinação entre miltefosina e anfotericina B lipossomal ou paromomicina. Já Omollo em 2011 relatou o efeito da associação entre a miltefosina e anfotericina B lipossomal em pacientes com leishmaniose visceral no Quênia e no Sudão (OMOLLO et al., 2011). Dessa forma, interações que se mostraram aditivas em estudos *in vitro* demonstraram ser promissoras para o uso na clínica e auxiliar no combate as leishmanioses.

Nas etapas de desenvolvimento de um fármaco é necessário que haja a compreensão do seu mecanismo de ação. Nesse contexto, os flavonoides são conhecidos por apresentarem um alto potencial antioxidante, estando associadas no combate de doenças cardiovasculares e câncer. Essa propriedade está relacionada com a indicação de consumo diário principalmente de frutas e outros vegetais (HAVSTEEN, 2002). Por outro lado, já foi demonstrada a produção de ROS em células de câncer tratadas com flavonoides, como a quercetina, apigenina e EGCG (LI et al., 2009; DAS et al., 2012; BISHAYEE et al., 2013), assim como já foi demonstrada a produção de ROS em *L. amazonensis* tratadas com quercetina (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013) e apigenina (FONSECA-SILVA et al., 2016).

A EGCG pode apresentar efeito pró-oxidante ou antioxidante. O que determina esse fato é o ambiente e a concentração do composto (YANG et al., 2004; HE et al., 2013). A produção de H₂O₂ já foi observada em células beta do pâncreas tratadas com EGCG (SUH et al., 2010) e em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013; INACIO et al., 2014). Sendo assim, investigamos a produção de H₂O₂ em promastigotas de *L. infantum* tratadas por 72 horas com EGCG utilizando a sonda AmplexRed para quantificar

esse acúmulo. Os nossos resultados corroboram aos dados na literatura, uma vez que a EGCG aumentou significativamente de maneira dose dependente o acúmulo de H₂O₂ no interior desses parasitos (Figura 4.6A) apresentando uma correlação linear com a inibição de promastigotas (Figura 4.6B).

É amplamente descrito na literatura que compostos que atuam elevando os níveis de ROS podem desencadear uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) como decorrência dos danos oxidativos gerados no interior da célula. Dessa forma, investigamos o $\Delta\Psi_m$ em promastigotas tratadas com EGCG. Conforme relatado na Figura 4.7, foi observado uma diminuição dose dependente no $\Delta\Psi_m$ de aproximadamente 86% na maior concentração de EGCG em relação ao controle não tratado. Em promastigotas de *L. amazonensis* o tratamento com EGCG induziu alterações drásticas em diferentes organelas celulares, tais como desorganização mitocondrial e a presença de vacúolos, além da diminuição do potencial mitocondrial (INACIO et al., 2012). A mitocôndria dos parasitos pertencentes a família Trypanosomatidae tem se mostrado um excelente alvo farmacológico na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos que atuem no combate às leishmanioses, uma vez que esses protozoários apresentam uma única organela responsável pela produção de ATP através da fosforilação oxidativa (FIDALGO; GILLE, 2011). Sendo assim, alterações como a diminuição do $\Delta\Psi_m$ desencadeia uma série de eventos bioquímicos e celulares que culminam na morte do parasito.

Uma vez que o parasito se encontra com o $\Delta\Psi_m$ alterado há, conseqüentemente, uma diminuição no gradiente eletroquímico dessa organela. Esses processos levaram a uma diminuição significativa nos níveis de ATP intracelular em promastigotas de *L. infantum* tratadas com EGCG (Figura 4.8). Em decorrência de todo esse processo, o parasito pode entrar em processo de morte celular programada por autofagia ou apoptose, uma vez que essas alterações disparam diferentes cascatas de sinalização de morte celular.

Ribeiro e colaboradores demonstraram alterações mitocondriais causadas pelo acúmulo de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* induzidas pela LQB-118 levaram esses parasitos a uma morte por apoptose com decorrente liberação do citocromo C, fragmentação do DNA e alterações morfológicas (RIBEIRO et al., 2013).

Por outro lado, alterações mitocondriais, fragmentação do DNA, aumento dos níveis de ROS mitocondrial, alterações ultraestruturais e formação de autofagolisossomos em *T. cruzi* após o tratamento com naftoquininas triazólicas levaram Fernandes e colaboradores a sugerirem a participação de processos autofágicos nesses parasitos (FERNANDES et al., 2012).

Em suma, cada mecanismo de morte apresenta características distintas que as diferem entre si. Na necrose observam-se alterações na membrana celular do parasito, culminando na perda do conteúdo intracelular e conseqüentemente, gerando uma resposta inflamatória. Na apoptose é observada, dentre outras características, a fragmentação do DNA, alteração no ciclo celular e diminuição do potencial de membrana mitocondrial. A autofagia é um tipo de morte celular onde ocorre a vacuolização da célula pelo autofagossomo, levando à degradação do conteúdo celular pela ação de hidrolase lisossomal, além de compartilhar algumas características com a apoptose (LEIST; JÄÄTTELÄ, 2001; MAIURI et al., 2007; GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2012). Sendo assim, mais estudos são necessários a fim de comprovar o tipo de morte celular de *L. infantum* após o tratamento com EGCG.

Mediante aos dados previamente expostos, sabemos que a EGCG atua diretamente em diversos parasitos do gênero *Leishmania*, gerando um acúmulo de ROS, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e diminuição nos níveis de ATP intracelular. Dessa forma, buscamos entender qual seria o mecanismo que seria responsável pelo acúmulo de ROS nesses parasitos. Espécies reativas de oxigênio são moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica o que as tornam altamente reativas. Em níveis normais, esses radicais desempenham importantes papéis biológicos, por outro lado o seu excesso pode gerar uma variedade de patologias que podem, inclusive, levar à morte (BRIEGER et al., 2012).

Os tripanosomatídeos possuem um sistema de defesa antioxidante responsável pela detoxificação de radicais livres. A manutenção de um ambiente intracelular adequado, com a redução de dissulfetos e a neutralização de hidroperóxidos ocorre através de uma troca não enzimática tiol-dissulfeto com a tripanotona (FAIRLAMB; HENDERSON; CERAMI, 1989; KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Nos parasitos, o desbalanço redox pode induzir um aumento nos níveis de ROS que possui uma grande capacidade de gerar danos celulares

diretamente nas proteínas, DNA e lipídios de membrana. Dessa forma, investigamos se a EGCG poderia estar inibindo a enzima chave do balanço redox desses parasitos.

A Figura 4.9 demonstra a atividade enzimática da fração solúvel de promastigotas de *L. infantum* incubadas juntamente com concentrações crescentes de EGCG. Podemos observar a capacidade desse composto em inibir com sucesso essa enzima, demonstrando um valor de K_i de $511\mu\text{M}$. Como controle positivo dessa reação utilizamos a clomipramina, um antidepressivo que demonstrou ser eficiente em interagir com essa enzima por meio de uma inibição competitiva (BENSON et al., 1992; RICHARDSON et al., 2009).

A relação entre a diminuição da atividade da TR com a produção de ROS já foi vista em outros parasitos. Em *T. cruzi*, foi demonstrado que a neoglinana eupomatenóide-5 isolada da planta *Piper regnali* induziu um desbalanço oxidativo nas três formas evolutivas do parasito, demonstrados pelo aumento nos níveis de ROS e diminuição da atividade da TR (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013). Além disso, diversos trabalhos relatam a inibição da TR como sendo a principal causa da morte de protozoários membros da família Trypanosomatidae (DUMAS et al., 1997; CASTRO-PINTO et al., 2004; BAIOTTO et al., 2011, 2013; RODRIGUES et al., 2012).

A fim de corroborar a participação da TR no mecanismo de ação molecular (SWINNEY; ANTHONY, 2011), realizamos um estudo de *docking* para avaliar a interação da EGCG diretamente na enzima TR. O estudo foi calculado sob duas perspectivas: a interação da EGCG no sítio ativo de ligação do substrato e na interação da EGCG no domínio do cofator NADPH (Figura 4.10).

As primeiras análises foram realizadas com a tripanotona reduzida presente na estrutura 4ADW no sítio ativo da TR na ausência do substrato, com a finalidade realizar um *redocking* para a validação dos cálculos. Conforme esperado, os valores energia livre dessa interação foram bastante elevados ($\Delta G > 0,41\text{kcal/mol}$) devido ao fato do cálculo simular a interação com o produto da reação enzimática da TR (Figura 4.11).

Já o estudo do *redocking* realizado com o NADPH retirado da estrutura 4ADW demonstrou ser eficiente para a parametrização das cargas e assinalamento dos aminoácidos utilizados na etapa de normalização das estruturas. O cálculo do

redocking revelou uma conformação estrutural bastante semelhante à estrutura cristalografada do 4ADW com um valor de RMS de 1,94Å, ΔG -6,21 kcal/mol e K_i estimado de 28,22 μ M (Figura 4.12A). Nossas análises demonstraram a participação diferentes aminoácidos participantes da interação entre o cofator e a enzima. Os resíduos Try221, Arg222 e Arg228 participam no reconhecimento entre o NADPH e a TR, já os resíduos Arg222 e Try198 auxiliam nas alterações conformacionais decorrentes dessa reação enquanto que a Met333 interage com o NADPH (BAIOCCO et al., 2009). Com exceção do resíduo Try198, o cálculo do *redocking* demonstrou interações com todos esses aminoácidos descritos (Figura 4.12B).

Uma vez que a interação entre a tripanotona reduzida e a TR mostrou-se desfavorável, utilizamos a tripanotona oxidada como substituinte nos cálculos. O fato desse ligante ser o substrato da TR demonstrou uma maior interação com o sítio catalítico dessa enzima quando comparada com o produto – tripanotona reduzida. Conforme esperado, a tripanotona oxidada interagiu com o sítio ativo da TR e demonstrou dois grupos de conformações relevantes (Figura 4.13). A conformação de menor energia demonstrou uma interação mais favorável com menor valor de K_i estimado (ΔG -5,84kcal/mol e K_i 52,44 μ M). Por outro lado, a estrutura de maior prevalência exibiu 55 repetições com valores de ΔG -3,68kcal/mol e K_i 2,10mM. (Tabela 4.6). A variação de repetições entre a conformação de menor energia e o de maior prevalência deve-se ao fato dessa molécula possuir um elevado peso molecular (721,846g/mol) e uma estrutura complexa (C₂₇H₄₇N₉O₁₀S₂), contribuindo para um elevado número de pontos de torção e, conseqüentemente, elevada probabilidade de conformações.

A EGCG apresentou uma energia de ligação de -6,95kcal/mol e um K_i estimado de 8,10 μ M (Tabela 4.6). Esse composto interagiu com os resíduos Thr397, Asn402, His461, Glu466, Ser109' e Try110' (Figura 4.14). Dentre os aminoácidos que demonstraram interação com a EGCG podemos destacar a Ser109 que participa do movimento de ampliação do sítio ativo da TR no reconhecimento do substrato e a His461' que é o resíduo presente na tríade catalítica da TR (HUNTERL et al., 1992). Além dessas interações, há também uma interação com o grupo carboxílico da cadeia lateral da Glu466A. Esse aminoácido tem uma natureza hidrofóbica, sendo um importante resíduo para a interação de compostos (MUTLU, 2013).

A inibição pela clomipramina demonstrou um valor de ΔG e K_i de -4,59kcal/mol e 435,39 μ M. Esse composto exibiu interação com os aminoácidos Trp21, Ser109, Tyr110 e Met113 (Figura 4.15). Com exceção da Ser109, nossas análises corroboram dados na literatura que reforçam que o mecanismo molecular de compostos tricíclicos, como é a clomipramina, envolvem a participação desses aminoácidos (COLOTTI et al., 2013).

Em seguida, foi calculada a interação dos compostos no sítio de ligação do NADPH. Os cálculos realizados investigando a possibilidade da EGCG interagir com o sítio do cofator gerou dois grupos de conformação, uma com menor energia com 78 repetições e outra com maior probabilidade com 135 repetições (Figura 4.16 e Figura 4.17). A estrutura EGCG de menor energia, interagiu com os aminoácidos Lys60, Tyr198, Ile199, Glu202, Met333 e Ala365. Desses resíduos destacamos Tyr198 e Met333 por estarem envolvidas no mecanismo de interação do NADPH com a TR (Figura 4.16). A conformação da EGCG de maior prevalência demonstrou interações com os aminoácidos Gly197, Tyr198, Ile199, Arg228 e Met333. De forma semelhante a conformação de menor energia, a de maior prevalência também se mostrou capaz de interagir com os aminoácidos que participam do mecanismo de oxidação do NADPH, a Tyr198, Arg228 e Met333 (Figura 4.17).

Os dados da análise da clomipramina no sítio de ligação do NADPH demonstraram a interação desse composto com os aminoácidos Lys60, Tyr198, Leu334 e Ala365. Desses resíduos apenas a Tyr198 está envolvida diretamente no mecanismo de reação do NADPH, o que pode justificar uma interação mais desfavorável quando comparada aos cálculos com a EGCG nas interações no sítio do cofator (Figura 4.18).

Estudos revelaram a capacidade de algumas estruturas químicas como possíveis inibidoras da TR, como é o caso dos compostos tricíclicos (FAIRLAMB; HENDERSON; CERAMI, 1989; RICHARDSON et al., 2009) e do ácido gálico (EGER, 2010). Os flavonoides apresentam três anéis aromáticos como parte de sua estrutura básica e a EGCG contém um grupo galato ligado ao seu núcleo flavan. Essas características reforçam a hipótese da participação da TR como parte do mecanismo de ação molecular da EGCG. Dada a possibilidade da interação em mais de um sítio de ligação da enzima, sugerimos que a inibição da TR pela EGCG seja mista.

Uma vez discutido o efeito da EGCG em promastigotas de *L. infantum* e o seu mecanismo de ação, seguimos adiante na caracterização do potencial terapêutico desse composto. Recentemente derivados de produtos naturais vêm sendo reconhecidos por suas excelentes propriedades farmacológicas. Nesse intuito, investigamos efeito da EGCG na forma biológica encontrada no interior das células fagocíticas do sistema imunológico dos mamíferos e responsáveis pela manutenção da doença: as amastigotas intracelulares.

Macrófagos peritoneais murinos foram infectados e tratados com diferentes concentrações de EGCG por 72 horas. Após esse período o índice de infecção, que faz uma correlação entre a porcentagem de macrófagos infectados vezes o número de amastigotas e os macrófagos totais, foi calculado. A EGCG diminuiu o índice de infecção de maneira dose dependente, apresentando um valor de IC₅₀ de 3,8µM e uma inibição de aproximadamente 90% na maior concentração utilizada (24µM) (Figura 4.19).

Valores semelhantes foram encontrados em amastigota intracelular de *L. amazonensis* (1,6µM) (INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013) e *L. braziliensis* (3,4µM) (INACIO et al., 2014). A discrepância dos os valores de IC₅₀ entre a forma promastigota e amastigota intracelular pode ser explicada por meio de duas hipóteses. A primeira é que há relatos de que a eficácia de alguns compostos pode variar conforme o estágio biológico no qual está sendo realizado o estudo (SANTOS et al., 2009) ou o macrófago pode acumular elevados níveis de EGCG aumentando a sua concentração no interior do seu vacúolo, semelhantemente ao tratamento com baixas doses de inibidor de protease de HIV-1 em amastigota intracelular ser mais potente do que em amastigota axênica (TRUDEL et al., 2008).

A EGCG ainda apresentou um excelente índice de seletividade. Esse índice é gerado através da razão entre o CC₅₀ (em macrófagos murinos), que foi de 436,3µM (INACIO; CANTO-CAVALHEIRO; ALMEIDA-AMARAL, 2013), e o EC₅₀ (em amastigota intracelular) que foi de 3,8µM (Figura 4.19). Dessa forma, o valor do índice de seletividade foi de 114,8. Quando o valor do índice de seletividade é maior que 10, reforça que a diminuição de amastigota intracelular é proveniente de um efeito direto da droga e não um efeito indireto da toxicidade do composto ao macrófago (PINK et al., 2005).

Uma vez demonstrado o mecanismo de ação da EGCG em promastigotas de *L. infantum* podemos extrapolar o mesmo mecanismo para a forma intracelular. Nossos dados sustentam a hipótese de que a TR seria o alvo molecular para disparar os eventos subsequentes que culminam na morte do parasito. E até o momento, não foram descritas diferenças estruturais entre a TR de promastigota para a TR de amastigota intracelular. Além disso, em *L. braziliensis* foi demonstrado que promastigotas e amastigota intracelular compartilham o mesmo mecanismo de ação baseado no aumento dos níveis de ROS e, conseqüentemente, a morte do parasito (INACIO et al., 2014).

Na busca de um fármaco ideal para o combate das leishmanioses encontram-se características desejáveis, como segurança, eficácia, possibilidade para a combinação com outros fármacos, fácil administração, curto esquema terapêutico e que seja administrado por via oral (CARVALHO; ARRIBAS; FERREIRA, 2000; SINGH; SIVAKUMAR, 2004; CROFT; OLLIARO, 2011; WHO, 2017a). Outras características para o desenvolvimento de um composto líder para o tratamento da leishmaniose visceral é demonstrar alta potência com IC₅₀ menor que 10µM em amastigota intracelular e apresentar efeito *in vivo* em modelo experimental de leishmaniose visceral murina demonstrando uma supressão da carga parasitária do fígado maior que 70% em um esquema terapêutico de no máximo 5 doses administrados por via oral 50mg/kg/dia uma ou duas vezes ao dia (KATSUNO et al., 2015).

Logo, o próximo passo para caracterizar a EGCG como um composto líder para o tratamento da leishmaniose visceral é avaliar o seu potencial terapêutico *in vivo*. Sendo assim, o modelo utilizado para esse estudo foi a infecção em camundongos BALB/c por via intraperitoneal com 2x10⁶ parasitos/100µL de promastigotas de *L. infantum*. Esse protocolo tem sido bem estabelecido e garante uma diferença significativa da carga parasitária no fígado já na primeira semana de infecção (DA CUNHA-JÚNIOR et al., 2016). Portanto, estabelecemos um esquema terapêutico seguindo as recomendações para o desenvolvimento de um composto líder.

Após 7 dias de infecção foi dado início ao tratamento durante um período de tempo de apenas 5 dias, no qual um grupo recebeu por via oral duas vezes ao dia a dose 6,25mg/kg, outro grupo 12,5mg/kg e outro 25mg/kg, atingindo uma dose máxima de 12,5mg/kg, 25mg/kg e 50mg/kg, respectivamente, por dia. Um outro

grupo foi tratado com 50mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina por via intramuscular. Somente após permanecerem 18 dias sem nenhum tratamento, os camundongos foram eutanasiados e a carga parasitária quantificada.

A EGCG diminuiu significativamente o número de parasitos em 92% na maior dose administrada (Figura 4.20), demonstrando valores de ED₅₀ e ED₉₀ de 7mg/kg e 9,9mg/kg. O grupo tratado com Sb⁵⁺ foi capaz de diminuir a carga parasitária em aproximadamente 98% em relação ao grupo não tratado, contudo, não apresentou diferença significativa em relação ao grupo tratado com EGCG (25 mg/kg). Esses resultados reforçam que a EGCG apresenta as características desejáveis para avançar nas etapas para o desenvolvimento de um fármaco.

Além de demonstrar um excelente perfil no tratamento da leishmaniose visceral experimental murina a EGCG mostrou um amplo espectro de ação, atuando em diferentes espécies de *Leishmania* sp. Dados anteriores do nosso grupo revelaram que em outros modelos a EGCG também mostrou ser eficiente em modelo murino de infecção experimental de leishmaniose cutânea. No modelo induzido por *L. amazonensis* camundongos BALB/c foram tratados por 45 dias com 30mg/kg/dia 5 vezes na semana com EGCG por via oral e diminuiu aproximadamente 95% da carga parasitária. Já no modelo de *L. braziliensis*, camundongos foram tratados com 100mg/kg/dia por 11 dias consecutivos e resultou em uma redução de aproximadamente 92% da carga parasitária (INACIO et al., 2014). Vale ressaltar que nenhuma dessas estratégias terapêuticas utilizadas demonstraram alterações nos padrões de toxicidade renal e hepática.

A EGCG não é único flavonoide que tem sido estudado para o tratamento das leishmanioses. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que outras classes de produtos naturais vem atuando de forma promissora para o tratamento das leishmanioses, como é o exemplo da quercetina (flavonol) (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013) e apigenina (flavona) (FONSECA-SILVA et al., 2015, 2016). Nossos dados reforçam o grande potencial dos produtos naturais na busca de novas terapias para as doenças tropicais negligenciadas e nos estimulam a irmos adiante no combate dessas patologias. Portanto seguimos gerando conhecimento a respeito de mecanismos bioquímicos e celulares desses parasitos para que novos alvos e novas abordagens terapêuticas sejam estimuladas a fim de levar uma melhor qualidade de vida e um ar de esperança aos acometidos por essas doenças.

6. Conclusões

Em geral, pode-se concluir que a EGCG demonstrou ser um composto promissor no estudo para o tratamento das leishmanioses por demonstrar um efeito aditivo com fármacos utilizados atualmente na clínica e pelo seu potente efeito terapêutico em diferentes modelos experimentais de leishmaniose murina. De maneira específica, conclui-se que:

1. A EGCG inibiu a proliferação de promastigotas de *L. infantum* e demonstrou uma interação aditiva com miltefosina e anfotericina B, dois fármacos utilizados para o tratamento das leishmanioses;
2. O mecanismo de ação da EGCG envolve o acúmulo de ROS, seguido da diminuição do potencial de membrana mitocondrial e consequente depleção dos níveis de ATP intracelular;
3. Esses eventos seriam decorrentes da inibição da TR pela EGCG como mecanismo de ação molecular;
4. A EGCG pode se ligar tanto no sítio do substrato como no sítio do cofator, sugerindo uma inibição mista;
5. O efeito terapêutico da EGCG demonstrou características desejáveis para um candidato a fármaco, como: IC₅₀ em amastigota intracelular menor que 10µM, supressão da carga parasitária no fígado maior que 70% e um curto período de tratamento com no máximo 5 doses de 50mg/kg administrados por via oral uma ou duas vezes ao dia.

7. Bibliografia

ABOULAILA, M.; YOKOYAMA, N.; IGARASHI, I. Inhibitory effects of (-)-Epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of Babesia parasites. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 785, 22 abr. 2010.

ADLER, S. Leishmania. **Advances in Parasitology**, v. 2, p. 35–96, 1964.

ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, 2007.

BAIOCCO, P.; COLOTTI, G.; FRANCESCHINI, S.; ILARI, A. Molecular basis of antimony treatment in Leishmaniasis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603–2612, 2009.

BAIOCCO, P.; ILARI, A.; CECI, P.; ORSINI, S.; GRAMICCIA, M.; MUCCIO, T. Di; COLOTTI, G.; INFETTIVE, M.; IMMUNOMEDIATE, P.; SUPERIORE, I.; ELENA, V. R. Inhibitory Effect of Silver Nanoparticles on Trypanothione Reductase. **Molecular Biology**, v. 2, p. 230–233, 2011.

BAIOCCO, P.; POCE, G.; ALFONSO, S.; COCOZZA, M.; PORRETTA, G. C.; COLOTTI, G.; BIAVA, M.; MORACA, F.; BOTTA, M.; YARDLEY, V.; FIORILLO, A.; LANTELLA, A.; MALATESTA, F.; ILARI, A. Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by azole-based compounds: A comparative analysis with its physiological substrate by x-ray crystallography. **ChemMedChem**, v. 8, n. 7, p. 1175–1183, 2013.

BENSON, T. J.; MCKIE, J. H.; GARFORTH, J.; BORGES, A.; FAIRLAMB, A. H.; DOUGLAS, K. T. Rationally designed selective inhibitors of trypanothione reductase. Phenothiazines and related tricyclics as lead structures. **Biochemical Journal**, v. 286, n. 1, p. 9–11, 1992.

BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of infectious diseases**, v. 10, n. 3, p. 560–586, 1988.

BERMAN, J. D. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 9, p. 1209–1216, 2008.

BHATTACHARYYA, A. K. Classics in Indian medicine. **The National**

medical journal of India, v. 7, n. 4, p. 196–202, 1994.

BISHAYEE, K.; GHOSH, S.; MUKHERJEE, A.; SADHUKHAN, R.; MONDAL, J.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, In cervical carcinoma: Signal cascade and drug-DNA interaction. **Cell Proliferation**, v. 46, n. 2, p. 153–163, 2013.

BITTENCOURT, A. L.; COSTA, J. M. L.; CARVALHO, E. M.; BARRAL, A. Leishmaniasis Recidiva Cutis in American Cutaneous Leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 32, n. 11, p. 802–805, 1993.

BLAS, E.; CHITSULO, L.; PHILIPPE, M. P.; ENGERS, H. D.; JANE, F.; KAYONDO, K.; KIOY, D. W.; KUMARASWAMI, V.; LAZDINS, J. K.; PAUL, P.; ODUOLA, A.; RIDLEY, R. G.; TOURE, Y. T.; ZICKER, F.; MOREL, C. M. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. v. 18, n. 10, p. 421–426, 2002.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; MILLER, J.; KRAUSE, K. Reactive oxygen species: from health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, p. 1–14, 2012.

CARVALHO, P.; ARRIBAS, M.; FERREIRA, E. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 36, p. 69–96, mar. 2000.

CASTRO-PINTO, D. B.; ECHEVARRIA, A.; GENESTRA, M. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Trypanothione reductase activity prominent in metacyclic promastigotes and axenic amastigotes of *Leishmania amazonensis*. Evaluation of its potential as a therapeutic target. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 57–63, 2004.

CHANG, K. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. **International review of cytology**, v. 14, p. 267–305, 1983.

CHANG, K.; FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. **Ciba Foundation Symposium**, v. 99, p. 113–137, 1983.

CHATELAIN, E.; IOSET, J. R. Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. **Drug Design, Development and Therapy**, n. 5, p. 175–181, 2011.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or

meglumine antimoniate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 69–72, 1988.

COLOTTI, G.; BAIOTTO, P.; FIORILLO, A.; BOFFI, A.; POSER, E.; CHIARO, F. Di; ILARI, A. Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 15, p. 1861–1875, 2013.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: From arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, p. 269–285, 2011.

COSTA, J. M. L. O uso Clínico das Pentamidinas com Especial Referência nas Leishmanioses. **Acta Amazonica**, v. 23, n. 2–3, p. 163–172, 1993.

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

CZAPLIŃSKA, M.; CZEPAS, J.; GWOŹDZIŃSKI, K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. **Postepy Biochem**, v. 58, n. 3, p. 235–244, 2012.

DA CUNHA-JÚNIOR, E. F.; MARTINS, T. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MARQUES, P. R.; PORTARI, E. A.; COELHO, M. G. P.; NETTO, C. D.; COSTA, P. R. R.; SABINO, K. C. de C.; TORRES-SANTOS, E. C. Preclinical studies of LQB-118: subacute toxicity and therapeutic evaluation in experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3794–3801, 2016.

DAS, S.; DAS, J.; SAMADDER, A.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A. R. Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, p. 1433–1448, 2012.

DAVID, C.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491–502, 2009.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004.

DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; VERNON, J. R&D Costs, Innovative Output and Firm Size in the Pharmaceutical Industry. **International Journal of the**

Economics of Business, v. 2, n. 2, p. 201–219, 1995.

DOLINSKY, T. J.; NIELSEN, J. E.; MCCAMMON, J. A.; BAKER, N. A. PDB2PQR: An automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 665–667, 2004.

DORLO, T. P. C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 2012.

DUMAS, C.; OUELLETTE, M.; TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; TAMAR, S.; OLIVIER, M.; PAPADOPOULOU, B. Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **EMBO Journal**, v. 16, n. 10, p. 2590–2598, 1997.

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. UFSC [Tese de doutorado], 2010.

EL-ON, J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. **Israel Medical Association Journal**, v. 11, n. 10, p. 623–628, 2009.

FAIRLAMB, A. H. Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 1. Novel approaches to the chemotherapy of trypanosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, p. 613–617, 1990a.

FAIRLAMB, A. H. Trypanothione metabolism and rational approaches to drug design. **Biochemical Society Transactions**, v. 18, n. 5, p. 717–720, 1990b.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 14, n. 2, p. 187–198, 1985.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 695–729, 1992.

FAIRLAMB, A. H.; HENDERSON, G. B.; CERAMI, A. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2607–2611, 1989.

FERNANDES, M. C.; DA SILVA, E. N.; PINTO, A. V.; DE CASTRO, S. L.; MENNA-BARRETO, R. F. S. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 26–36, 2012.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.

FITZGERALD, J. B.; SCHOEBERL, B.; NIELSEN, U. B.; SORGER, P. K. Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 9, p. 458–466, 2006.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 2004.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 880–884, 2015.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **J. Nat. Prod.**, v. 76, p. 1505–1508, 2013.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. 1–16, 2016.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondria: master regulators of

danger signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 12, p. 780–788, 2012.

GASSER, R. A.; MAGILL, A. J.; OSTER, C. N.; FRANKE, E. D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 83–90, 1994.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. Leishmaniasis in humans: Drug or vaccine therapy? **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 25–40, 2018.

GILBERT, I. H. Drug Discovery for Neglected Diseases: Molecular Target-Based and Phenotypic Approaches. **Journal of medicinal chemistry**, v. 56, p. 7719–7726, 2013.

GLEW, R. H.; SAHA, A. K.; DAS, S.; REMALEY, a T. Biochemistry of the *Leishmania* species. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 4, p. 412–432, 1988.

GOODWIN, L. G. Pentostam® (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 3, p. 339–341, 1995.

GOTO, H.; LAULETTA LINDOSO, J. A. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

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

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2012.

GÜIDA, M. C.; ESTEVA, M. I.; CAMINO, A.; FLAWIÁ, M. M.; TORRES, H. N.; PAVETO, C. *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* and *in vivo* antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). **Experimental Parasitology**, v. 117, n. 2, p. 188–194, 2007.

HAMILTON, C. J.; SARAVANAMUTHU, A.; EGGLESTON, I. M.; FAIRLAMB, A. H. Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione *in situ*: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione

reductase. **Biochemical Journal**, v. 369, n. 3, p. 529–537, 2003.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 96, n. 2–3, p. 67–202, 2002.

HE, L.; ZHANG, E.; SHI, J.; LI, X.; ZHOU, K.; ZHANG, Q.; LE, A. D.; TANG, X. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits human papillomavirus (HPV)-16 oncoprotein-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer cells by targeting HIF-1 α . **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 71, n. 3, p. 713–725, 2013.

HENDERSON, G. B.; FAIRLAMB, A. H. Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 3, n. 10, p. 312–315, 1987.

HOENSCH, H.; OERTEL, R. Anti-inflammatorische Wirkungen der Tee-Flavonoide. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 137, n. 51–52, p. 2738–2740, 2012.

HUNTERL, W. N.; BAILEY, S.; HABASH, J.; HARROPL, S. J.; HELLIWEH, J. R.; ABOAGYE-KWARTENGJ, T.; SMITH, K.; FAIRLAMB, A. H.; AUGUST, I. Active Site of Trypanothione A Target for Rational Reductase Drug Design. **J. Mol. Biol.**, v. 227, n. 1, p. 322–333, 1992.

ILARI, A.; FIORILLO, A.; GENOVESE, I.; COLOTTI, G. An update on structural insights into the enzymes of the polyamine-trypanothione pathway: targets for new drugs against leishmaniasis. **Future Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 61–77, 2017.

INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. In vitro and in vivo effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of natural products**, v. 76, n. 10, p. 1993–1996, 2013.

INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; RUBEM, R. F.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 151–155, 2012.

INACIO, J. D. F.; GERVAZONI, L.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O - Gallate *In Vitro* and *In Vivo* in *Leishmania braziliensis*: Involvement of Reactive Oxygen Species as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, 2014.

IRIGOÍN, F.; CIBILS, L.; COMINI, M. A.; WILKINSON, S. R.; FLOHÉ, L.; RADI, R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, n. 6, p. 733–742, 2008.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 23–24, p. 1272–1281, 2013.

KARJALAINEN, E.; REPASKY, G. A. Molecular Changes During Acute Myeloid Leukemia (AML) Evolution and Identification of Novel Treatment Strategies Through Molecular Stratification. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 144, p. 383–436, 2016.

KATSUNO, K.; BURROWS, J. N.; DUNCAN, K.; VAN HUIJSDUIJNEN, R. H.; KANEKO, T.; KITA, K.; MOWBRAY, C. E.; SCHMATZ, D.; WARNER, P.; SLINGSBY, B. T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 11, p. 751–758, 2015.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, p. 55–62, 2003.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KHAN, N.; AFAQ, F.; SALEEM, M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. **Cancer Research**, v. 66, n. 5, p. 2500–2505, 2006.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KRAUTH-SIEGEL, L.; JACOBY, E.; SCHIRMER, R. H. Trypanothione and N1-glutathionylspermidine: Isolation and determination. **Methods in Enzymology**, v. 251, n. 1975, p. 287–294, 1995.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1780, n. 11, p. 1236–1248, 2008.

LAINSON, R.; SHAW, J.; SILVEIRA, F. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Transactions of the Royal Society of Tropical**

Medicine and Hygiene, v. 81, n. 4, p. 702–703, 1987.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 17–28, 2013.

LEHANE, A. M.; SALIBA, K. J. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. **BMC Research Notes**, v. 1, n. 1, p. 26, 2008.

LEID, R.; SUQUET, C.; TANIGOSHI, L. Oxygen Detoxifying Enzymes in Parasites: A Review. **Acta Leiden**, v. 57, n. 2, p. 107–114, 1989.

LEISHMAN, W. B. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **BMJ**, v. 2, p. 1252–1254, 21 nov. 1903.

LEIST, M.; JÄÄTTELÄ, M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 8, p. 589–598, 2001.

LI, W.; NIE, S.; YU, Q.; XIE, M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 15, p. 6685–6691, 2009.

LYRA, M. R.; PASSOS, S. R. L.; PIMENTEL, M. I. F.; BEDOYA-PACHECO, S. J.; VALETE-ROSALINO, C. M.; VASCONCELLOS, E. C. F.; ANTONIO, L. F.; SAHEKI, M. N.; SALGUEIRO, M. M.; SANTOS, G. P. L.; RIBEIRO, M. N.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MADEIRA, M. F.; SILVA, J. L. N.; FAGUNDES, A.; SCHUBACH, A. O. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 68, p. 1–6, 2016.

MAIURI, M. C.; ZALCKVAR, E.; KIMCHI, A.; KROEMER, G. Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 9, p. 741–752, 2007.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 1–8, 2010.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; GONCALVES, R. L. S.; COSTA, E. M.; SILVA,

R. S. F.; PINTO, A. V.; OLIVEIRA, M. F.; DE CASTRO, S. L. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 5, p. 644–653, 2009.

MERELES, D.; HUNSTEIN, W. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) for clinical trials: More Pitfalls than Promises? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 9, p. 5592–5603, 2011.

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 112–116, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Nota técnica nº 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa**, 2016. Disponível em: <<https://www.apipa10.org/images/apipa/downloads/nota-tecnica-milteforan.pdf>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2013. .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**, 2014. .

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis : Past , Present and Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1153–1169, 2007.

MURGOLO, N. J.; CERAMI, A.; HENDERSON, G. B. Biomedical science and the third world. Under the volcano. Trypanothione reductase. **Ann N Y Acad Sci**, v. 569, p. 193–200, 1989.

MUSA, A. M.; KHALIL, E. A. G.; MAHGOUB, F. A. E.; ELGAWI, S. H. H.; MODABBER, F.; ELKADARU, A. E. M. Y.; ABOUD, M. H.; NOAZIN, S.; GHALIB, H. W.; EL-HASSAN, A. M. Immunochemotherapy of persistent post-kala-azar dermal leishmaniasis: a novel approach to treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 1, p. 58–63, 2008.

MUTLU, O. Molecular modeling, structural analysis and identification of ligand binding sites of trypanothione reductase from *Leishmania mexicana*. v. 50, p. 38–44, 2013.

NDJONKA, D.; RAPADO, L. N.; SILBER, A. M.; LIEBAU, E.; WRENGER, C.

Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395–3439, 2013.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, n. 9, p. 754–765, 2008.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003.

OMOLLO, R.; ALEXANDER, N.; EDWARDS, T.; KHALIL, E. A. G.; YOUNIS, B. M.; ABUZAIID, A. A.; WASUNNA, M.; NJOROGE, N.; KINOTI, D.; KIRIGI, G.; DORLO, T. P. C.; ELLIS, S.; BALASEGARAM, M.; MUSA, A. M. Safety and Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: Study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, v. 12, p. 1–10, 2011.

OSMAN, O. F.; KAGER, P. A.; OSKAM, L. Leishmaniasis in the Sudan: A literature review with emphasis on clinical aspects. **Tropical Medicine and International Health**, v. 5, n. 8, p. 553–562, 2000.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

PAL, C.; BANDYOPADHYAY, U. Redox-Active Antiparasitic Drugs. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 17, n. 4, p. 555–582, 2012.

PANDEY, K.; SINHA, P. K.; DAS, V. R.; BIMAL, S.; SINGH, S. K.; DAS, P. Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis - Current scenario. **Clinical Medicine: Pathology**, v. 2009, n. 2, p. 1–4, 2009.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J. H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000-11): A systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. 371–379, 2013.

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M. A.; BENDIG, M. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727–740, 2005.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, n. 972, p. 649–657, 2006.

PNUD. **Desenvolvimento humano nas macrorregiões brasileiras**, 2016. .

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: Drug resistance and natural products. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 23, n. 4, p. 521–527, 1998.

PONTE-SUCRE, A.; GAMARRO, F.; DUJARDIN, J.-C.; BARRETT, M. P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; GARCÍA-HERNÁNDEZ, R.; POUNTAIN, A. W.; MWENECHANYA, R.; PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1–24, 2017.

RAHMAN, R.; GOYAL, V.; HAQUE, R.; JAMIL, K.; FAIZ, A.; SAMAD, R.; ELLIS, S.; BALASEGARAM, M.; BOER, M. den; RIJAL, S.; STRUB-WOURGAFT, N.; ALVES, F.; ALVAR, J.; SHARMA, B. Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2017.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S.; WASHINGTON, G.; LEOPOLD, P.; BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 7, p. 581–596, 2007.

REZENDE, J. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. **À Sombra Do Plátano: Crônicas De História Da Medicina [Online]**, p. 359–362, 2009.

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JÚNIOR, E. F.; PINHEIRO, R. O.; DA-SILVA, S. A. G.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; DA SILVA, A. J. M.; COSTA, P. R. R.; NETTO, C. D.; MELO, R. C. N.; ALMEIDA-AMARAL, E. E.; TORRES-SANTOS, E. C. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 789–799, 2013.

RICHARDSON, J. L.; NETT, I. R. E.; JONES, D. C.; ABDILLE, M. H.; GILBERT, I. H.; FAIRLAMB, A. H. Improved tricyclic inhibitors of trypanothione reductase by screening and chemical synthesis. **ChemMedChem**, v. 4, n. 8, p.

1333–1340, 2009.

RODRIGUES, R. F.; CASTRO-PINTO, D.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C. M.; DEL CISTIA, C. N.; SANT'ANNA, C. M. R.; TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L. L.; TOMÁS, A. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 1760–1766, 2012.

ROMERO, G. A. S.; COSTA, D. L.; COSTA, C. H. N.; DE ALMEIDA, R. P.; DE MELO, E. V.; DE CARVALHO, S. F. G.; RABELLO, A.; DE CARVALHO, A. L.; SOUSA, A. de Q.; LEITE, R. D.; LIMA, S. S.; AMARAL, T. A.; ALVES, F. P.; RODE, J. Efficacy and safety of available treatments for visceral leishmaniasis in Brazil: A multicenter, randomized, open label trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–25, 2017.

ROSS, R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. **British Medical Journal**, v. 2, n. 2237, p. 1261–1262, 1903.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania*. **Experimental Parasitology**, v. 69, n. 1, p. 100–103, 1989.

SACKS; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E. R.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment - A challenge that remains: A review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1–10, 2008.

SANTOS, L. O.; MARINHO, F. A.; ALTOÉ, E. F.; VITÓRIO, B. S.; ALVES, C. R.; BRITTO, C.; MOTTA, M. C. M.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S.; D'AVILA-LEVY, C. M. HIV aspartyl peptidase inhibitors interfere with cellular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: Psychodidae) under experimental conditions. **Journal of medical entomology**, v. 23, n. 1, p. 11–15, 1986.

SCHÜTTELKOPF, A. W.; VAN AALTEN, D. M. F. PRODRG: A tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 60, n. 8, p. 1355–1363, 2004.

SCOTTI, M.; SCOTTI, L.; ISHIKI, H.; RIBEIRO, F.; CRUZ, R.; OLIVEIRA, M.; MENDONÇA, F. Natural Products as a Source for Antileishmanial and Antitrypanosomal Agents. **Comb Chem High Throughput Screen**, v. 19, n. 7, p. 537–553, 2016.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. *In Vitro* and *In Vivo* Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.

SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 233–244, 2006.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 10, n. 6, p. 307–315, 2004.

STEMMER, K. L. Pharmacology and toxicology of heavy metals: antimony. **Pharmacology and Therapeutics, Part A: Chemotherapy, Toxicology and**, v. 1, n. 2, p. 157–160, 1976.

SUH, K. S.; CHON, S.; OH, S.; KIM, S. W.; KIM, J. W.; KIM, Y. S.; WOO, J. T. Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 26, n. 3, p. 189–199, 2010.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 787–794, 2008.

SUNDAR, S.; SINHA, P. K.; RAI, M.; VERMA, D. K.; NAWIN, K.; ALAM, S.; CHAKRAVARTY, J.; VAILLANT, M.; VERMA, N.; PANDEY, K.; KUMARI, P.; LAL, C. S.; ARORA, R.; SHARMA, B.; ELLIS, S.; STRUB-WOURGAFT, N.; BALASEGARAM, M.; OLLIARO, P.; DAS, P.; MODABBER, F. Comparison of short-course multidrug

treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, 2011.

SUNDAR, S.; SINHA, P. R.; AGRAWAL, N. K.; SRIVASTAVA, R.; RAINEY, P. M.; BERMAN, J. D.; MURRAY, H. W.; SINGH, V. P. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 139–143, 1998.

SWINNEY, D. C.; ANTHONY, J. How were new medicines discovered? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 7, p. 507–519, 2011.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 7–11, 2013.

TOVAR, J.; CUNNINGHAM, M. L.; SMITH, A. C.; CROFT, S. L.; FAIRLAMB, A. H. Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant mutant homologue: Effect on parasite intracellular survival. **Microbiology**, v. 95, n. April, p. 5311–5316, 1998.

TRINCONI, C. T.; REIMÃO, J. Q.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; MIGUEL, D. C.; ULIANA, S. R. B. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2608–2613, 2014.

TRUDEL, N.; GARG, R.; MESSIER, N.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; TREMBLAY, M. J. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 protease inhibitors. **The Journal of infectious diseases**, v. 198, n. 9, p. 1292–1299, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18816190>>.

TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, JR., W. D.; CARVALHO, E. M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.

UNANUE, E. R.; ALLEN, P. M. The basis for the immunoregulatory role of

macrophages and other accessory cells. **Science**, v. 236, p. 551–557, 1987.

VALETE-ROSALINO, C. M.; ARAUJO-MELO, M. H.; BEZERRA, D. C. de O.; DE BARCELOS, R. O.; DE MELO-FERREIRA, V.; TORRACA, T. S. de S.; MARTINS, A. C. da C.; MOREIRA, J. S.; VARGAS, M. C. M.; BRAGA, F. P. B.; SALGUEIRO, M. de M.; SAHEKI, M. N.; SCHUBACH, A. O. Primeiro relato de ototoxicidade pelo antimoniato de meglumina. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 56, n. 5, p. 439–442, 2014.

VAN ZANDBERGEN, G.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VANNIER-SANTOS, M. a; MARTINY, a; DE SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

VIANNA, G. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar com Injeções Intravenosas de Tártaro Emético. **Anais do VII Congresso Brasileiro de Medicina e Cirurgia**, v. 4, n. 3, p. 426–428, 1912.

WASUNNA, M.; NJENGA, S.; BALASEGARAM, M.; ALEXANDER, N.; OMOLLO, R.; EDWARDS, T.; DORLO, T. P. C.; MUSA, B.; ALI, M. H. S.; ELAMIN, M. Y.; KIRIGI, G.; JUMA, R.; KIP, A. E.; SCHOONE, G. J.; HAILU, A.; OLOBO, J.; ELLIS, S.; KIMUTAI, R.; WELLS, S.; KHALIL, E. A. G.; STRUB WOURGAFT, N.; ALVES, F.; MUSA, A. Efficacy and Safety of AmBisome in Combination with Sodium Stibogluconate or Miltefosine and Miltefosine Monotherapy for African Visceral Leishmaniasis: Phase II Randomized Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 9, p. 1–18, 2016.

WESTON, L. A.; MATHESIUS, U. Flavonoids: Their Structure, Biosynthesis and Role in the Rhizosphere, Including Allelopathy. **Journal of Chemical Ecology**, v. 39, n. 2, p. 283–297, 2013.

WHO. Resolution from the 16°. World Health Assembly. p. 4, 2007. Disponível em: <www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_60.13_Eng.pdf?ua=1>.

WHO. **First WHO report on neglected tropical diseases: working to**

overcome the global impact of neglected tropical diseasesWorld Health Organization, 2010. .

WHO. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 975, p. v–xii, 1-100, 2012a.

WHO. **Fourth WHO Report on neglected Tropical Diseases: Integrating neglected tropical diseases into global health and development**.WHO Report on Neglected Tropical Diseases, 2017a. .

WHO. **World Health Statistics 2017 : Monitoring Health for The SDGs**, 2017b. .

WHO. **Weekly epidemiological record**Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance, 2017c. .

WHO, W. H. O. Accelerating Work to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases: A Roadmap for Implementation. **World Health Organization**, p. 1–42, 2012b.

YANG, C.; HONG, J.; HOU, Z.; SANG, S. Green Tea Polyphenols : Antioxidative and Prooxidative Effects. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3181S, 2004.

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A. G.; EL HASSAN, I. M.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 2, p. 87–98, 2003.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: Recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 0, n. 0, 2017.