

LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS
MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* E NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

S729a
2016

Souza, Luciana Ângelo de, 19-

Avaliação da ação leishmanicida de inibidores de enzimas
modificadoras de histonas em *Leishmania braziliensis* e na
infecção de macrófagos / Luciana Ângelo de Souza. – Viçosa,
MG, 2016.

xi, 77f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.63-71.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Inibidores enzimáticos.
3. Proteínas. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento
de Biologia Geral. Programa de Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

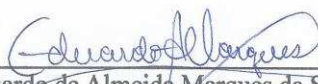
CDD 22. ed. 614.534

LUCIANA ÂNGELO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DE ENZIMAS
MODIFICADORAS DE HISTONAS EM *Leishmania braziliensis* E NA INFECÇÃO DE
MACRÓFAGOS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Estrutural, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de fevereiro de 2016.


Eduardo de Almeida Marques da Silva


Marisa Alves Nogueira Diaz


Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientador)

AGRADECIMENTOS

Considero este trabalho um desafio que me propus há dois anos. Sendo assim, ele é fruto de muito esforço, dedicação e principalmente, colaboração.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, meu alicerce a todo instante. Sem Ele, os momentos difíceis seriam intransponíveis.

Agradeço aos meus pais, Maria Lúcia e Sebastião, e à minha irmã, Juliana, pelo amor incondicional, apoio e cuidados em todos os momentos.

Agradeço ao Feiber, meu noivo, meu grande incentivador desde o primeiro momento deste desafio. Obrigada pela paciência e por viver tudo isso ao meu lado.

Agradeço à Juliana Fietto, minha querida orientadora, pela oportunidade, ensinamentos e por confiar também a mim um Projeto de tamanha importância.

Agradeço ao Matheus Bastos, meu co-orientador, que mesmo antes de sê-lo, SEMPRE se mostrou disposto a me ajudar. Sua ajuda e ensinamentos foram fundamentais para este trabalho acontecer.

Agradeço à Joice, Rafaela e Fernanda, pela paciência e ensinamentos quando eu nada sabia sobre “fazer ciência”.

Agradeço ao Wemerson, pela ajuda nas correrias em ler os experimentos.

Agradeço ao Thiago Onofre, pelas dicas e conselhos sobre o cultivo celular.

Agradeço à Amanda, pelas conversas e por ser um exemplo de que não devemos desistir frente às dificuldades.

Agradeço à Gabi e à Grazi, por tornarem os dias mais alegres e extrovertidos no laboratório.

Agradeço ao Sr. Valdir e à Dayse, principalmente pela boa vontade e preocupação na preparação dos materiais.

Agradeço à Beth, secretária do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela boa vontade e paciência sempre que precisei.

Agradeço aos alunos dos Laboratórios do Professor Luciano Fietto e do Professor Mafra, pela colaboração quanto ao uso dos equipamentos.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Bioquímica pela boa vontade em ajudar quando preciso.

Agradeço à Alessandra, Virgínia e Felipe, queridos amigos da Biologia Celular, pelos momentos de descontração ao longo desses dois anos.

Agradeço ao Ramon e ao Raoni pelo auxílio durante as dúvidas nos experimentos.

Agradeço ao Wolfgang Sippl, pelos esclarecimentos e indicações de fontes que auxiliaram no melhor entendimento quanto à ação dos compostos testados.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela disponibilização da bolsa de estudos.

À União Européia: “This Project has received funding from the European Union’s Framework Programme for research, technological development and demonstration under grant agreement nº 602080”.

Muito obrigada a todos vocês!

“Hoje me sinto mais forte, mais feliz, quem sabe? Só levo a certeza de que muito pouco eu sei. Nada sei.” (Renato Teixeira)

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS.....	vii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	viii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leishmaniose.....	1
1.2. Enzimas Modificadoras de Histonas.....	3
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Leishmaniose Tegumentar.....	6
2.2. Epigenética e HMEs.....	13
2.3. Enzimas modificadoras de histonas como alvo para o desenvolvimento de drogas anti-parasitárias.....	21
2.4. Inibidores de HDAC.....	24
2.5. O Consórcio de Pesquisa A-ParaDDIsE.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. Objetivo Geral.....	28
3.2. Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1. Cepa M2904 de <i>L.braziliensis</i>	29
4.2. Cepa M2904-GFP de <i>L. braziliensis</i>	29
4.3. Linhagem de macrófagos Raw 264.7.....	29
4.4. Manutenção dos parasitos in vitro.....	29
4.5. Enriquecimento de formas promastigotas metacíclicas de <i>L. brasilienses</i> M2904-GFP.....	30
4.6. Manutenção dos macrófagos Raw. 264.7.....	30
4.7. Inibidores de HMEs.....	31
4.8. Avaliação da ação leishmanicida dos compostos.....	32
4.9. Teste com os compostos em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2904.....	32
4.10. Testes com os compostos em macrófagos Raw 264.7.....	33

4.11. Ensaios de Toxicidade em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2904.....	34
4.12. Teste de Infecção in vitro e Ensaio de Toxicidade em amastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2904-GFP.....	35
4.13. Análises Estatísticas	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Efeito dos compostos em promastigotas <i>L. braziliensis</i> M2904 e macrófagos Raw 264.7.....	37
5.1.1. Grupo 1.....	37
5.1.2. Grupo 2.....	45
5.2. Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> M294-GFP em infecção de macrófagos.....	51
5.3. Ensaio de Toxicidade em promastigotas e amastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2904 e M2904-GFP.....	57
6. CONCLUSÕES.....	61
7. PERSPECTIVAS.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
9. ANEXO 1.....	72
10. ANEXO 2	73
11. ANEXO 3.....	74
12. ANEXO 4.....	75
13. ANEXO 5.....	76
14. ANEXO 6.....	77

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Interação entre parasito-vetor-hospedeiro como determinantes das manifestações clínicas das Leishmanioses.	1
Figura 2. Status da endemicidade da Leishmaniose Tegumentar no mundo para o ano de 2012 segundo a Organização Mundial de Saúde.	6
Tabela 1. Principais espécies de Leishmania causadoras de Leishmaniose Tegumentar no Velho e no Novo Mundo..	7
Figura 3. Ciclo de vida de Leishmania no hospedeiro humano.	8
Figura 4. Resposta imune celular na infecção por Leishmania	9
Figura 5. Apresentações clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	10
Tabela 2. Drogas atualmente utilizadas no tratamento das Leishmanioses, seu modo de ação específico e efeitos adversos.....	12
Figura 6. Organização estrutural da cromatina e exemplos de modificações pós-traducionais na histona H3.....	14
Figura 7. Ação coordenada de enzimas modificadoras de histonas determinando a transcrição gênica ou a condensação da cromatina.....	15
Figura 8. Remodelamento da cromatina nos nucleossomos.....	16
Figura 9. Classes de HDACs humanas.....	18
Figura 9. Estrutura química dos principais iHDAC.....	22
Figura 10. Tipos de metilação nos resíduos de arginina.....	20
Figura 11. Estrutura química dos principais iHDAC.....	24
Figura 12. Efeitos provocados pelos iHDAC na célula.....	25
Figura 13. Grupos de trabalho do consórcio A-ParaDDIsE. (http://a-paradise.cebio.org/).....	27
Figura 14. Instituições participantes do consórcio A-ParaDDIsE. (http://a-paradise.cebio.org/).....	27
Tabela 3. Estrutura química dos compostos e sua eficácia em amastigotas intracelulares após 48 horas.....	54
Tabela 4. IC ₅₀ para promastigotas axênicos de <i>L. braziliensis</i> após 48 horas.....	58
Tabela 5. IC ₅₀ dos compostos para amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> M2904-GFP após 48 horas.....	59

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L. braziliensis</i> e em macrófagos Raw 264.7 após 24 horas.....	38
Gráfico 2. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L. braziliensis</i> e em macrófagos Raw 264.7 após 48 horas.....	39
Gráfico 3. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L. braziliensis</i> e em macrófagos Raw 264.7 após 72 horas.....	40
Gráfico 4 Teste t para verificar o efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L.braziliensis</i>	41
Gráfico 5 Teste t para verificar a diferença de efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L.braziliensis</i> e macrófagos Raw 264.7.....	42
Gráfico 6. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de <i>L.braziliensis</i> e em macrófagos Raw 264.7 após 24 horas.....	46
Gráfico 7. Toxicidade dos compostos para promastigotas axênicos de <i>L.braziliensis</i> após 24 horas.....	47
Gráfico 8. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos <i>L.braziliensis</i> e em macrófagos Raw 264.7 após 48 horas.....	48
Gráfico 9. Toxicidade dos compostos para promastigotas axênicos de <i>L.braziliensis</i> após 24 horas.....	49
Gráfico 10. Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos e DMSO em macrófagos após 48 horas.....	50
Gráfico 11. Efeito dos compostos do primeiro grupo em amastigotas intracelulares de <i>L.braziliensis</i> M2904-GFP após 48 horas.....	52
Gráfico 12. Toxicidade dos compostos para amastigotas intracelulares de <i>L.braziliensis</i> -M2904 após 48 horas.....	53
Gráfico 13. Efeito dos compostos do primeiro subgrupo em amastigotas intracelulares de <i>L.braziliensis</i> M2904-GFP após 48 horas.....	55
Gráfico 14. Efeito dos compostos do segundo subgrupo em amastigotas intracelulares de <i>L.braziliensis</i> M2904-GFP após 48 horas.....	56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AdoHcy, - S-adenosil-L-homocisteína
AdoMet - S-adenosil-L-metionina
A-ParaDDisE - Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics
DMSO - Dimetilsulfóxido
ELISA - Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FAD - Flavina adenina nucleotídeo
FDA - Food and Drug Administration
HATs - Histonas acetilases
HDACs - Histonas deacetilases
HDMs - Histonas demetilases
HMEs - Enzimasificadoras de histonas
HMTs - Histonas metiltransferases
iHDAC - Inibidores de HDAC
IS - Índice de seletividade
LSD1 - Amino-oxidases dependentes de FAD
PCR - Polymerase Chain Reaction
PRMT's – Proteínas argininas metiltransferases
PTMs - Modificações pós-traducionais
SAH - S-adenosil-L-homocisteína
SAHA - Ácido hidroxâmico suberoilânida
SAM - S-adenosil-L-metionina
SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação
TSA - Tricostatina A

RESUMO

SOUZA, Luciana Ângelo de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Avaliação da ação leishmanicida de inibidores de enzimas modificadoras de histonas em *Leishmania braziliensis* e na infecção de macrófagos.** Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Dr. Matheus Silva e Bastos, Gustavo Costa Bressan e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

As leishmanioses são uma das mais significantes doenças tropicais negligenciadas em todo o mundo, apresentando cerca de 1,3 milhão de novos casos anualmente e 20.000 a 30.000 mortes no mesmo período. *Leishmania braziliensis* é a principal espécie responsável pela Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo, sendo o Brasil o país com a maior incidência da doença frente a outros países da América do Sul. O arsenal terapêutico contra a Leishmaniose Tegumentar é ainda bastante restrito, e mesmo quando eficazes, as drogas de escolha causam efeitos colaterais graves. Dessa forma, este trabalho é parte de um esforço de várias instituições nacionais e internacionais, financiado pela Comunidade Europeia através do consórcio A-ParaDDisE (<http://a-paradise.cebio.org/>), cujo objetivo é a descoberta de novas drogas para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas, incluindo as Leishmanioses. Enzimas modificadoras de Histonas (HMEs), como as histonas deacetilases (HDACs), estão envolvidas em processos celulares cruciais, como a ativação e inibição da expressão gênica. Inibidores dessas enzimas têm sido investigados como drogas candidatas para aplicação na quimioterapia de uma variedade de doenças, incluindo o câncer e doenças parasitárias, uma vez que eles inibem a progressão do ciclo celular e/ou induzem a apoptose. Neste trabalho foram testados compostos inibidores de HMEs (iHMEs), enviados por pesquisadores parceiros do consórcio A-ParaDDisE, em formas promastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em infecção de células hospedeiras (macrófagos da linhagem Raw 264.7). Os resultados mostram diferentes efeitos para esses iHMEs em promastigotas e amastigotas, como observado para os compostos BSF38 e BSF39, que apresentaram efeito significativo em promastigotas, mas não em amastigotas. Já o composto BSF2 foi eficaz em matar tanto as formas promastigotas axênicas quanto as amastigotas intracelulares, atingindo cerca de 95% de ação leishmanicida, similar à droga controle Anfotericina B. Além disto, a toxicidade destes compostos para macrófagos foi mínima ou não existiu. Sendo assim, o BSF2 pode ser considerado um bom alvo para continuidade do desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas com ação sobre *L. braziliensis*.

ABSTRACT

SOUZA, Luciana Ângelo de, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february, 2016. **Evaluation of histone modifying enzymes inhibitors leishmanicidal activity in *Leishmania braziliensis* and in macrophages infection.** Advisor: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Dr. Matheus Silva e Bastos, Gustavo Costa Bressan and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Leishmaniasis is one of the major neglected tropical diseases worldwide, featuring about 1.3 million new cases annually and 20.000 - 30.000 deaths in the same period. *Leishmania braziliensis* is the main species responsible for cutaneous leishmaniasis in New World, and Brazil is the country with the highest incidence of the front disease to other countries in South America. The therapeutic arsenal against cutaneous leishmaniasis is still quite limited, and even when effective, the choice drugs cause serious side effects. Thus, this work is part of an effort of several national and international institutions, financed by the European Community by the consortium A-ParaDDisE (<http://a-paradise.cebio.org/>), whose objective is the discovery of new drugs for the treatment of neglected parasitic diseases, including leishmaniasis. Histone modifying enzymes (HMEs), such as histone deacetylases (HDACs), are involved in key cellular processes such as activation and inhibition of gene expression. Inhibitors of these enzymes have been studied as candidate drugs for use in the chemotherapy of a variety of diseases, including cancer and parasitic diseases since they inhibit cell cycle progression and / or induce apoptosis. In this study we tested HMEs compounds inhibitors (iHMEs), submitted by A-ParaDDisE research partners, in promastigotes and intracellular amastigotes of *L. braziliensis* infection in host cells (macrophages of Raw 264.7 lineage). The results show different effects of these iHMEs in promastigotes and amastigotes, as observed for compounds BSF38 and BSF39, which showed significant effect in promastigotes, but not in amastigotes. BSF2 compound was effective in killing both promastigotes axenic forms as intracellular amastigotes, reaching about 95% of leishmanicidal action, similar to drug control Amphotericin B. In addition, the toxicity of these compounds to macrophages was minimal or did not exist. Thus, the BSF2 can be considered a good target for continued development of new drugs acting against *L. braziliensis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE

As leishmanioses são um espectro de doenças tropicais negligenciadas que afetam pessoas em todo o mundo, apresentando cerca de 1,3 milhão de novos casos anualmente e 20.000 a 30.000 mortes anuais (RAJASEKARAN & CHEN, 2015; WHO, 2015).

As leishmanioses são causadas pela infecção do hospedeiro vertebrado com uma das mais de 20 diferentes espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, transmitidas através da picada de fêmeas de flebotomíneos durante o seu repasto sanguíneo (MOHAPATRA, 2014). As formas infectantes de *Leishmania*, uma vez no sítio de inoculação, são prontamente fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário, onde em seu interior, se diferenciam, proliferam e assim estabelecem a infecção (GOTO & LINDOSO, 2010). As leishmanioses também podem ser transmitidas através de agulhas compartilhadas, transfusão sanguínea e via transplacentária (KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015).

As apresentações clínicas das leishmanioses englobam duas formas principais, a tegumentar, que inclui principalmente as formas cutânea e mucocutânea, e a forma visceral. Essas manifestações clínicas dependem basicamente da interação entre a resposta imune do hospedeiro mediada por células, as espécies de *Leishmania* e o vetor flebotomíneo envolvido (MOAL & LOISEAU, 2015; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015). Na Figura 1 é possível observar a interação entre parasito-vetor-hospedeiro como determinantes das manifestações clínicas da leishmaniose.

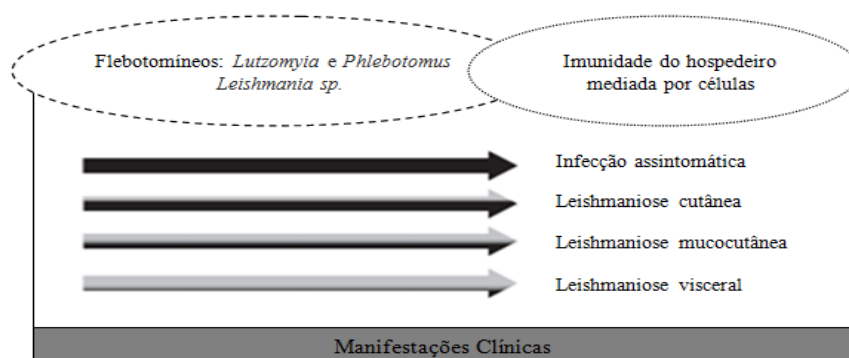


Figura 1. Interação entre parasito-vetor-hospedeiro como determinantes das manifestações clínicas das leishmanioses. As setas indicam o grau de efetividade da resposta imune do hospedeiro, que é menor à medida que as setas tornam-se cinzas. (Adaptado de PACE, 2014).

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum de leishmaniose, sendo caracterizada por lesões na pele, principalmente úlceras, na face e extremidades do corpo. Dados da Organização Mundial de Saúde estimam que aproximadamente 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas e também no Oriente Médio, Ásia Central e região do Mediterrâneo. Na forma mucocutânea da Leishmaniose, em que aproximadamente 90% dos casos estão concentrados na Bolívia, Brasil e Peru, podem ocorrer sangramentos e congestão nasal, além da lesão parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Em casos mais graves, pode haver a perfuração do septo nasal (HANDLER et al, 2015; WHO, 2015).

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, é a forma mais severa de leishmaniose, levando à morte aproximadamente 90% dos pacientes não tratados (STOCKDALE & NEWTON, 2013). Há duas formas da doença segundo as características de transmissão: a forma zoonótica, em que o cão é o reservatório principal, sendo causada por *Leishmania infantum* chagasi (sinônimo atualmente de *L. infantum*) no Novo Mundo e *L. infantum* no Velho Mundo. Esta forma de transmissão da doença ocorre na região do Mediterrâneo, China, Ásia Central e América do Sul; e a forma antroponótica, em que a transmissão ocorre independente de um reservatório animal, de pessoa-pessoa, e é causada por *Leishmania donovani* principalmente. Esta forma de transmissão da doença é prevalente na África Oriental e Bangladesh, como também na Índia e no Nepal, sendo a forma mais comum de transmissão da leishmaniose visceral (GRIENSVEN & DIRO, 2012; JAIN & JAIN, 2015).

Para o diagnóstico das leishmanioses diversas metodologias estão disponíveis, entretanto, a escolha do melhor método será baseada na conveniência e disponibilidade nos centros de diagnósticos. A microscopia é o padrão-ouro no diagnóstico da doença, em que há a visualização direta do parasito na amostra biológica. Moléculas e antígenos relacionados ao parasito podem ser úteis como marcadores definitivos de leishmaniose, podendo ser detectados, entre outros, por imunohistoquímica. Ensaios imunológicos como o Teste de Montenegro e ensaios sorológicos, como aqueles empregando a técnica de Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) podem ser utilizados como métodos alternativos ou complementares ao diagnóstico. Para o diagnóstico etiológico da doença, métodos moleculares são empregados, como a amplificação de material genético do parasito por Reação em Cadeia da Polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) (GOTO & LINDOSO, 2010; STOCKDALE & NEWTON, 2013; PACE, 2014).

O tratamento para os diversos tipos de Leishmaniose em humanos depende atualmente, e principalmente, da quimioterapia, visto não existir uma vacina efetiva e licenciada contra a

doença e um programa de controle para o vetor flebotomíneo. Os antimoniais pentavalentes são utilizados há muito como a primeira linha de tratamento para a doença. A Anfotericina B é utilizada no tratamento quando os antimoniais pentavalentes se mostram ineficazes, principalmente devido à resistência pelo parasito, como acontece na Índia (PACE, 2014; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015). Outros medicamentos também são utilizados, como a pentamidina, a paromomicina e o alopurinol, porém, a sua utilização juntamente com os antimoniais pentavalentes e a Anfotericina B, está limitada devido ao alto custo, toxicidade e resistência pelo parasito, o que tem levado à busca por outros alvos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da doença (SINGH, KUMAR & SINGH, 2012; GUPTA, OGHUMU & SATOSKAR, 2013; MOHAPATRA, 2014).

1.2 ENZIMAS MODIFICADORAS DE HISTONAS

O genoma eucariótico está organizado em estruturas denominadas nucleossomos, os quais são a unidade básica da cromatina. Nos nucleossomos, o material genético se enrola em torno de um cerne proteico que é formado por um octâmero de histonas, cujas caudas, uma vez que estão projetadas para fora do cerne proteico, podem sofrer modificações pós-traducionais (PTMs) que estão ligadas essencialmente a todos os processos celulares que envolvem o acesso ao DNA, incluindo transcrição, replicação e reparo (ZENTNER & HENIKOFF, 2013). Diversas PTMs podem ocorrer nas caudas das histonas, incluindo acetilação, metilação e fosforilação, entre várias outras, sendo as enzimas modificadoras de histonas (HMEs) responsáveis por catalisar essas PTMs. A acetilação dos resíduos de lisina e a metilação dos resíduos de lisina e arginina são as duas PTMs mais bem caracterizadas atualmente. As histonas acetilases (HATs) e as histonas deacetilases (HDACs) são as HMEs responsáveis pela acetilação e deacetilação, respectivamente. Quanto à metilação, as histonas metiltransferases (HMTs) e as histonas demetilases (HDMs) são as enzimas responsáveis por esse processo catalítico (TROPBERGER & SCHNEIDER, 2013).

As HDACs pertencem a uma família de enzimas deacetilases altamente conservada durante a evolução, desde procariotos até os seres humanos, e estão envolvidas em diferentes processos celulares, principalmente, naqueles que envolvem a regulação transcricional (GROZINGER & SCHREIBER, 2002). As HDACs, ao catalisarem a remoção de grupos acetil de resíduos de acetil-lisinas nas caudas das histonas, promovem um maior grau de compactação da cromatina, sendo por isso, conhecidas como co-repressoras da transcrição. As HATs, por sua vez, ao

catalisarem o processo inverso das HDACs, favorecem o processo transcricional (DHALLUIN et al 1999; CLOCCIATTI, FLOREAN & BRANCOLINI, 2011; REICHERT, CHOUKRALLAH & MATTHIAS, 2012).

As 18 HDACs humanas identificadas até o momento são classificadas em quatro diferentes classes (I, II, III e IV) segundo a sua dependência por um cofator, que pode ser zinco ou NAD^+ , e segundo a sua similaridade com proteínas de leveduras (HABERLAND, MONTGOMERY & OLSON, 2009). HDACs de patógenos parasitos humanos relevantes para a saúde pública mundial, incluindo *Plasmodium* e *Leishmania* também já foram identificadas. Em *Plasmodium falciparum*, cinco genes codificadores de PfHDACs foram descobertos até o momento e algumas proteínas por eles codificadas possuem similaridade com as HDACs humanas, como a PfHDAC1 que é similar à classe I. Em *Leishmania major*, quatro genes codificadores de HDACs foram identificados, porém, até o momento, nenhum foi caracterizado funcionalmente (INGRAM & HORN, 2002; ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012).

Em mamíferos, três famílias de HMTs são responsáveis pelo processo de metilação dos resíduos de lisina e arginina nas caudas das histonas: 1-família das proteínas arginina metiltransferases (PRMTs), 2- família das proteínas com o domínio SET e 3- família das proteínas sem o domínio SET, sendo as duas últimas famílias metiltransferases de lisina. A atividade catalítica das HMTs é dependente do S-adenosil metionina (AdoMet; SAM) como co-fator e podem ocorrer mono-, di- ou tri-metilação dos aminoácidos. Além disso, o processo de metilação pode estar relacionado tanto à ativação quanto à repressão transcricional (ALBERT & HELIN, 2010; DOWDEN et al, 2010). Em humanos, aproximadamente 50 genes codificam para as HMTs, e destes, cerca de 22 têm sido associados ao câncer e a outras doenças (ALBERT & HELIN, 2010).

Quanto às HDMs, estas foram reportadas recentemente, compreendendo as amino-oxidases dependentes de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (LSD1) e histonas demetilases contendo o domínio jumonji-C (JHDM) (ANAND & MARMORSTEIN, 2007). Em protozoários parasitos, essas HDMs estão presentes no genoma de *P. falciparum*, o que demonstra a conservação da atividade demetilase nesses organismos (AURRECOECHEA et al, 2009).

Uma vez que os processos de acetilação/deacetilação são cruciais no processo transcricional, bem como a metilação e outras PTMs, a inibição das enzimas envolvidas nesses processos regulatórios tem se tornado um ponto de partida para o desenvolvimento de novas drogas, como os inibidores de HDAC (iHDAC), inibidores das PRMTs e inibidores de LSD1 contra uma variedade de doenças, incluindo o câncer e doenças parasitárias. (ANDREOLI &

DEL RIO, 2015). A inibição das HDACs foi clinicamente validada para o tratamento do câncer com a aprovação pela FDA (Food and Drug Administration, USA), em 2006, através do uso do ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA) contra o Linfoma de células T cutâneo (ZHANG & ZHONG, 2014). Os iHDAC se mostraram também eficientes contra parasitos já na década de 90 com a apicidina (ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012). Nesse contexto, os iHDAC e de outras HMEs têm se tornando cada vez mais alvos de pesquisas como uma alternativa terapêutica para as doenças anteriormente citadas, principalmente as parasitárias negligenciadas, devido à resistência pelos parasitos aos tratamentos atuais e os diversos efeitos colaterais provocados por estes. Entre os efeitos dos iHDACs estão a parada do ciclo celular, indução da apoptose e formação de radicais livres (CANZONERI, CHEN & OYELERE, 2009; BOSE, DAI & GRANT, 2014; ZHANG & ZHONG, 2014).

Este trabalho faz parte de um Projeto Colaborativo Internacional financiado pela União Europeia, através do Consórcio denominado A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics), que visa o desenvolvimento de novas drogas contra doenças tropicais negligenciadas, como a Malária, Doença de Chagas e Leishmanioses, baseando-se em alvos epigenéticos. A Universidade Federal de Viçosa (UFV), como uma das colaboradoras nacionais deste Consórcio, está representada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Dra. Juliana Fietto e participa de três grupos de trabalho distintos no Consórcio. Um desses grupos inclui testes *in vitro* com iHMEs, incluindo iHDACs.

Neste trabalho serão apresentados resultados relativos a testes com compostos do tipo iHMEs e iHDACs diretamente em formas axênicas promastigotas de *L. braziliensis*, bem como suas toxicidades para as células hospedeiras modelo (macrófagos Raw 264.7). Serão apresentados também resultados dos testes frente à amastigotas intracelulares presentes na infecção dos macrófagos por *L. braziliensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose Tegumentar

A Leishmaniose Tegumentar Americana, terminologia que abrange as formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa de Leishmaniose, é causada por diferentes espécies de *Leishmania* no Velho Mundo e no Novo Mundo, sendo a forma cutânea a forma mais comum da doença e prevalente na América Latina (GOTO & LINDOSO, 2012).

A Leishmaniose Tegumentar Americana é endêmica em 82 países. Dados da Organização Mundial de Saúde mostram que a ocorrência anual de novos casos de Leishmaniose Cutânea em todo o mundo esteja em torno de 700.000 a 1,3 milhão de casos. Além disso, mais de 90% dos casos de Leishmaniose Cutânea ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e Ásia Central; desses 90%, dez países concentram a maioria dos casos estimados, cerca de 75%, sendo o Brasil um deles. O Brasil figura também na lista dos países em que há a maior ocorrência de casos de Leishmaniose Mucocutânea (ALVAR et al, 2012; GOTO & LINDOSO, 2012; WHO, 2015). Na Figura 2 é apresentado o status da endemidade da Leishmaniose Tegumentar em todo o mundo para o ano de 2012 segundo a Organização Mundial de Saúde.

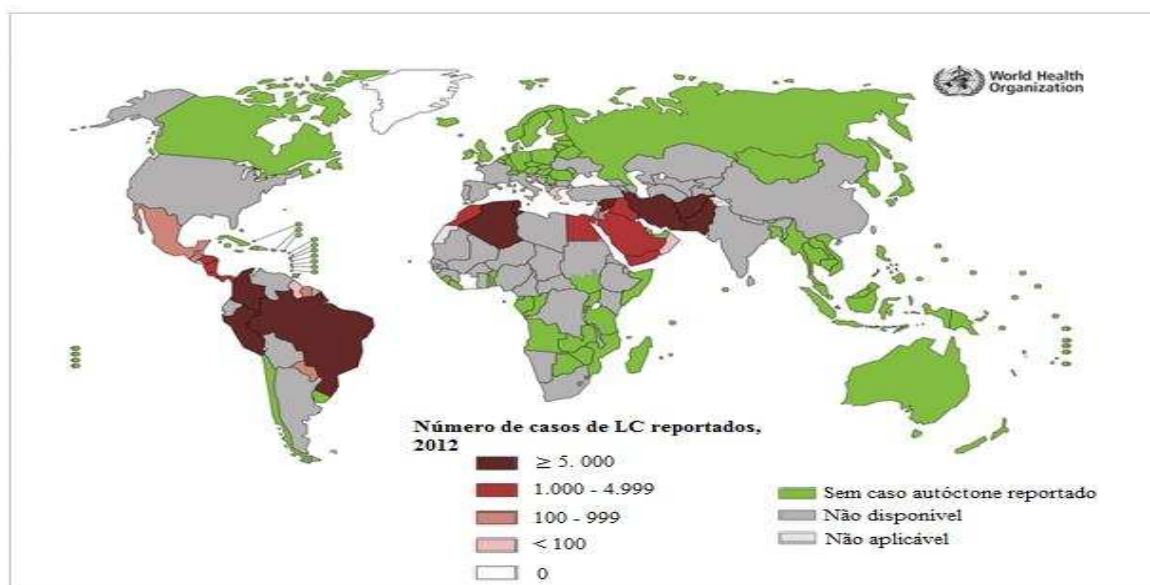


Figura 2. Status da endemidade da Leishmaniose Tegumentar no mundo para o ano 2012 segundo a Organização Mundial de Saúde (Adaptado de WHO, 2013).

No Brasil, dados do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação), instituição ligada ao Ministério da Saúde, mostram que no período de 1990 a 2012, mais de

20.000 casos/ano de Leishmaniose Tegumentar foram registrados em todos os Estados brasileiros, sendo a maioria dos casos pertencentes à Região Norte. Apenas em 2013 o número de casos/ano baixou para 18.000. Na Região Sudeste, o Estado de Minas Gerais é o Estado que apresenta o maior número de casos registrados de Leishmaniose Tegumentar no período 1990-2013; em 2013, foram registrados 781 casos. Em contrapartida, a Região Sul é a região que apresenta o menor número de casos da doença para o mesmo período citado anteriormente; o Estado do Rio Grande do Sul registrou apenas nove casos em 2013 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

As espécies de *Leishmania* que causam a Leishmaniose Tegumentar no Velho e no Novo Mundo pertencem aos subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* e mais de 10 espécies do parasito são conhecidas (LAINSON, 2010). Na Tabela 1 são apresentadas as principais espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Tegumentar no Velho e no Novo Mundo.

Tabela 1. Principais espécies de *Leishmania* causadoras de Leishmaniose Tegumentar no Velho e no Novo Mundo

Principal manifestação da doença	Espécies
Velho Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania major</i> , <i>Leishmania tropica</i> e <i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania aethiopica</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>Leishmania tropica</i> (raro) e <i>Leishmania major</i> (raro)
Novo Mundo, subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Leishmania mexicana</i> , <i>Leishmania pifanoi</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>Leishmania mexicana</i> e <i>Leishmania amazonensis</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>Leishmania amazonensis</i>
Novo Mundo, subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L.braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i> , <i>Leishmania peruviana</i>
Leishmaniose Cutânea Difusa	<i>L.braziliensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L.braziliensis</i> , <i>Leishmania guyanensis</i> , <i>Leishmania panamensis</i>

(Adaptado de KAYE & SCOT, 2011; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015)

No ciclo de vida natural de *Leishmania* no hospedeiro invertebrado (Figura 3), formas promastigotas procíclicas do parasito presentes no intestino do flebotomíneo, se diferenciam nas formas infectantes promastigotas metacíclicas e estas migram para uma porção anterior do trato digestivo do inseto. Durante o repasto sanguíneo deste, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania*, juntamente com componentes imunomodulatórios e componentes salivares, são regurgitadas no local da picada. As formas promastigotas metacíclicas são então fagocitadas e no ambiente intracelular se diferenciam em amastigotas, que se proliferam, rompem a célula hospedeira e liberam mais amastigotas, permitindo a infecção de novos fagócitos. Quando outro flebotomíneo durante o seu repasto sanguíneo ingerir fagócitos infectados com formas amastigotas, e estas, no interior do inseto se transformarem em promastigotas procíclicas, o ciclo de vida de *Leishmania* estará completo (KAYE & SCOTT, 2011; MOAL & LOISEAU, 2015).

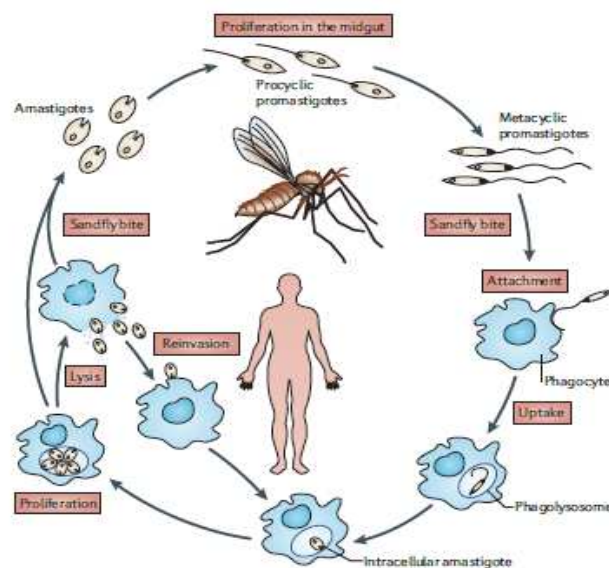


Figura 3. Ciclo de vida da *Leishmania* no hospedeiro humano. KAYE & SCOTT, 2011.

A ação coordenada dos vários componentes do sistema imune do hospedeiro é crucial para a eliminação de *Leishmania*. Porém, quando o parasito é capaz de evadir esse sistema, isso determina o estabelecimento da leishmaniose e sua possível evolução para uma doença mais grave. Fatores genéticos presentes na própria *Leishmania* também podem influenciar e/ou determinar o grau e a persistência da infecção. No que diz respeito ao sistema imune do hospedeiro, o principal mecanismo de defesa está associado à ativação e diferenciação das células T, como pode ser visto na Figura 4 (ALMEIDA & SANTOS, 2011; KAYE & SCOTT, 2011; CARVALHO et al., 2012; STRAZZULLA et al., 2013).

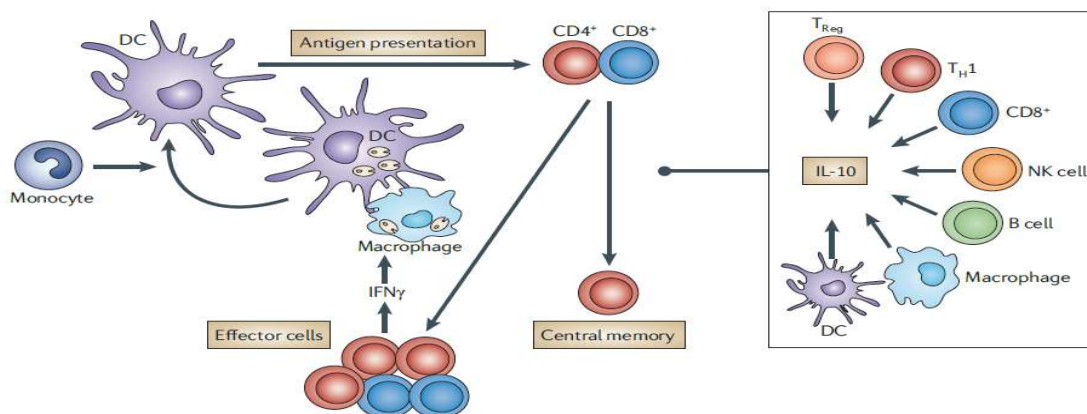


Figura 4. Resposta imune celular na infecção por Leishmania. Uma vez que houve a infecção do hospedeiro por *Leishmania*, os monócitos se infiltram no local da infecção e se diferenciam em células dendríticas (DCs). Algumas dessas células então se tornam infectadas, mas falham em se tornar ativadas, enquanto outras DCs não infectadas aumentam a expressão do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC de classe II) em sua superfície e se tornam células apresentadoras de antígenos (APCs), fundamentais no processo de ativação dos linfócitos T $CD4^+$, uma vez que podem captar parasitos mortos ou antígenos a eles relacionados. Os linfócitos T $CD4^+$, ao serem ativados pelas APCs, se diferenciam em linfócitos T helper (T_H1) e produzem interferon- γ ($IFN\gamma$), citocina que estimulará as células infectadas, tanto células dendríticas quanto macrófagos, a matar os parasitos e também a promover o desenvolvimento de mais T_H1 . Algumas células T $CD4^+$ falham em se tornar células T_H1 , e então adotam o fenótipo de células T de memória central. Linfócitos T $CD8^+$ também são capazes de reconhecer antígenos de *Leishmania*, se ativar e produzir $IFN\gamma$. O controle desse processo de resposta celular é altamente mediado pela liberação de interleucina 10 (IL-10), que pode ser produzida por diferentes tipos celulares (à direita), como linfócitos T reguladores (T_{Reg}), T_H1 , linfócitos T $CD8^+$, células natural killer, células B, e os próprios macrófagos e DCs. (KAYE & SCOTT, 2011).

Alguns aspectos da infecção causada por *Leishmania* em humanos pode ser reproduzida em modelos de infecção experimental com murinos, sendo os modelos mais utilizados o BALB/c e o C57BL/6. Quando estes camundongos são infectados com *L. (L.) major* (causadora de leishmaniose cutânea no Velho Mundo), camundongos BALB/c mostram-se suscetíveis à infecção, desenvolvendo principalmente uma resposta imune T_H2 , enquanto os C57BL/6 são capazes de resistir à infecção e desenvolvem principalmente uma resposta imune do tipo T_H1 , com envolvimento de $IFN-\gamma$ e óxido nítrico (Velasquez et al, 2016).

Experimentos com camundongos BALB/c infectados com *Leishmania amazonensis*, principal espécie causadora de leishmaniose cutânea difusa no Brasil, mostraram que a exposição da fosfatidilserina (um fosfolípido de membrana presente na porção interna da membrana, e que em alguns casos pode ser translocada para porção externa desta) pelas formas amastigotas do parasito, é um importante fator de virulência capaz de driblar o sistema imune e que pode estar relacionado à sobrevivência e persistência do parasito no interior dos macrófagos (França-Costa et al, 2012). Quanto à leishmaniose visceral, mais grave e fatal em humanos, ambos BALB/c e C57BL/6 são suscetíveis à infecção por *Leishmania donovani* (Sacks & Melby, 2001).

Uma vez estabelecida a infecção, as apresentações clínicas da Leishmaniose Tegumentar podem ocorrer de forma localizada (Leishmaniose Cutânea localizada) ou difusa (Leishmaniose Cutânea difusa) e também pode haver acometimento de mucosas, principalmente do nariz, boca e garganta, juntamente com o acometimento cutâneo (Leishmaniose Mucocutânea). A Leishmaniose Cutânea localizada é caracterizada por uma ou mais lesões que se desenvolvem semanas ou meses após a picada pelo flebotomíneo. Essas lesões podem se tornar ulceradas e até mesmo dolorosas caso haja infecção bacteriana e comprometimento de articulações. Entretanto, as úlceras tendem a se curar espontaneamente. A forma difusa da Leishmaniose Cutânea é caracterizada por várias pápulas ou nódulos da cor da pele. A ulceração pode ou não estar presente nessa forma e há grande propensão para o acometimento facial. A Leishmaniose Mucocutânea pode se manifestar meses ou anos após a cura da Leishmaniose cutânea, e há o acometimento das mucosas da boca e trato respiratório superior. Os sintomas iniciais dessa forma da doença incluem congestão nasal persistente acompanhada de hemorragias e rouquidão (LUPI et al, 2009; PACE, 2014; KEVRIC, CAPPEL & KEELING, 2015). Na Figura 5 é possível ver as apresentações clínicas da Leishmaniose Tegumentar anteriormente descritas.



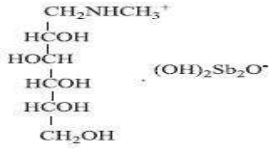
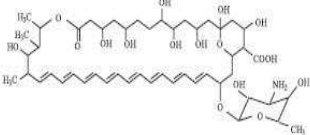
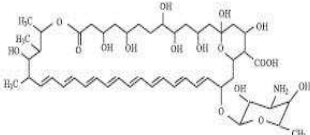
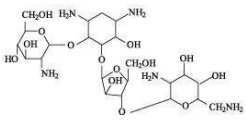
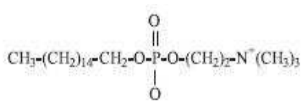
Figura 5. Apresentações clínicas da Leishmaniose Tegumentar. A – Leishmaniose Cutânea Localizada, com ferida única e de bordas elevadas. B – Leishmaniose Cutânea Difusa, onde se observa a presença de múltiplas lesões no membro inferior. C – Leishmaniose Mucocutânea, mostrando o acometimento nasal. GOTO & LINDOSO, 2012.

O diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar baseia-se em dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. O diagnóstico diferencial da doença também é crucial, uma vez que as lesões cutâneas apresentadas podem ser confundidas, por exemplo, com o impetigo e infecções por micobactérias cutâneas. Sendo assim, a visualização direta das formas amastigotas do parasito por microscopia em raspagens ou fluidos de feridas cutâneas é o padrão-ouro na confirmação de Leishmaniose Tegumentar. Testes imunológicos como o ELISA, embora específicos, devem ser realizados de forma criteriosa no diagnóstico, uma vez que os anticorpos produzidos durante o curso da leishmaniose, permanecem por vários anos na circulação mesmo após a eficácia do tratamento. Dessa forma, caso a doença se manifeste novamente no mesmo paciente, o método sorológico anteriormente utilizado no diagnóstico, será ineficiente. Além disso, pessoas residentes em áreas endêmicas poderão ter o teste positivo para anticorpos anti-Leishmania

mesmo que não tenham apresentado sintomas clínicos na infecção. Os testes imunológicos podem também apresentar reatividade cruzada com a doença de Chagas, o que reforça a necessidade dos critérios epidemiológicos, clínicos e laboratoriais para se fechar o diagnóstico. Testes de hipersensibilidade como o Teste de Montenegro também são utilizados para o diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar, sendo capazes de detectar a imunidade mediada por células através da injeção intradérmica de uma suspensão contendo formas promastigotas mortas de *Leishmania*. Testes moleculares como o PCR (Polymerase Chain Reaction), em que é possível a detecção do DNA do parasito, apresentam alta sensibilidade e especificidade, mas seu uso no diagnóstico da doença está limitado a centros de pesquisa e laboratórios de grande porte, devido ao alto custo (CHAPPUIS et al, 2007; STOCKDALE & NEWTON, 2013; PACE, 2014).

O arsenal terapêutico contra a Leishmaniose Tegumentar é muito restrito. Embora diferenças sejam observadas entre as várias espécies de *Leishmania*, entre susceptibilidade a drogas e também entre as manifestações da doença no Velho e no Novo Mundo, as mesmas drogas são utilizadas para o tratamento das várias formas de leishmaniose. Os Antimoniais Pentavalentes têm sido as drogas de primeira linha para o tratamento da doença por mais de 50 anos. Essas formulações, embora eficazes contra a doença, necessitam de injeções diárias, os efeitos colaterais provocados são muitos e o tempo de tratamento é prolongado. A Anfotericina B é a droga de escolha quando os antimoniais pentavalentes não são eficazes no tratamento das leishmanioses; é responsável por causar inúmeros efeitos colaterais graves, como lesão renal. Outras drogas alternativas, como o alopurinol e a paromomicina também são empregadas na terapêutica, mas, assim como aquelas citadas anteriormente, os efeitos adversos causados são muitos. Além disso, um fator preocupante na terapêutica das leishmanioses tem sido a resistência de *Leishmania* às medicações disponíveis. Diante disso, a soma dos efeitos colaterais adversos causados pelo tratamento atual utilizado, juntamente com a resistência apresentada pelo parasito a essa terapêutica, aliados à ausência de uma vacina eficaz licenciada contra a doença, faz com que a busca por novas drogas para o tratamento das leishmanioses seja urgente e crucial (GOTO & LINDOSO, 2010; ALMEIDA & SANTOS, 2011; PACE, 2014). Na Tabela 2 estão apresentadas as drogas atualmente utilizadas no tratamento das leishmanioses.

Tabela 2. Drogas atualmente utilizadas no tratamento das Leishmanioses, seu modo de ação específico e efeitos adversos.

Drogas atualmente utilizadas no tratamento da Leishmaniose e seu mecanismo de ação			
Medicamento	Mecanismo de ação	Efeitos adversos	Modo de administração
Antimoniato de N-metil glucamina 	Interferem na bioenergética das formas amastigotas de Leishmania. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP	Artralgia, mialgia, inapetência, náusea, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirois, dor abdominal, dor no local da aplicação, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia nervosismo,choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda (IRA)	Endovenosa ou intramuscular
Desoxicolato de anfotericina B  Anfotericina B	O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade in vitro na destruição de Leishmania intra e extracelular. Age se ligando ao ergosterol da membrana do parasito, levando à formação de poros e consequente lise celular.	Altamente tóxica para as células do endotélio vascular, causando flebite, cefaleia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos e hipotensão, alterações cardiovasculares, às vezes com parada cardíaca, alterações pulmonares, como desconforto respiratório, dispneia e cianose, complicações renais.	Intravenosa
Ambiose (formulação lipídica da anfotericina B)  Anfotericina B	A anfotericina B é incorporada dentro de lipossomas feitos com fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. Nessa formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina B. Entretanto, a meia-vida é mais curta, pois a droga é rapidamente sequestrada pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações.	Febre, cefaleia, náuseas, vômitos, tremores, calafrios e dor lombar.	Infusão venosa
Paromomicina 	Liga-se à subunidade 30S dos ribossomos, interferem com a iniciação da síntese de proteínas através da fixação do complexo ribossômico 30S-50S no códon de iniciação do mRNA, o que leva à acumulação de complexo de iniciação anormal.	Ototoxicidade e problemas na função hepática	Intramuscular
Miltefosina 	Principal modo de ação é incerto; apoptose postulada e inibição da citocromo C oxidase.	Teratogenicidade	Oral

2.2 Epigenética e HMEs

O material genético das células eucarióticas é organizado em um complexo de associação formado pelo DNA e proteínas histonas denominado cromatina, cuja unidade estrutural básica é o nucleossomo. O nucleossomo é formado por aproximadamente 147 pb de segmentos de DNA, o qual se liga a um octâmero das proteínas histonas H2A, H2B, H3 e H4; há duas cópias de cada histona constituindo o octâmero proteico (HA, 2013; SWYGERT & PETERSON, 2014).

Os nucleossomos são o primeiro grau de compactação da cromatina, que se torna ainda mais compacta à medida que os nucleossomos se organizam de forma regular e constituem fibras de 30 nm. O alto grau de compactação do material genético associado à forte ligação das histonas ao DNA constitui uma barreira a processos celulares cruciais, como transcrição, replicação e reparo do DNA. Sendo assim, há uma necessidade inerente de que a posição, estabilidade e grau de compactação dos nucleossomos sejam finamente regulados a fim de permitir a ocorrência dos processos celulares supracitados. Uma das formas de regulação nucleossomal são as modificações pós-traducionais que ocorrem na cauda N-terminal das histonas, o que permite regular o enovelamento da cromatina e influencia a ligação ou a atividade de proteínas e complexos proteicos regulatórios de ligação à cromatina, como das enzimas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP (RIVERA et al, 2014; ROTHBART & STRAHL, 2014; SWYGERT & PETERSON, 2014). Os domínios globulares das histonas, responsáveis pela interação histona-histona e histona-DNA também são alvos de modificações pós-traducionais (ROTHBART & STRAHL, 2014). A Figura 6 mostra o grau de organização da cromatina em células eucarióticas e um exemplo de PTMs na cauda N-terminal da histona H3.

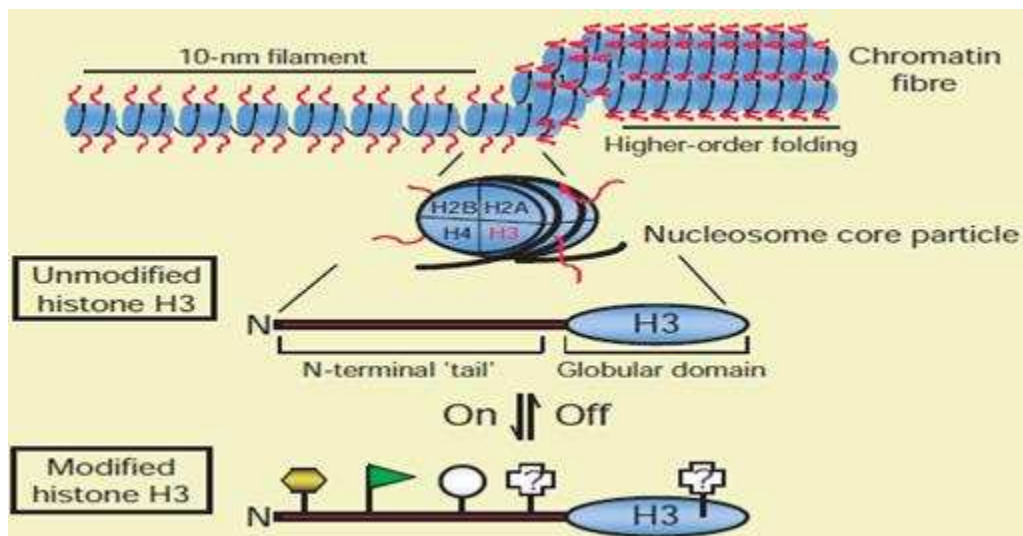


Figura 6 Organização estrutural da cromatina e exemplos de modificações pós-traducionais na histona H3. Na parte superior da figura, pode-se observar a organização dos nucleossomos formando a fibra de 30 nm. Logo abaixo, observa-se a disposição das histonas no centro dos nucleossomos com as caudas N-terminais protuberantes para fora do cerne proteico (vermelho). A histona H3 exemplifica a constituição das histonas, que são formadas por uma cauda N- terminal (vermelho) e por um domínio globular (azul), ambos passíveis de sofrer distintas PMTs (símbolo branco com interrogação central), como acetilação (bandeira verde), fosforilação (círculo cinza) e metilação (hexágono amarelo). Adaptado de Strahl & Allis, 2000.

As PTMs nas caudas das histonas constituem um tipo de modificação epigenética, ou seja, aquela que não afeta especificamente a sequência do DNA. Dessa forma, a epigenética é definida como o estudo de variações morfológicas reversíveis e hereditárias não causadas por modificações na sequência do DNA, mas que são essenciais nos processos de ativação e silenciamento gênico. O remodelamento da cromatina pode ser o principal mecanismo molecular da epigenética (MURR, 2010; HA, 2013).

O termo “código de histonas”, proposto por Strahl e Allis em 2000, está diretamente relacionado às modificações pós-traducionais nas histonas, e sugere que estas podem ocorrer de forma isolada ou em múltiplas combinações e em um mesmo período de tempo, determinando uma modificação estrutural na cromatina (STRAHL & ALLIS, 2000). Na Figura 7 é possível ver um modelo de como ocorre a ação coordenada de enzimas modificadoras de histonas e complexos proteicos determinando a transcrição ou o silenciamento gênico.

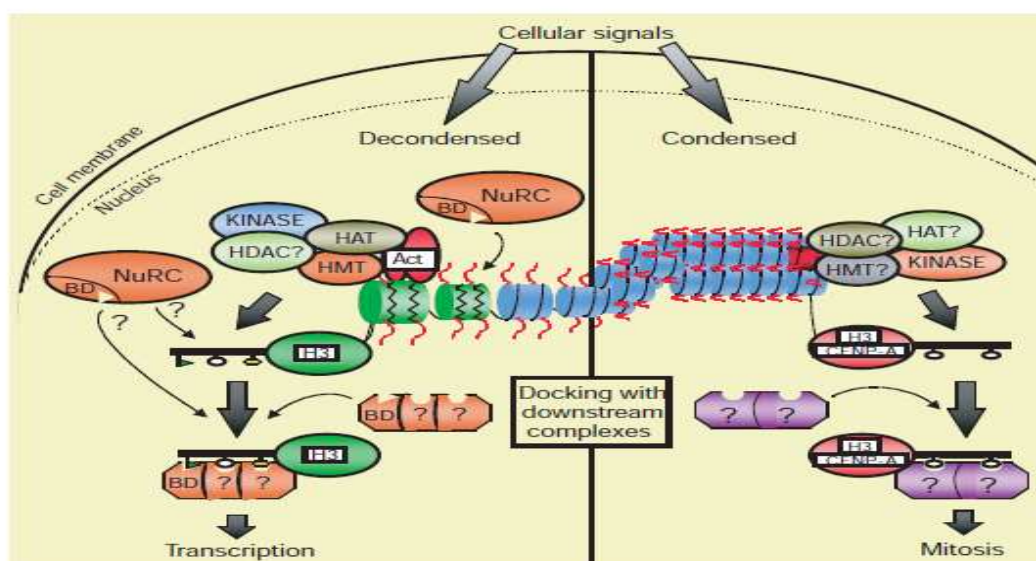


Figura 7. Ação coordenada de enzimas modificadoras de histonas determinando a transcrição gênica (esquerda) ou a condensação da cromatina (direita). À esquerda, um complexo formado por HMEs (enzimas modificadoras de histonas): HDAC (histona deacetilase); HAT (histona acetiltransferase com um coativador (Act) que interage com receptores nucleares; HMT (histona metiltransferase) e uma quinase Rsk envolvida na regulação transcricional (azul), age juntamente com complexos remodeladores de nucleossomos (NuRCs) contendo bromodomínio a fim de remodelar a cromatina (nucleossomos verdes). A ação das HMEs sobre a cauda N-terminal da histona H3, acetilação (bandeira verde), fosforilação (círculo cinza) e metilação (hexágono amarelo), faz com que outros complexos proteicos contendo bromodomínios sejam atraídos para o local das PTMs e reconheçam os resíduos de lisina acetilados (bandeira verde). Esse complexos proteicos podem ser fatores de transcrição, determinando assim, a transcrição gênica. Os NuRCs podem por si só modificar a cromatina ou se ligar às HMEs. À direita, o mesmo complexo proteico formado pelas HMEs supracitadas, pode agir sobre o domínio globular da histona H3 e determinar a condensação da cromatina (nucleossomo vermelho), crucial para a divisão celular (mitose). (Adaptado de Strahl & Allis, 2000; Swygert & Peterson, 2014).

Segundo Andreoli & Del Rio, 2014, as PTMs podem ser divididas em dois grupos principais segundo a sua funcionalidade química: o primeiro grupo inclui a metilação, acetilação, fosforilação e acilação, e nessas modificações ocorre a adição ou a remoção de substituintes orgânicos pequenos. No segundo grupo, a adição ou a remoção de substituintes orgânicos envolve grupos polifuncionais ou moléculas orgânicas maiores; fazem parte desse grupo ubiquitinação, sumoilação, biotinilação, glicosilação e ADP-ribosilação (ANDREOLI & DEL RIO, 2014).

A acetilação de lisinas é uma das PTMs mais bem caracterizadas até o momento. As histonas acetiltransferases (HATs), divididas em três principais famílias: GNAT, MYST, e CBP/p300, catalisam a transferência de um grupo acetil da coenzima-A para o grupamento ϵ -amino de resíduos de lisina, o que neutraliza a carga positiva do aminoácido. O desequilíbrio de cargas gerado por essa neutralização faz com que as histonas se liguem com menor afinidade ao DNA, visto que este tem carga negativa devido aos grupos fosfato, promovendo dessa forma,

o relaxamento da cromatina e consequentemente, a transcrição gênica (STERNER & BERGER, 2000; KOUZARIDES, 2007; ANDREOLI & DEL RIO, 2014). Entretanto, estudos mostram que somente a acetilação das histonas não seria suficiente para “afrouxar” a cromatina, sendo necessário o recrutamento de outras proteínas, como as enzimas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP, para auxiliar nesse processo e assim permitir o processo transcricional. As enzimas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP possuem os chamados bromodomínios que são capazes de reconhecer resíduos de lisina acetilada (Figura 7). A ligação dessas enzimas aos resíduos de acetil-lisina, promove o remodelamento da cromatina, permitindo então, a transcrição gênica. Os bromodomínios possuem um arcabouço hidrofóbico ao qual os resíduos de lisinas acetiladas se ligam, sendo essa interação ancorada pela ligação a moléculas de água e/ou à cadeia lateral de asparagina do próprio arcabouço. Além disso, por ocorrerem em tandem nas enzimas, os bromodomínios podem se ligar a múltiplos resíduos de acetil-lisina no mesmo nucleossomo ou a nucleossomos próximos. O processo inverso, de remoção do grupo acetil do grupamento ϵ -amino de resíduos de lisina é catalisado pelas HDACs (histonas deacetilases), como mostrado na Figura 8 (DHALLUIN, et al 1999; OWEN et al, 2000; SWYGERT & PETERSON, 2014).

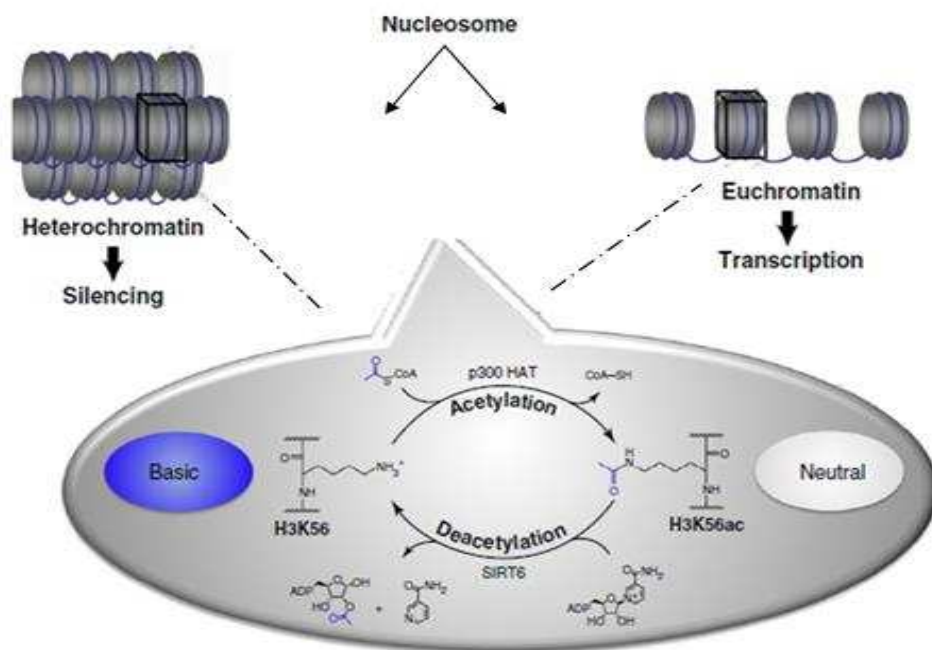


Figura 8. Remodelamento da cromatina nos nucleossomos. À direita, o processo de acetilação por uma HAT, promove o relaxamento da cromatina, deixando-a em sua forma transcricionalmente ativa: a eucromatina. À esquerda, o processo inverso de deacetilação por uma HDAC de classe III, deixando a cromatina compactada e em sua forma transcricionalmente inativa: heterocromatina. (ANDREOLI & DEL RIO, 2014).

As HDACs atuam no controle da expressão gênica por pelo menos dois mecanismos principais: primeiro, elas catalisam a remoção de grupos acetil em resíduos de lisina específicos presentes no cerne proteico de histonas ligadas ao DNA, logo após o recrutamento para este de fatores de transcrição sequência-específicos. Uma vez que houve a deacetilação, isso impacta na presença de cargas positivas nas histonas, aumentando a sua afinidade pelo DNA negativamente carregado. Consequentemente, isso altera a cromatina para uma conformação mais compactada, reduzindo o acesso da maquinaria de transcrição ao DNA, resultando na inibição transcricional. O segundo mecanismo pelo qual as HDACs agem na regulação da transcrição ocorre quando elas deacetilam fatores de transcrição específicos de ligação ao DNA, como p53, TFIIF, e GATA-1. O processo de acetilação/deacetilação dos fatores de transcrição pode, dessa forma, aumentar ou diminuir a afinidade destes pelo DNA, implicando na ativação ou silenciamento gênico, respectivamente. O mecanismo de ação das HDACs não está restrito às histonas. Elas podem agir sobre outros substratos proteicos, como proteínas citoplasmáticas, incluindo a tubulina e a HSP90. Estudos de Bali et al, em 2005, mostraram que a deacetilação da HSP90 pela HDAC 6 promove a sua função de chaperona (GU & ROEDER, 1997; IMHOF et al, 1997; BALI et al, 2005; GLOZAK, et al, 2005; MARIADASON, 2008).

As HDACs estão envolvidas em inúmeros processos biológicos além da repressão da transcrição gênica. Estudos envolvendo o knockout das HDACs em camundongos revelaram que elas apresentam funções altamente específicas no desenvolvimento e também em processos patológicos, evidenciando que essas enzimas participam de outros módulos de expressão gênica. A deleção total dos genes da HDAC 1, por exemplo, levou os camundongos à morte antes do dia 10.5 embrionário, além de provocar efeitos catastróficos na proliferação e crescimento em geral. Para a HDAC 3, a deleção dos genes levou a problemas na gastrulação, no dia 9.5 embrionário (HABERLAND, MONTGOMERY & OLSON, 2009).

Mutações e/ou a expressão alterada das HDACs têm sido relacionadas à patogênese do câncer e de outras doenças humanas, como o diabetes tipo II. Por exemplo, a super-expressão de HDAC 1 tem sido relacionada ao câncer gástrico, pancreático e pulmonar. A alta expressão de HDAC 2 e HDAC 3 tem sido observada em Linfoma de Hodgkin e câncer renal. Quanto ao envolvimento das HDACs no diabetes, estudos de Knutson et al, 2008, evidenciaram que o knockout da HDAC 3 levou à acumulação de lipídios e a depleção de glicogênio no fígado de camundongos, o que mostra que a enzima está envolvida na homeostase da glicose (BARNEDA-ZAHONERO & PARRA, 2012; YE, 2013; ZHANG & ZHONG, 2014).

As HDACs formam uma vasta família de proteínas com um domínio deacetilase altamente conservado. Em humanos, 18 HDACs foram identificadas até o momento, diferindo em estrutura, função enzimática, localização no interior celular e padrões de expressão (HABERLAND, MONTGOMERY & OLSON, 2009.). As HDACs humanas pertencem a quatro diferentes classes: classe I (compreende as HDACs 1-3 e 8); classe II (compreende as HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10) e é subdividida em IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9) e IIb (HDACs 6 e 10) devido à presença de domínios em tandem nas deacetilases 6 e 10; classe III, conhecida também como família das sirtuínas, uma vez que possui similaridade com os reguladores de informação silenciosa 2 (SIR2) de leveduras, compreendendo as sirtuínas 1-7; e classe IV, representada pela HDAC 11 (MARIADASON, 2008; ALONSO & SERRA, 2012; ENGEL et al, 2015). As classes I, II e IV de HDACs dependem do zinco para exercer a sua atividade catalítica, enquanto a classe III é dependente de NAD⁺. A classe I possui similaridade com a enzima Rpd3 (regulador transcricional) de leveduras e geralmente está localizada no núcleo. A classe II de HDACs é similar à Hda1 de leveduras e pode ser transportada para dentro ou para fora do núcleo em resposta a determinados sinais celulares. A classe III de deacetilases apresenta similaridade com SIR2 de leveduras, sendo encontrada no núcleo (RUIJTER et al, 2003; CLOCCHIATTI, FLOREAN & BRANCOLINI, 2011; LIAO, 2015). Na Figura 9 estão representadas as quatro classes de HDACs humanas.

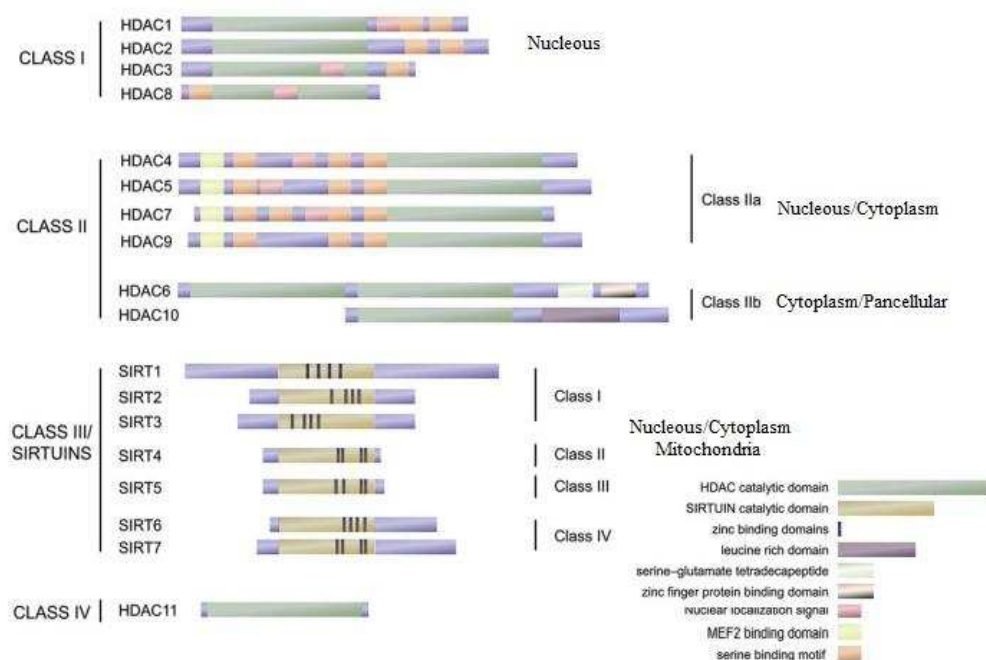


Figura 9. Classes de HDACs humanas. As HDACs humanas são classificadas em 4 diferentes classes segundo a sua similaridade com HDACs de leveduras. É possível ver domínios específicos pertencentes a cada classe de HDAC bem como a localização de cada uma na célula. Adaptado de Clocchiatti, Florean & Brancolini 2011; Barneda-Zahonero & Parra, 2012.

Estudos de HDACs em parasitos são ainda escassos, porém, essas enzimas já foram identificadas em *Plasmodium*, *Schistosoma*, *Trypanosoma* e *Leishmania*. Em *Plasmodium falciparum*, cinco genes codificadores de PfHDACs foram descobertos até o momento e algumas proteínas por eles codificadas possuem similaridade com as HDACs humanas, como a PfHDAC1 que é homóloga à classe I (ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012; ENGEL et al, 2015). Em *Schistosoma*, três HDACs já foram caracterizadas e são ortólogas à classe I de mamíferos. Em *Trypanosoma brucei*, quatro HDACs foram identificadas, clonadas e caracterizadas, possuindo similaridade com as classes I (DAC1 e DAC2) e II (DAC3 e DAC4) de mamíferos e leveduras. Em *L. major*, quatro genes codificadores de HDACs de classe I e II foram identificados, porém, até o momento, nenhum foi caracterizado funcionalmente. Para as HDACs de classe III, uma enzima foi descrita em *L. major* (LmSIR2RP1) e uma em *L. infantum* (LiSIR2RP1), ambas com potencial papel na sobrevivência do parasito e na resposta imunomodulatória (INGRAM & HORN, 2002; ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012).

A metilação também é uma das PTMs mais bem caracterizada atualmente, podendo ocorrer tanto nos resíduos de lisina quanto nos resíduos de arginina nas caudas das histonas. Diversas pesquisas têm sido feitas com as enzimas envolvidas nos processos de metilação e demetilação das histonas, como as PRMTs, que são metiltransferases de arginina e as LSD1, que são histonas demetilases de lisina e foram as primeiras demetilases a serem descobertas (KOUZARIDES, 2007).

As PRMTs fazem parte de uma família de proteínas altamente conservada em eucariotos (assim como as HDACs e LSD1) com um domínio catalítico conservado de metiltransferase. Essas enzimas catalisam a transferência de um grupo metil do co-fator S-adenosil-L-metionina (AdoMet, SAM) para um grupo guanidina de resíduos específicos de arginina, fazendo com que estes se tornem mono ou dimetilados e liberando S-adenosil-L-homocisteína (AdoHcy, SAH) como co-produto (ANEXO 1). A metilação dos resíduos de arginina é catalisada por duas classes de PRMTs: metiltransferases do tipo I e metiltransferases do tipo II. As enzimas do tipo I catalisam a formação de caudas de dimetil-argininas simétricas, enquanto aquelas do tipo II catalisam a formação de caudas de dimetil-argininas assimétricas, como pode ser visto na Figura 10 (YAN et al, 2014; SPANNHOFF, SIPPL & JUNG, 2015).

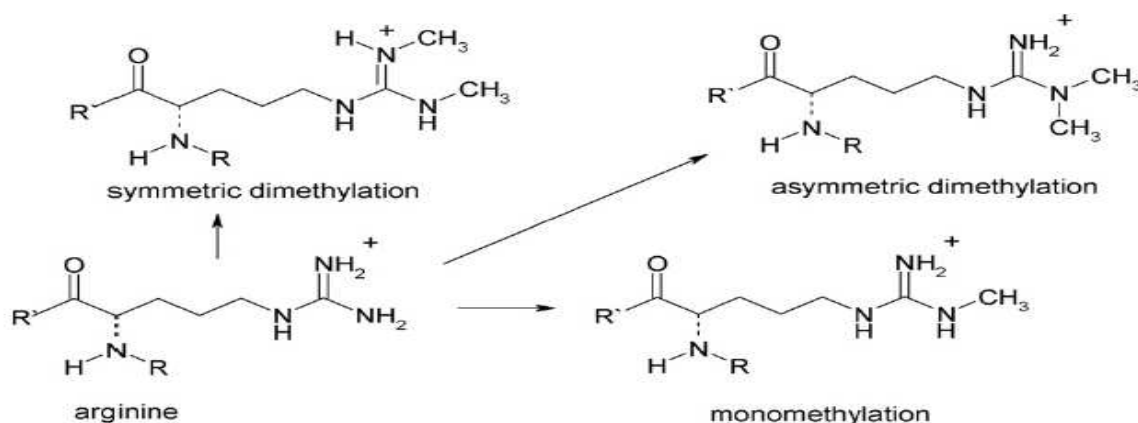


Figura 10. Tipos de metilação nos resíduos de arginina. Os resíduos de arginina nas caudas das histonas podem ser dimetilados de forma simétrica (sDMA) (esquerda) e assimétrica (aDMA) (direita), além de poderem ser monometilados (MMA) (abaixo). SPANNHOFF, SIPPL & JUNG, 2015.

Em mamíferos, nove PRMTs foram descritas, sendo as PRMTs de 1-4, 6 e 8 do tipo I e as PRMTs 5, 7 e 9 do tipo II. A metilação das histonas tem mostrado um importante papel nos padrões de regulação da expressão gênica, metabolismo de RNA e reparo do DNA. Em contraste com a acetilação, a metilação das histonas não altera a carga da cauda dessas proteínas, mas influencia na sua hidrofobicidade e sua afinidade com certas proteínas, como os fatores de transcrição (BEDFORD, 2007; SPANNHOFF, SIPPL & JUNG, 2015). O papel funcional das PRMTs em protozoários parasitos é ainda pouco explorado, porém, em *L. major* cinco genes codificam para PRMTs, e estudos mostram que a expressão do gene de *LmjPRMT7* é fortemente regulada nas duas formas evolutivas do parasito, sendo que a deleção desse gene leva a um aumento da infecciosidade do parasito tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e a superexpressão do mesmo significativamente reduz a progressão da lesão causada pelo parasito (FERREIRA et al, 2014).

A LSD1 é uma histona demetilase pertencente à família das amino oxidases dependentes de FAD. Essa enzima, que foi identificada em 2004, age sobre as lisinas 4 mono e dimetiladas na histona 3, funcionando como um correpresor transcricional. A LSD1 também é capaz de demetilar outras proteínas regulatórias epigenéticas, como a metiltransferase 1 de DNA (DNMT1). Três domínios podem ser identificados nessa enzima, e um deles, o domínio oxidase, além de conter os locais para ligação do substrato, abriga o FAD (CULHANE et al, 2010; MOULD et al, 2014; SCHMITT et al, 2013). Estudos têm mostrado a associação da LSD1 com complexos proteicos repressores, como o complexo regulatório de cromatina (CoREST), e uma vez que essa enzima é altamente conservada em eucariotos, a mutação nula dos genes de LSD1 mostrou causar letalidade embrionária em camundongos (MOULD et al, 2015; WANG et al, 2015). Estudos de LSD1 em protozoários parasitos são escassos.

2.3 Enzimas modificadoras de histonas como alvo para o desenvolvimento de drogas anti-parasitárias

Na última década, estudos das modificações epigenéticas nas histonas têm sido feitos principalmente no que diz respeito ao câncer, e em particular, envolvem as HDACs de classe I, II e IV. Recentemente, as proteínas metiltransferases emergiram também como novos importantes alvos na terapia do câncer, uma vez que a sua superexpressão ou repressão foram encontradas em leucemias, cânceres de mama, prostático e renal (ANDREOLI & DEL RIO, 2015). As LSD1 também estão envolvidas no desenvolvimento de doenças como o câncer e distúrbios neurodegenerativos, e têm sido fortemente relacionadas à expressão de genes dependente de andrógeno e estrógeno, o que as torna promissores alvos para a terapia do câncer dependente de hormônios. Além disso, as LSD1 têm sido relacionadas à leucemia mieloide aguda (SCHMITT et al, 2013; ANDREOLI & DEL RIO, 2015; MOULD et al, 2015).

Uma vez que as HMEs participam de diversos processos biológicos como a transcrição e a repressão gênica, estão envolvidas na patogênese de muitas doenças como citado anteriormente, e são altamente conservadas em eucariotos e essenciais para a sobrevivência de alguns parasitos, como demonstrado por Ingram & Horn, em 2002, para *T. brucei*, a inibição da atividade catalítica dessas enzimas tem sido alvo de crescentes estudos para o desenvolvimento de novas drogas contra doenças relevantes para a saúde pública mundial (INGRAM & HORN, 2002; WANG et al, 2015). A partir da abordagem de “drug repurposing”, iHDAC validados e inibidores de outras HMEs, como as PRMTs e LSD1, têm sido alvo de pesquisas que visam o desenvolvimento de novas drogas contra doenças parasitárias, especialmente, as negligenciadas (ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012; WANG et al, 2015). A comprovação da eficácia desses inibidores em parasitos tem sido reportada principalmente para os iHDACs, como será descrito a seguir.

Estudos in vitro com iHDACs para *P. falciparum* realizados por Darkin-Rattray et al., em 1996, mostraram que a apicidina (iHDAC), sob determinadas concentrações, é eficaz contra esse parasito por inibir a atividade de PfHDAC1 e causar a hiperacetilação das histonas, dessa forma, interferindo no crescimento do parasito. Em 2000, Andrews et al., demonstraram que a Tricostatina A (TSA) (iHDAC) é um potente inibidor do *P. falciparum* in vitro, uma vez que, assim como a apicidina, é capaz de inibir HDACs do parasito e causar a hiperacetilação das histonas, afetando o crescimento deste (ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012). Em 2015, Engel e colaboradores, grupo que faz parte do consórcio A-ParaDDisE, avaliaram o efeito de quatro iHDAC utilizados no tratamento do câncer (SAHA, Romidepsina, Belinostat e

Panobinostat) em *P. falciparum* e *T. brucei*, e mostraram que esses inibidores apresentam atividade anti-parasitária dose-dependente. Embora o índice de seletividade (SI) desses compostos tenha sido <1 , o que impede que eles sejam usados em testes clínicos, os achados são um ponto de partida para o desenvolvimento de novas drogas contra a Malária (ENGEL et al, 2015).

Em *T. brucei*, estudos de Ingram & Horn, em 2002, mostraram que dois dos quatro genes codificadores das proteínas similares às histonas deacetilases, DAC 1 e DAC 3, são essenciais para a sobrevivência do parasito. Em 2012, Kelly e colaboradores avaliaram o efeito de derivados do ácido hidroxâmico, que são um dos tipos de iHDACs, em formas sanguíneas de *T. brucei*, e mostraram que a maioria dos compostos testados foi eficaz em inibir o crescimento do parasito em concentrações muito baixas, na faixa de nanomolar. Os resultados colocam esses compostos como ponto de partida para o desenvolvimento de uma nova classe de compostos tripanocidas (INGRAM & HORN, 2002; KELLY et al, 2012).

Em 2013, Lancelot e colaboradores identificaram e caracterizaram cinco sirtuínas (classe III de HDACs) de *S. mansoni*, mostrando que são similares às sirtuínas Sirt1, Sirt2, Sirt5, Sirt6 e Sirt7 de mamíferos. Além disso, os estudos mostraram que as cinco sirtuínas são expressas em todo o ciclo de vida do parasito mesmo que com padrões diferentes de expressão. A ação de inibidores de sirtuínas também foi avaliada nesse estudo sobre as sirtuínas caracterizadas e citadas anteriormente, e os testes mostraram que esses inibidores foram capazes, entre outros efeitos, de induzir a apoptose e a morte dos esquistossômulos. Os resultados evidenciam as sirtuínas de *Schistosoma* como possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra Esquistossomose (LANCELOT et al, 2013). Também em 2013, Merek e colaboradores mostraram que a HDAC 8 de *S. mansoni* é uma enzima crucial para infectividade do parasito, sendo por isso, um alvo importante no desenvolvimento de novas drogas contra a Esquistossomose. A partir desse resultado, eles sintetizaram inibidores específicos para a enzima em questão e viram que um desses inibidores induziu a apoptose e mortalidade nos parasitos (MEREK et al, 2013).

Em *L. major*, quatro genes codificantes para HDACs dependentes de zinco de classes I e II foram identificados, porém, as enzimas ainda não foram caracterizadas funcionalmente. Todavia, estudos de Saxena e colaboradores, em 2007, mostraram que uma possível HDAC de classe I de *L. major*, codificada pelo gene LmjF.21.0680, sofre uma maior produção transitória durante a diferenciação de promastigotas em amastigotas (em testes sem a presença de célula hospedeira), o que provavelmente, levaria a uma alteração global ou específica da transcrição

(SAXENA et al, 2007; ANDREWS, HAQUE & JONES, 2012). Em 2008, Tavares e colaboradores mostraram que a LiSIR2RP1 (proteína 1 relacionada a SIR2) de *L. infantum* possui alta atividade de ADP-ribosiltransferase e de deacetilase dependente de NAD^+ , e que é capaz de deacetilar tubulina tanto em extratos de promastigotas quanto de amastigotas. Além disso, estudos prévios desse mesmo grupo revelaram que a alteração de um dos alelos da LiSIR2RP1 levou a uma diminuição da virulência em amastigotas. Ambos os estudos supracitados, tornam as HDACs possíveis alvos para o desenvolvimento de novas drogas contra as Leishmanioses (TAVARES et al, 2008).

2.4 Inibidores de HDAC

Os inibidores de HDAC conhecidos atualmente têm como alvo as HDACs humanas de classe I e II, que são dependentes de zinco. Esses inibidores podem ser divididos em quatro principais grupos segundo a sua estrutura química (Figura11): 1 – ácidos hidroxâmicos como o TSA e o SAHA, também conhecido como Vorinostat, que foi o primeiro iHDAC aprovado pelo FDA, em 2006, para o tratamento de pacientes com Linfoma de Células T cutâneo em estágio avançado. 2- ácidos graxos de cadeia curta, como o ácido butírico e o ácido valpróico. 3 – tetrapeptídeos cíclicos, como a romidepsina. 4 – benzamidas, como o entinostat. Todos os iHDAC supracitados, conhecidos como inibidores clássicos de HDAC, agem ao se ligar ao zinco presente no sítio catalítico da enzima, inibindo dessa forma, sua atividade deacetilase (NEBBIOSOA et al, 2012; TANG, YAN & ZHUANG, 2013; WAGNER et al, 2013).

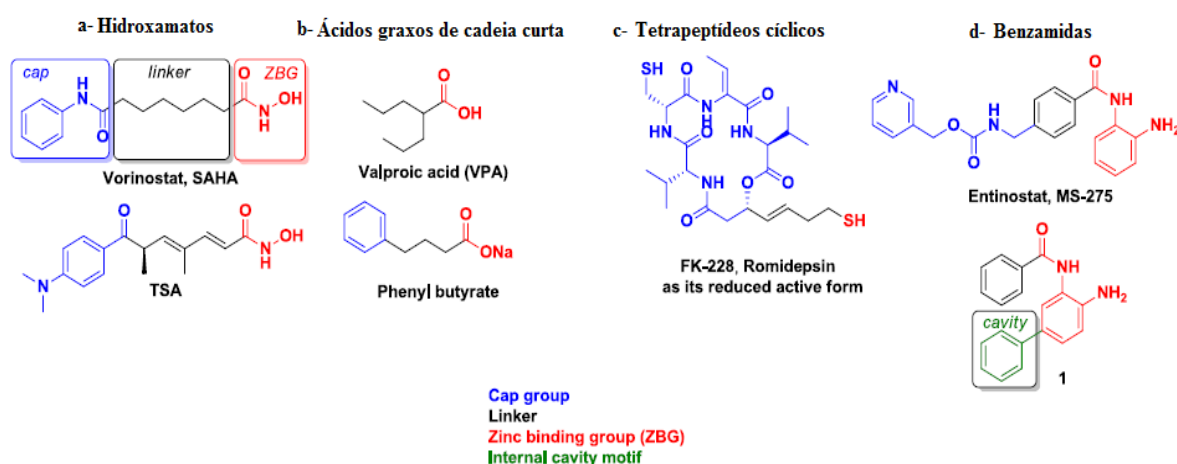


Figura11. Estrutura química dos principais inibidores de HDAC. a – Hidroxamatos, que são seletivos para as classes I e II de HDAC. b – Ácidos graxos de cadeia curta, classe I seletivos. c- Tetrapeptídeos cíclicos, classe I seletivos. d- Benzamidas, classe I seletivos. É possível observar nessas estruturas a superfície de ligação à enzima (cap group), o linker, o grupo de ligação ao zinco e também um grupo de cavidade interna, presente opcionalmente em iHDAC recentes. A maioria dos iHDAC é desenhada de forma a mimetizar os ligantes de acetil-lisina endógenos (Adaptado de Wagner et al, 2013).

Uma vez que inibem a atividade deacetilase das HDACs, os inibidores provocam efeitos letais nas células que incluem: geração de radicais livres, maior produção de inibidores da progressão do ciclo celular (exemplo: p21); indução de danos ao DNA; promoção da apoptose e interferência nos processos de reparo ao dano no DNA (BOSE, DAI & GRANT, 2014). Na Figura 12 é possível ver alguns dos efeitos que os iHDAC podem promover na célula.

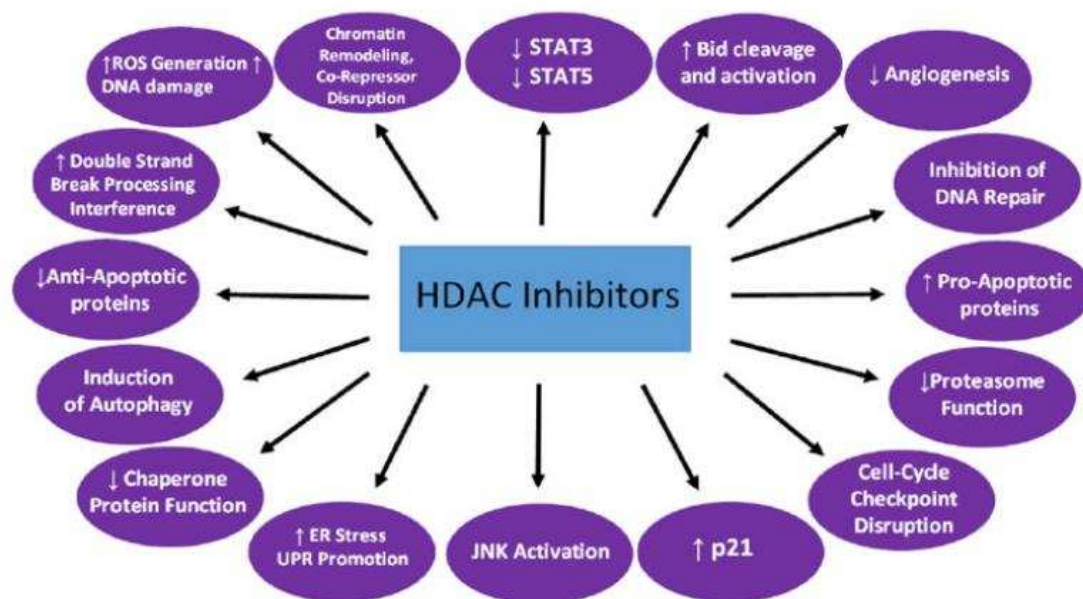


Figura12: Efeitos provocados pelos iHDAC na célula. Da direita para a esquerda é possível observar: inibição do reparo ao DNA; aumento de proteínas pró-apoptóticas; diminuição da função dos proteossomos, responsáveis por digerir proteínas marcadas para destruição; alteração dos pontos de checagem durante o ciclo celular; aumento do stress no retículo endoplasmático; indução da autofagia, geração de radicais livres. Bose, Dai & Grant, 2014.

Os iHDAC têm sido utilizados como uma alternativa terapêutica para várias doenças, incluindo câncer, principalmente as neoplasias hematológicas, doenças auto-imunes e inflamatórias, distúrbios neurológicos e metabólicos. A utilização dos iHDAC como novos agentes terapêuticos é uma potencial promessa de que estes compostos sejam efetivos em uma variedade de outras doenças, como as parasitárias negligenciadas, sugerindo que mais pesquisas são necessárias para o desenvolvimento de novas drogas com potencial clínico (MENDITI & KANG, 2007; TANG, YAN & ZHUANG, 2013).

2.5 O consórcio de pesquisa A-ParaDDisE: (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics)

O A-ParaDDisE (<http://a-paraddise.cebio.org/>) é um Projeto do tipo Consórcio Colaborativo Internacional financiado pela Comunidade Europeia que visa o desenvolvimento de novas drogas contra doenças relevantes para a saúde pública mundial, como Esquistossomose, Leishmanioses, Doença de Chagas e Malária, através da utilização de alvos epigenéticos, como as HMEs, em especial, aquelas envolvidas nos processos de acetilação/deacetilação, metilação/demetilação. A estratégia utilizada no A-ParaDDisE para o design de novas drogas é baseada em um projeto anterior, o SEtTReND FP7 (2010-2012), que objetivou desenvolver inibidores de HMEs de *Schistosoma* que pudessem ser compostos chave para novas drogas espécie seletivas. Nesse Projeto foi mostrado que inibidores de diferentes classes de HMEs são tóxicos para *Schistosoma* ao induzir a apoptose. Além disso, foi possível identificar novos inibidores da HDAC 8 de *S. mansoni* (smHDAC8) que foram mais seletivos para enzima do parasito do que para as HDACs humanas (Merek et al, 2013). Dessa forma, o SEtTReND FP7 permitiu não somente validar alvos epigenéticos como potenciais alternativas para o desenvolvimento de novas drogas, como também permitiu a criação de uma biblioteca de compostos que podem ser testados, com a mesma abordagem, contra outros parasitos humanos importantes.

O A-ParaDDisE representa o único estudo sistemático de inibidores epigenéticos espécie seletivos como potenciais drogas. Sendo assim, a sua relevância abrange, além de âmbitos científicos, âmbitos sociais de saúde pública.

As propostas do A-ParaDDisE incluem a identificação, caracterização molecular e funcional das HMEs de *Leishmania* sp. e *T. cruzi*, além do screening fenotípico desses parasitos pela utilização da biblioteca de compostos obtida no SEtTReND FP7. Análises transcriptômicas dos parasitos tratados com os iHMEs também serão realizadas, a fim de verificar a especificidade dos alvos e o mecanismo de ação. Os estudos em *S. mansoni* também serão continuados.

Para o desenvolvimento do Projeto, grupos de trabalho (WP) foram criados, sendo atribuído a cada um determinadas atividades, e as instituições participantes foram alocadas nesses grupos segundo as suas especialidades. Na Figura 13 é possível ver os grupos de trabalho e as instituições participantes.

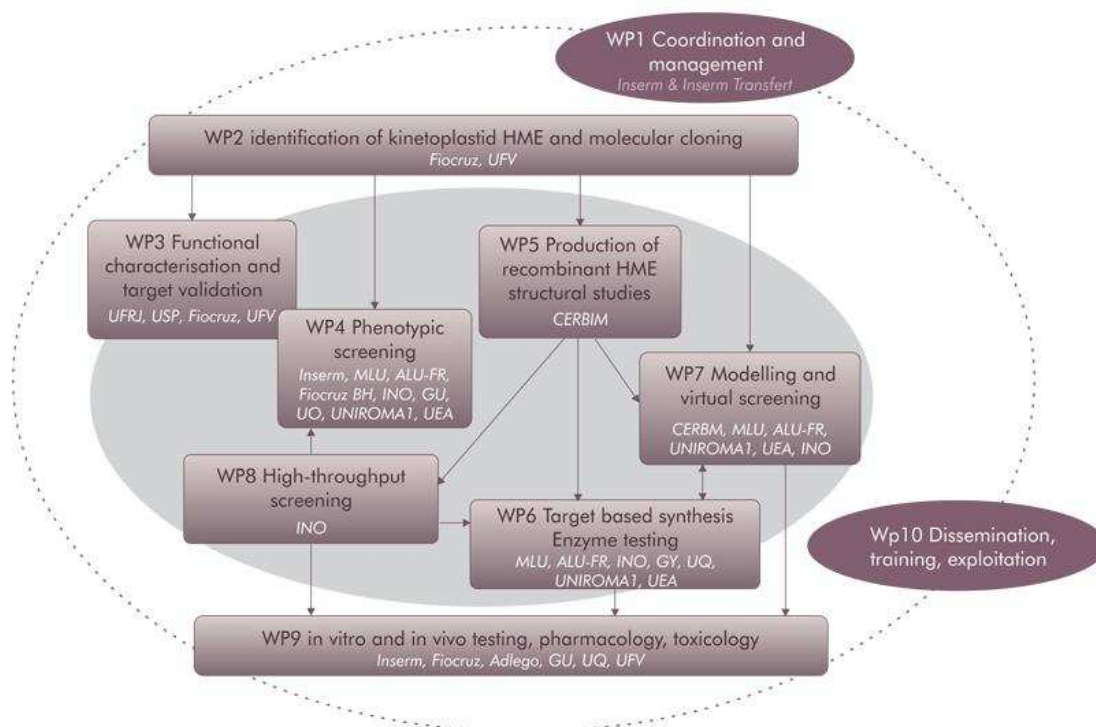


Figura 13. Grupos de trabalho do Consórcio A-ParaDDiSE. É possível ver os grupos de trabalho do Projeto e as Instituições participantes, bem como a interdependência entre eles. (<http://a-paradise.cebio.org/>)

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) participa de três dos dez WP do A-ParaDDiSE, sendo eles: WP2, WP3 e WP9, e está representada pelo grupo de pesquisa da Prof^a Dra. Juliana Fietto. As atribuições desses WP incluem: identificação, clonagem e validação das HDACs 1 e 3 de *L. braziliensis* e testes in vitro e in vivo com os inibidores de HMEs selecionados no SEtTREND, incluindo os iHDACs fornecidos pelo grupos parceiros. Na Figura 14 estão representadas as instituições participantes do A-ParaDDiSE.



Figura 14. Instituições participantes do A-ParaDDiSE e sua distribuição no mundo. (<http://a-paradise.cebio.org/>)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a ação de compostos inibidores de HMEs, incluindo inibidores de histonas deacetilases, como possíveis alvos terapêuticos para a Leishmaniose Tegumentar.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a ação de compostos inibidores de HMEs, incluindo de histonas deacetilases em formas axênicas promastigotas de *L. braziliensis*.
2. Avaliar a ação de compostos inibidores de HMEs, incluindo de histonas deacetilases em modelo de célula hospedeira (macrófagos Raw 264.7).
3. Avaliar a ação de compostos inibidores de HMEs, incluindo de histonas deacetilases em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em infecção de macrófagos Raw 264.7.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cepa M2904 de *L. braziliensis*

A cepa M2904 de *L. braziliensis* utilizada no Projeto foi gentilmente cedida pelo professor Dr. Luis Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.2 Cepa M2904-GFP de *L. braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* M2904 (cedidas pelo professor Dr. Luis Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto) foram transfectadas com a construção pLExsy-egfp-sat2 (Jena Bioscience) pelo Pesquisador e Pós-Doutorando da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Matheus Silva e Bastos, de acordo com manual do fabricante.

4.3 Linhagem de macrófagos Raw.264.7

A Linhagem de macrófagos Raw 264.7 utilizada no Projeto foi obtida comercialmente da Empresa ATCC (<http://www.atcc.org/>).

4.4 Manutenção dos parasitos *in vitro*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* cepa M2904 e M2904-GFP foram mantidas em garrafas de cultura de 10 mL, em meio Grace (*Grace's Insect medium*, Sigma) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil), L-glutamina (2 mM) (Serva Electrophoresis & Life Science Products, NY, USA) e penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), pH 6,5, filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25°C.

Para o congelamento de *L. braziliensis* M2904 e M2904-GFP, os parasitos crescidos em garrafa de cultura de 10 mL em meio Grace completo, foram contados em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de leishmania/mL por criotubo. Os 10 mL de cultura de *L. braziliensis* presentes na garrafa de cultivo foram então transferidos para um tubo de fundo cônico estéril de 15 mL e o volume total foi centrifugado

(HERAEUS Multifuge X 1R, Thermo Scientific) a 1.200 x g, a 4°C, durante 10 minutos. O precipitado obtido foi ressuspensionado em 5 mL de meio de congelamento, composto por Grace completo com 7,5% de DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon Comercial, Vila prudente, SP, Brasil) estéril, e posteriormente foram feitas alíquotas de 1 mL em criotubos. A seguir, os criotubos foram colocados: 1 hora em geladeira, 24 horas no freezer a -20°C, 24 horas no freezer -80°C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido (Thermo Scientific).

Para o descongelamento das amostras de *L. braziliensis* M2904 e M2904-GFP, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e deixados à temperatura ambiente, somente o tempo necessário para o descongelamento. Posteriormente, o volume de 1 mL de cultura de *L. braziliensis* presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 10 mL, onde foram adicionados vagarosamente 10 mL de meio Grace completo. As células foram então incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25°C. O tempo de recuperação das células foi em torno de 7 – 10 dias. Após esse tempo, foram feitos repiques de 4 em 4 dias com o número inicial de 1×10^5 células/mL para manutenção dos parasitos.

4.5 Enriquecimento de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP

O enriquecimento de formas promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP foi feito a partir do cultivo das formas promastigotas procíclicas do parasito, em garrafas de 10 mL de cultura com meio Grace completo, por 7 dias após o repique, iniciado com 1×10^5 células/mL (fase estacionária de crescimento).

4.6 Manutenção dos macrófagos Raw.264.7

A linhagem de macrófagos Raw 264.7 foi mantida em garrafas de cultura de 50 mL, em meio RPMI (RPMI-1640, Sigma-Aldrich) completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (LGC Biotecnologia), L-glutamina (2 mM) (Serva), penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation) e Hepes (1M) (Fisher Scientific) pH 7,2, filtrado em membrana de 0,22 µm, e incubada em estufa de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37°C.

Para o congelamento dos macrófagos Raw 264.7, primeiramente foram retirados e desprezados 8 mL (dos 10 mL) de RPMI completo da garrafa de cultivo de 50 mL contendo os macrófagos aderidos à superfície plástica da garrafa. A seguir, com o auxílio de um espalhador

de células (Kasvi 25 cm), os macrófagos foram desaderidos da garrafa e contados em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de macrófagos/mL por criotubo. Os 2 mL de cultura de macrófagos presentes na garrafa de cultivo de 50 mL foram então transferidos para um tubo de fundo cônico estéril de 15 mL, onde foram adicionados 5 mL de meio de congelamento, composto por RPMI completo com 7,5% DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon) estéril. Posteriormente, foram feitas alíquotas de 1 mL em criotubos que foram colocados: 1 hora em geladeira, 24 horas no freezer a -20°C, 24 horas no freezer -80°C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido (Thermo Scientific).

Para o descongelamento das amostras de macrófagos Raw 264.7, os criotubos foram retirados do nitrogênio líquido e colocados em estufa de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37°C até que a amostra estivesse descongelada. Posteriormente, o 1 mL de cultura de macrófagos presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 50 mL, onde foram adicionados vagarosamente 10 mL de meio RPMI completo. As células foram então incubadas em estufa de CO₂ (Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific) a 37°C. O tempo de recuperação dos macrófagos foi em torno de 10-12 dias. Após esse tempo, foram feitos repiques de 3 em 3 dias com a contagem de 50.000 macrófagos/mL.

4.7 Inibidores de HMEs

Os compostos inibidores de HMEs utilizados no Projeto foram gentilmente enviados por dois pesquisadores integrantes do A-ParaDDisE: Wolfgang Sippl, da Martin Luther Universität Halle- Wittenberg (MLU), na Alemanha; e Manfred Jung, da Albert Ludwigs Universität Freiburg (ALU-FR), também na Alemanha.

Soluções-estoque a 10 mM foram preparadas em 100% DMSO (Dimetilsulfóxido; Neon) para cada composto e armazenadas a -20°C. Para utilização nos experimentos *in vitro*, foram preparadas para cada composto soluções de uso a 0,5 mM, a partir das soluções-estoque a 10 mM, em água Milli-Q estéril (GEHAKA), sendo o armazenamento feito a -20°C.

As soluções de uso dos compostos foram preparadas a 0,5 mM para que nos experimentos, a concentração final de cada Inibidor, fosse 10 µM.

Compostos recebidos - Wolfgang Sippl: BSF2, BSF6, BSF13, BSF16, BSF20, BSF28, BSF31, BSF38, BSF39, BSF2E, BSF2Em, BSF2H, BSHH, BSF2P, BSG3, TH78, TH83 e TH85.

Compostos recebidos - Manfred Jung: Vorinostat, SW55, JS28, JS08, Bromosporine, SGC-CBP30, JQ1, PU139, PU141, C646, Curcumin, Tranylcypromin, Namolin, CBB1007, Mz25, Mz43, D_{ox}, D_{min}, AH174, SGC 0946, GSK343, PFI-2 e Lie 1417.

4.8 Avaliação da ação leishmanicida dos compostos

A avaliação da ação dos compostos foi feita a partir do Método da Resazurina. A resazurina, um sal de sódio, é utilizada em ensaios de cultivo celular como um indicador colorimétrico de proliferação e viabilidade. Em sua forma oxidada, a resazurina é um corante azul. Na presença de atividade metabólica celular, ela é reduzida a resofurin, de coloração rosa, que pode ser medida por leitura colorimétrica (Diniz, 2013).

A resazurina utilizada no Projeto (Sigma-Aldrich, Mw: 251.17 g/mol) foi preparada a 1mM em PBS. Nos experimentos in vitro, a leitura da reação foi feita em 570 nm e 600 nm em leitor de microplacas (Spectramax M5).

4.9 Testes com os compostos em promastigotas de *L. braziliensis* M2904

Os testes para avaliar a ação dos compostos em promastigotas foram feitos em placas de 96 poços. Inicialmente, uma cultura de 10 mL de *L. braziliensis* em meio Grace completo, com 4 dias de cultivo, foi transferida para uma garrafa de cultivo de 400 mL, onde foram adicionados 300 mL de Grace completo, a fim de se expandir a cultura, e a garrafa foi incubada em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25°C. Após 4 dias, as células foram transferidas para tubos de fundo cônico de 50 mL estéreis e centrifugadas (HERAEUS Multifuge X 1R, Thermo Scientific) a 1.200 x g, a 4°C, durante 10 minutos. O precipitado obtido foi suspenso em 5 mL/por tubo cônico em Grace completo. Os 5 mL de cada tubo de fundo cônico foram então transferidos para um único tubo de fundo cônico e a partir deste, as células foram contadas em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de Leishmania/mL. Para cada teste, foram montadas 3 placas iguais de 96 poços, a fim de se avaliar a ação dos compostos nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Após a contagem, foram plaqueadas nas 3 placas 4×10^6 Leishmania em cada poço, em um volume final por poço, de 200 µL (Leishmania + meio Grace completo). Posteriormente, foram adicionados nas placas 4 µL dos compostos (das soluções de uso a 0,5 mM), 4 µL de DMSO (5%) (controle negativo) e 2,5 µL de Anfotericina B (controle positivo), todos em

quadruplicata. Um controle para avaliar o crescimento de *Leishmania* na ausência de drogas também foi feito, constando apenas de *Leishmania* e meio Grace completo (o controle foi feito em quadruplicata e com a quantidade de 4×10^6 *Leishmania* em cada poço)

Posteriormente à adição dos compostos e dos controles, as placas foram incubadas em estufa B.O.D a 25°C. Após 23, 47 e 71 horas, uma placa foi retirada da estufa e em cada poço foram adicionados 20 µL de resazurina, sendo a placa incubada novamente em estufa B.O.D por mais 1 hora. Completadas as 24, 48 e 72 horas, as placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax M5) em 570 nm e 600 nm, em intervalos de 1 hora, por 3 horas.

A porcentagem de redução da resazurina, em cada tempo avaliado, foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\text{Redução da resazurina} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)],$$

Nessa fórmula, A_{570} significa a absorbância da resazurina a 570 nm, A_{600} equivale à absorbância da resazurina a 600 nm, e R_0 é um fator de correção (branco), representado pela média das absorbâncias do controle negativo contendo somente meio Grace completo com resazurina (em quadruplicata). A porcentagem de células viáveis foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = [A_{570} - (A_{600} \times R_0)_{\text{Tratado}}] \times 100 / \text{Média}[A_{570} - (A_{600} \times R_0)]_{\text{Não tratado}}$$

O protocolo acima descrito foi padronizado pelo Pesquisador e Pós-Doutorando da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Matheus Silva e Bastos.

4.10 Testes com os compostos em macrófagos Raw. 264.7

Os testes para avaliar a ação dos compostos em macrófagos Raw 264.7 foram feitos em placas de 96 poços. Inicialmente, os macrófagos cultivados em garrafas de 50 mL em meio RPMI completo, com 3-4 dias de cultivo, foram desaderidos da garrafa com o auxílio de um espalhador de células (Kasvi 25 cm) e contados em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de macrófagos/mL. Para cada teste, foram montadas 3 placas iguais de 96 poços, a fim de se avaliar a ação dos compostos nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Após a contagem, na placa de 24 horas foram plaqueados 1×10^5 macrófagos por poço; na placa de 48 horas, foram plaqueados 5×10^4 macrófagos por poço e na placa de 72 horas, foram

plaqueados $2,5 \times 10^4$ macrófagos por poço, todos em um volume final de 200 μL /poço (macrófagos + meio RPMI completo). Posteriormente, foram adicionados nas 3 placas 4 μL dos compostos (das soluções de uso a 0,5 mM), 4 μL de DMSO (5%) (controle negativo) e 2,5 μL de Anfotericina B (250 $\mu\text{g/mL}$) (controle positivo); todos em quadruplicata. Um controle para avaliar o crescimento dos macrófagos na ausência de drogas também foi feito, constando apenas de macrófagos e meio RPMI completo (o controle foi feito em quadruplicata e com a quantidade de macrófagos definida para cada placa: 1×10^5 para 24 horas, 5×10^4 para 48 horas e $2,5 \times 10^4$ para 72 horas) .

Seguindo-se à adição dos compostos e dos controles, as placas foram incubadas em estufa de CO_2 a 37°C . Após 23, 47 e 71 horas, cada placa foi retirada da estufa e em cada poço foram adicionados 20 μL de resazurina, sendo a placa incubada novamente em estufa de CO_2 por mais 1 hora. Completadas as 24, 48 e 72 horas, as placas foram lidas em leitor de microplacas (Spectramax M5) em 570 nm e 600 nm, em intervalos de 1 hora, por 3 horas.

A porcentagem de redução da resazurina, em cada tempo avaliado, foi calculada segundo a fórmula descrita no item 4.9.

O protocolo acima descrito foi padronizado pelo Pesquisador e Pós-Doutorando da Universidade Federal de Viçosa, Dr. Matheus Silva e Bastos.

4.11 Ensaios de toxicidade em promastigotas de *L. braziliensis* M2904

Os ensaios para se determinar o IC_{50} dos compostos (a concentração de cada composto capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50%) em promastigotas de *L. braziliensis* M2904 foram feitos em placas de 96 poços e seguiram o mesmo protocolo descrito no item 4.9 Os compostos foram diluídos em água Milli-Q (GEHAKA) estéril, a partir das soluções-estoque a 10 mM e testados nas seguintes concentrações: 80 μM , 40 μM , 30 μM , 15 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1 μM , 0,5 μM , 0,05 μM e 0,005 μM .

Posteriormente à adição dos compostos e dos controles (os mesmos descritos no item 4.9), a placa foi incubada em estufa B.O.D a 25°C . Após 47 horas, a placa foi retirada da estufa e em cada poço foram adicionados 20 μL de resazurina, sendo a placa incubada novamente em estufa B.O.D por mais 1 hora. Completadas as 48 horas, a placa foi lida em leitor de microplacas (Spectramax M5) em 570 nm e 600 nm, em intervalos de 1 hora, por 3 horas.

A porcentagem de redução da resazurina foi calculada segundo a fórmula apresentada no item 4.9. Os cálculos para determinação do IC_{50} foram feitos no GraphPad Prisma Versão 6.1.

4.12 Teste de infecção in vitro e ensaio de toxicidade em amastigotas de *L.braziliensis* M2904-GFP

Os testes de infecção in vitro foram realizados em placas de 96 poços. Inicialmente, foram montadas placas com os macrófagos Raw 264.7, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 4.10. A quantidade de macrófagos por poço nas placas foi de 1×10^5 células. Após a montagem das placas, estas foram incubadas em estufa de CO₂ por 24 horas.

Posteriormente, foi feita a infecção dos macrófagos com formas promastigotas enriquecidas em formas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP, na proporção de 15 *Leishmania* para um macrófago. As formas promastigotas enriquecidas em formas metacíclicas de *L. braziliensis* M2904-GFP, obtidas segundo descrito no item 4.5, foram transferidas para tubos de fundo cônico de 15 mL estéreis e centrifugadas segundo protocolo descrito nos itens anteriores. O precipitado obtido foi suspenso em 5 mL/por tubo de fundo cônico com RPMI completo. Os 5 mL de cada tubo de fundo cônico foram então transferidos para um único tubo de fundo cônico e a partir deste, as células foram contadas em Câmara de Neubauer (diluição de 50X em formalina 4%) a fim de se determinar o número de *Leishmania*/mL.

Após a contagem, $1,5 \times 10^6$ *Leishmania* foram adicionadas à placa com os macrófagos previamente incubada por 24 horas e esta foi incubada novamente em estufa de CO₂ por mais 24 horas. Após esse tempo, a placa foi lavada 3X com RPMI base (sem adição de antibióticos e L-glutamina), pH 7,2, foram adicionados 200 µL de RPMI completo por poço na placa e esta foi incubada por 24 horas em estufa de CO₂. Passadas as 24 horas, o meio RPMI completo metabolizado foi substituído por meio novo e foram adicionados na placa 4 µL dos compostos (das soluções de uso a 0,5 mM), 4 µL de DMSO (5%) (controle negativo) e 2,5 µL de Anfotericina B (250 µg/mL) (controle positivo), todos em quadruplicata. Dois controles para avaliar o crescimento dos macrófagos não infectados também foram feitos. Em um deles foram adicionados 2,5 µL de Anfotericina B (250 µg/mL) e no outro não foi adicionado nada. Posteriormente à adição dos compostos e dos controles, a placa foi incubada em estufa de CO₂ por 48 horas.

Seguindo-se às 48 horas, a placa foi retirada da estufa e lavada 3X com RPMI base (sem adição de antibióticos e L-glutamina), pH 7,2. Posteriormente, foram adicionados 50 µL por poço da solução de lise (RPMI base + SDS 0,05%) e a placa foi deixada por 1 hora em temperatura ambiente. Após esse tempo, foram adicionados 150 µL de meio Grace completo

por poço na placa e esta foi vedada com Parafilm e incubada em estufa B.O.D a 25 °C por pelo menos 48 horas.

Após esse tempo, as placas foram lidas por fluorescência em leitora de microplacas (Spectramax M5) a 490 nm (excitação) e 520 nm (emissão). Os cálculos para se determinar o efeito dos compostos sobre as formas amastigotas foram feitos segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = [(Emissão \text{ fluorescência})_{Tratado}] \times 100 / Média [(Emissão \text{ fluorescência})_{Não tratado}]$$

Para se determinar o IC₅₀ na infecção in vitro, inicialmente foram estabelecidas as concentrações dos compostos a serem testadas, sendo elas: 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM e 0,1 µM e 0,01 µM. Posteriormente, foram feitas as diluições dos compostos nas concentrações anteriormente citadas, em água Milli-Q estéril (GEHAKA), a partir das soluções-estoque a 10 mM.

Os procedimentos seguintes foram os mesmos supracitados para o teste de infecção, item 4.12, desde a montagem da placa com os macrófagos e sua incubação por 24 horas.

4.13 Análises Estatísticas

As análises estatísticas, Teste t de Student, Análise de Variância (ANOVA) e determinação do IC₅₀ foram feitas no GraphPad Prisma, versão 6.1.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Efeito dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis* M294 e macrófagos Raw 264.7

5.1.1 Grupo 1

Os alvos iniciais deste Projeto eram as HDACs e os testes com os seus potenciais inibidores, entretanto, ao longo dos trabalhos, outros potenciais iHMEs foram testados e apresentaram ação leishmanicida significativa. Para o screening dos compostos, inicialmente todos eles foram testados em promastigotas de *L. braziliensis* e em macrófagos a 10 μ M, concentração padrão utilizada para o screening inicial de compostos em parasitos dentro do projeto A-ParaDDisE, e o efeito desses compostos foi avaliado após 24, 48 e 72 horas. A partir desse screening inicial, os compostos que apresentaram efeito leishmanicida significativo e que não foram tóxicos para macrófagos, tiveram o seu IC₅₀ em promastigotas determinado e seguiram para o ensaio de infecção em macrófagos. Nessas etapas, o tempo de avaliação de ação dos compostos foi de 48 horas, tempo este determinado como o melhor a partir dos resultados do screening inicial. Após o ensaio de infecção, os compostos mais eficazes contra os amastigotas intracelulares tiveram o seu IC₅₀ determinado após 48 horas. Os resultados dos testes realizados supracitados são mostrados a seguir.

Para a avaliação do efeito dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7, os testes foram realizados em placas de 96 poços. Os compostos foram testados a uma concentração de 10 μ M e o seu efeito foi avaliado pelo método da resazurina 24, 48 e 72 horas após a sua adição na placa de 96 poços. Tanto os controles (Anfotericina B e DMSO 0,1%) quanto os compostos foram testados em quadruplicata dentro de cada experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos.

O primeiro grupo de compostos testados foi o de compostos enviados pelo Dr. Wolfgang Sippl e o efeito destes após 24 horas em promastigotas de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 pode ser visto no Gráfico 1.

Um total de 18 compostos foram recebidos e testados, porém, como mostra o Gráfico 1, apenas o efeito de sete estão representados para 24 horas. Isso porque somente foi considerado significativo o efeito daqueles compostos que não foram tóxicos para macrófagos (% redução da resazurina $\geq 85 \pm$ SD, considerando o máximo de toxicidade apresentado pela droga

leishmanicida controle Anfotericina B) e que apresentaram um efeito leishmanicida mínimo de 25% em promastigotas (% redução da resazurina $\leq 75 \pm \text{SD}$). Sendo assim, o efeito dos compostos BSF2, BSF6, BSF16, BSF20, BSF28, BSF31, BSF2Em, BSHH, BSG3, TH78, TH83 não foi considerado para 24 horas.

Considerando-se o valor da média de % de redução da resazurina, no Gráfico 1 é possível observar que o BSF39 foi o composto que teve o maior efeito em promastigotas (% redução da resazurina = $55 \pm 11 \text{ SD}$), seguido do BSF38 (% redução da resazurina = $58 \pm 7 \text{ SD}$), BSF13 (% redução da resazurina = $60 \pm 7 \text{ SD}$) e BSF2P (% redução da resazurina = $66 \pm 5 \text{ SD}$). Em macrófagos, o efeito do TH85 pode ser comparado ao da Anfotericina B, ou seja, um efeito mínimo (% redução da resazurina = $97 \pm 5 \text{ SD}$), seguido do efeito do BSF2P (% redução da resazurina = $92 \pm 3 \text{ SD}$), BSFH e BSF2E (% redução da resazurina = 90 ± 12 e 9 SD , respectivamente). Dessa forma, é possível inferir que os compostos não foram tóxicos para os macrófagos após as 24 horas.

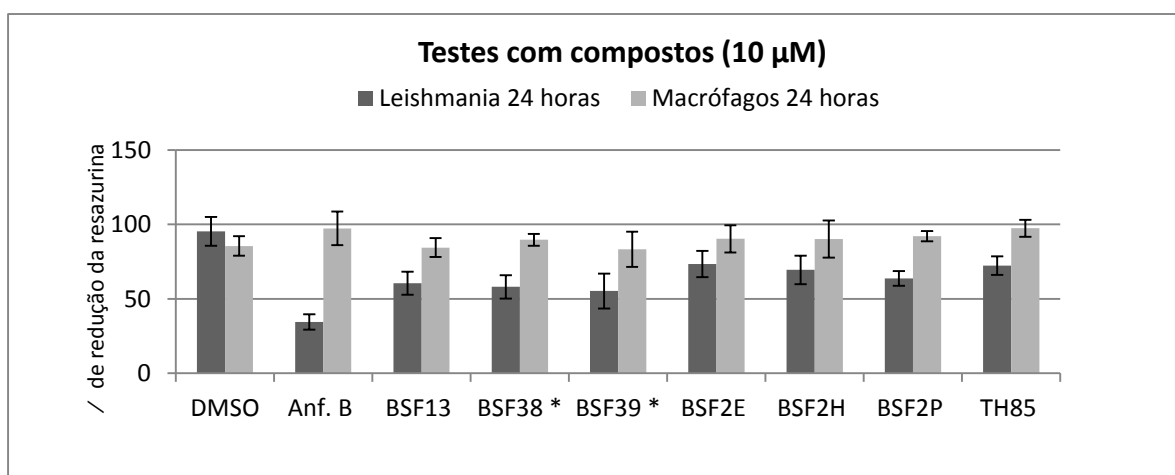


Gráfico 1. Efeito dos compostos em promastigotas axênicas de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 após 24 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. * compostos com maior efeito em promastigotas.

Após 48 horas, os mesmos compostos mantiveram o seu efeito em promastigotas e outros compostos mostraram-se também relativamente eficazes, como pode ser visto no Gráfico 2:

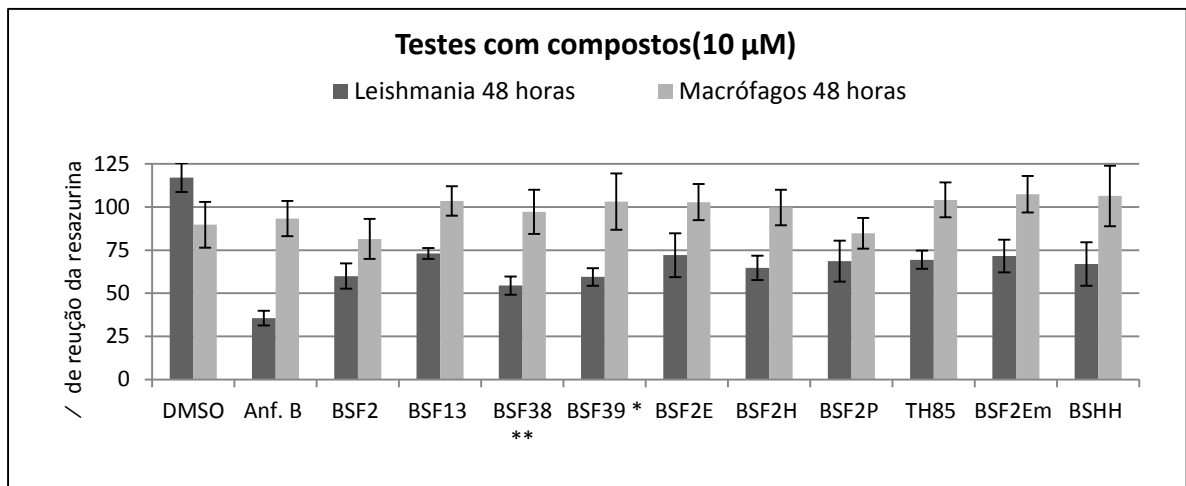


Gráfico 2. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. * compostos com maior efeito em promastigotas.

Os compostos BSF38 e BSF39 mantiveram a sua eficácia em promastigotas mesmo após 48 horas, sendo também após esse tempo, os compostos com maior efeito em promastigotas (% redução da resazurina = 54 e 59 ± 5 SD, respectivamente). Considerando-se o valor da média de % de redução da resazurina, o efeito do BSF2 equiparou-se ao efeito do BSF39 (% redução da resazurina = 59 ± 7 SD), seguido do efeito do BSF2H (% redução da resazurina = 64 ± 7 SD), BSHH (% redução da resazurina = 67 ± 12 SD), BSF2P (% redução da resazurina = 68 ± 11 SD) e TH85 (% redução da resazurina = 69 ± 5 SD). O BSF2Em, BSF2E e o BSF13 foram os compostos com menor efeito em promastigotas se comparados aos compostos anteriormente citados (% redução da resazurina entre 71-73). Quando a ação de todos esses compostos é vista em macrófagos, observa-se que não houve efeito tóxico significativo.

Alguns compostos que foram eficazes em promastigotas após 24 horas, mantiveram o seu efeito mesmo após 72 horas, como mostra o Gráfico 3:

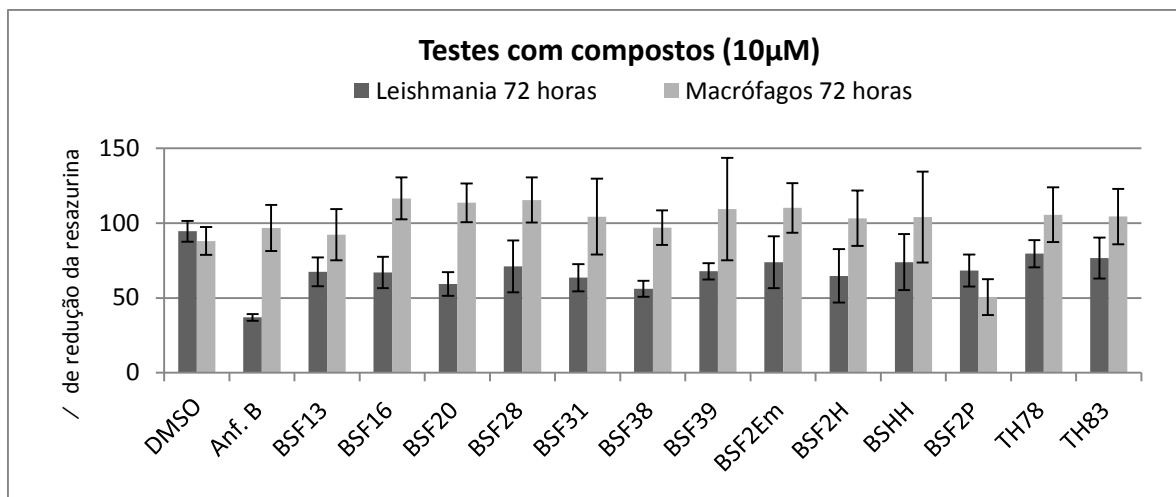


Gráfico 3. Efeito dos compostos em promastigotas axênicas de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 após 72 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Os compostos BSF13, BSF38, BSF39, BSF2H e BSF2P foram os únicos compostos que mantiveram o seu efeito em promastigotas nos três tempos avaliados, 24, 48 e 72 horas. Além disso, outros compostos mostraram certo efeito leishmanicida em promastigotas somente após 72 horas, como o BSF16, BSF20, BSF28, BSF31, TH78 e TH83. É curioso observar também após 72 horas, que o BSF2P foi bastante tóxico para os macrófagos (% redução da resazurina = 50 ± 12 SD), enquanto que para promastigotas, o seu efeito se manteve (% redução da resazurina = 68 ± 10 SD). Para os outros compostos após 72 horas, o efeito em macrófagos foi praticamente inexistente.

Sabendo que o efeito de drogas é tempo-dependente, que alguns compostos mantiveram o seu efeito mesmo após 48 horas e considerando este tempo um intermediário entre aqueles testados para avaliação do efeito dos compostos, um Teste t de Student não-pareado bicaudal foi realizado para aqueles compostos que apresentaram certo efeito leishmanicida após 48 horas a fim de se verificar se o efeito dos compostos observado em promastigotas de *L. braziliensis* era realmente devido à ação destes ou era consequência do efeito da presença do DMSO, uma vez que os compostos testados foram diluídos em DMSO (100%). O resultado do teste pode ser visto no Gráfico 4:

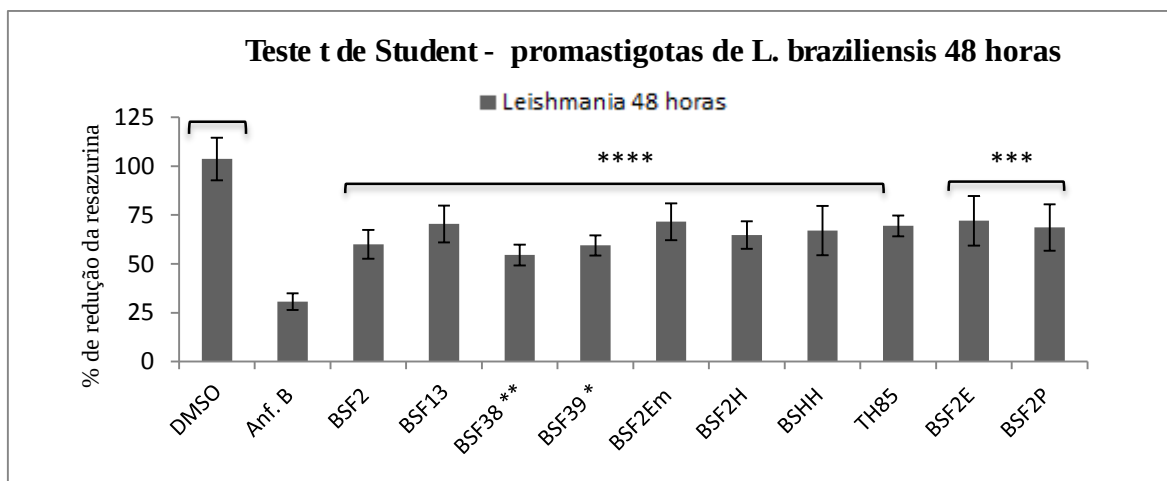


Gráfico 4. Teste t para verificar o efeito dos compostos em promastigotas axênicas de *L. braziliensis*. Os dados no gráfico são referentes a um teste t de Student não-pareado bicaudal realizado para aqueles compostos com certo efeito leishmanicida após 48 horas. O objetivo era verificar se este efeito em promastigotas de *L. braziliensis* era devido ao DMSO, usado como controle negativo dos experimentos e diluente dos compostos, ou era devido somente à ação dos compostos sobre os parasitos. Os dados utilizados para o teste t foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos e DMSO após 48 horas e fazem um comparativo entre este e os compostos **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$.

O que se pode observar no Gráfico 4 é que o efeito em promastigotas foi realmente devido aos compostos e não ao DMSO. Isso porque a diferença estatística para BSF13, BSF38, BSF39, BSF2Em, BSF2H, BSFH e TH85 quando comparados ao DMSO foi altamente significativa, com $P \leq 0,0001$. O mesmo se comprova para BSF2E e BSF2P, com $P \leq 0,001$.

Ainda avaliando os efeitos dos compostos após 48 horas, outro Teste t de Student não-pareado bicaudal foi realizado a fim de se verificar se a diferença dos efeitos dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis* e macrófagos após as 48 horas era significativa. O resultado é apresentado no Gráfico 5:

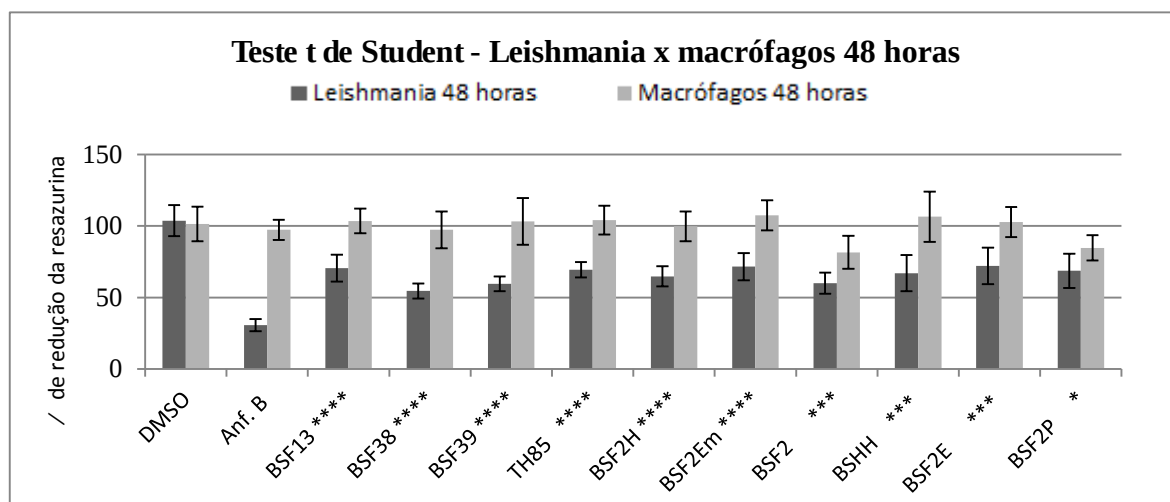


Gráfico 5 Teste t para verificar a diferença de efeito dos compostos em promastigotas axênicos de *L.braziliensis* e macrófagos Raw 264.7. Os dados no gráfico são referentes a um teste t de Student não-pareado bicaudal realizado para aqueles compostos com certo efeito leishmanicida após 48 horas e que não foram tóxicos para macrófagos após este mesmo tempo. O objetivo era verificar se este efeito leishmanicida era realmente significativo quando comparado à não toxicidade dos compostos para os macrófagos. Os dados utilizados para o teste t foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos em Leishmania e macrófagos após 48 horas. **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$.

Como é possível observar, houve diferença significativa no efeito de todos os compostos, em promastigotas quando comparado ao seu efeito em macrófagos, o que valida a ação leishmanicida desses compostos. O BSF13, BSF38, BSF39, TH85, BSF2H E BSF2Em foram os compostos em que essa diferença foi a mais significativa ($P \leq 0,0001$), seguidos do BSF2, BSHH e BSF2E ($P \leq 0,001$). Para o BSF2P essa diferença foi a menor dentro dos compostos testados ($P \leq 0,05$). A partir desses resultados após 48 horas, o efeito desses compostos foi avaliado em amastigotas de *L. braziliensis* como será apresentado posteriormente.

As diferenças encontradas para o efeito dos compostos após 24, 48 e 72 horas em promastigotas, podem ser explicadas uma vez que o efeito de drogas in vitro (e também in vivo) é tempo e concentração dependente. Quanto ao tempo, isso fica evidenciado quanto aos compostos que somente foram eficazes em promastigotas após 72 horas, como o BSF16. Este fato torna-se mais claro uma vez que a captação de drogas por parasitos pode ocorrer de forma lenta, através de mecanismos de difusão, ou podem existir potenciais transportadores que eficientemente carregam essas drogas para o interior das células parasitárias em um menor tempo (Wilson et al, 2008). Quanto à concentração dos compostos, esta foi a mesma para todos nos tempos avaliados ($10 \mu\text{M}$), porém, o que se pôde observar é que o efeito desses compostos em promastigotas não foi o mesmo. Os compostos testados são estruturalmente diferentes, o que implica que em uma dada concentração, um composto pode ser eficaz contra o parasito, mas outros não, necessitando de concentrações maiores para exercerem efeito. Como será

mostrado posteriormente, o IC₅₀ para alguns desses compostos foi determinado, sendo bastante diferentes entre eles e até mesmo maiores que 10 µM. Além disso, a baixa ou a não captação dos compostos aliadas à inativação metabólica destes pelos parasitos, podem explicar a não eficácia de alguns dos compostos testados em promastigotas (MAREK et al, 2013).

Uma questão a respeito dos compostos testados, é que o alvo específico deles nas células parasitárias ainda não foi identificado, podendo este alvo ser uma HDAC (como no caso da série de compostos TH), outras enzimas envolvidas nos processos de metilação/demetilação de histonas e o próprio DNA (compostos da série BSF). Aliado a isso, essas enzimas são também altamente conservadas nos eucariotos. Levando-se em conta esses fatos, eles podem explicar a toxicidade do BSF2P para macrófagos após 72 horas. Isso porque esses compostos podem estar agindo sobre as enzimas-alvo dos macrófagos, e, como estas estão envolvidas em processos celulares cruciais, uma vez inibidas, isso leva a célula à morte. Quanto ao tempo para a toxicidade, a questão da captação e/ou metabolização mais lenta do composto pelos macrófagos podem ser consideradas. A hipótese de os compostos estarem agindo sobre as enzimas dos macrófagos pode explicar também a toxicidade de alguns compostos para essas células já nas primeiras 24 horas.

Os compostos designados pela série “BSFs”(ANEXO 2), são análogos da Furamidina (ANEXO 2), um composto pertencente à classe das diamidinas difenilfurano com potente atividade antimicrobiana, incluindo ação contra *Giardia lamblia* e *P. falciparum* (DE SOUZA et al, 2004). Compostos contendo diamidinas têm sido utilizados há muito tempo no tratamento das Leishmanioses, a exemplo da Pentamidina (ANEXO 2), e vários estudos envolvendo esses compostos têm sido feitos em *Leishmania* com comprovação de sua eficácia contra esses parasitos tanto em sua forma extracelular quanto intracelular (HU et al, 2008). O mecanismo de ação desses compostos é baseado na sua capacidade de ligação à alça menor do DNA em locais ricos em A-T (adenina e timina), o que poderia inibir a ação de enzimas dependentes de DNA ou diretamente inibir a transcrição (ARAFA et al, 2005). Em parasitos, em especial *Leishmania*, uma das explicações para o efeito desses compostos contendo diamidinas é que estes se ligam ao DNA do cinetoplasto (kDNA) e neste induzem mudanças conformacionais, as quais poderiam inibir, por exemplo, a habilidade da topoisomerase II em catalisar a abertura e o fechamento dos mini-círculos do kDNA para os processos de transcrição e/ou replicação, consequentemente, podendo levar à desintegração da organela. Dessa forma, é mais provável que a exposição das regiões do kDNA ricas em AT aos compostos contendo diamidinas, seja

capaz de mudar não apenas características topológicas do DNA, mas também modificar a interação deste com outras proteínas (Wilson et al, 2008).

No que diz respeito aos compostos testados, o mecanismo de ação supracitado pode ter ocorrido principalmente com aqueles compostos com efeitos mais significativos em promastigotas, porém, não esclarece o fato de alguns compostos não terem sido eficazes. Entretanto, essa questão pode ser explicada a partir das estruturas dos compostos, uma vez que compostos contendo diamidina que se ligam bem às sequências de A-T na alça menor do DNA, possuem uma curvatura adequada que corresponde à forma convexa e helicoidal da torção da alça (Wilson et al, 2008). Sendo assim, é possível que os compostos testados e que não foram eficazes contra promastigotas de *L. braziliensis*, não tenham se acoplado perfeitamente à alça menor do DNA para exercerem seus efeitos no parasito.

Como citado anteriormente, o alvo específico e o mecanismo de ação de alguns dos compostos testados ainda não foi totalmente identificado ou esclarecido. Sendo assim, além de se ligarem ao DNA e dessa forma inibir o crescimento do parasito, esses compostos podem também se ligar a duas outras enzimas: LSD1 e PRMT e de alguma forma ser eficaz contra *L. braziliensis*. Muitos inibidores da LSD1 atuam se ligando ao FAD de forma irreversível, enquanto outros agem se ligando aos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima por meio de ligações de hidrogênio (ANEXO 3). Estudos com diversos inibidores da LSD1, incluindo aqueles que contêm amidinas, mostram que cada inibidor se liga a diferentes aminoácidos do sítio catalítico, podendo dessa forma ser mais ou menos eficaz sobre a enzima (CULHANE et al, 2010; MOULD et al, 2015; SCHMITT et al, 2013). Além disso, a maioria desses estudos diz respeito a enzimas humanas e relatos sobre a LSD1 em parasitos ainda são escassos. Porém, como essas enzimas são altamente conservadas em eucariotos, é possível que os mecanismos de inibição supracitados possam também ocorrer em LSD1 de *Leishmania*, dessa forma inibindo o crescimento do parasito.

Quanto às PRMTs, estudos com seus inibidores são limitados e pouco se sabe sobre o seu mecanismo de ação, porém, estudos com modelos homólogos à proteína humana e com alguns de seus inibidores conhecidos, como a Estilbamidina, um composto contendo amidinas, revelaram que ligações de hidrogênio do grupo amidina desses inibidores com os resíduos de ácido glutâmico Glu129, Glu144 e Glu153 presentes no sítio catalítico da enzima, são capazes de inibir a atividade da mesma (ANEXO 4) (YAN et al, 2014; SPANNHOFF, SIPPL & JUNG, 2009). Dessa forma, uma vez que as PRMTs também são altamente conservadas em eucariotos,

é possível que o mecanismo de inibição enzimática citado também ocorra em *Leishmania*, dessa forma inibindo o seu crescimento *in vitro*.

Os mecanismos de ação dos inibidores de LSD1 e PRMT discutidos para *Leishmania* são hipotéticos, sendo necessários mais estudos, tais como aqueles que envolvam a estrutura cristalográfica dos possíveis alvos, bem como análises de acoplamento dos inibidores às enzimas e também testes com anticorpos anti-metil histonas, para ser possível afirmar como esses inibidores realmente agem no parasito.

Quanto aos compostos designados “THs”, estes apresentam as HDACs como alvo. Estudos com a HDAC8 de *S. mansoni* (smHDAC8), com a HDAC8 de humanos (hHDAC8) e com inibidores de hHDAC bem caracterizados, como o SAHA, por Marek et al (2013), permitiram a identificação de aminoácidos chave para atividade catalítica dessas enzimas em seu sítio ativo, sendo eles: H141, H142 e Y341. Além disso, foi visto que o Y341 está relacionado à ligação do substrato. A partir dessas informações estruturais, potenciais inibidores da smHDAC8 foram selecionados e testados, mostrando se ligar a essa enzima com as mesmas características específicas encontradas para os testes com o SAHA, ou seja, ligações com os aminoácidos chave e com o zinco através do seu grupo hidroxamatos no sítio catalítico (ANEXO 5). Aliado a isso, os inibidores selecionados mostraram maior efeito na inibição da smHDAC8 do que na HDAC humana (MAREK et al, 2013). Dessa forma, é possível que o TH85, o qual foi o único inibidor de HDAC testado com efeito em *Leishmania* e não tóxico para os macrófagos, tenha agido pelos mesmos mecanismos na inibição dos promastigotas, já que a smHDAC8 apresenta ortólogos em *Leishmania*. As diferenças encontradas na sua eficácia para os três tempos analisados podem ser explicadas não só pela possível inativação metabólica deste pelo parasito, mas também pode ser que a ligação do inibidor a outros aminoácidos presentes no sítio catalítico da HDAC de *Leishmania* seja necessária para aumentar a sua eficácia. Quanto aos outros compostos testados, TH78 e TH83, estes foram tóxicos para macrófagos e/ou apresentaram pouco efeito em *Leishmania*. Com relação à *Leishmania*, pode ser que a especificidade inibidor-resíduos de aminoácidos no sítio catalítico não tenha sido suficiente, influenciando na eficácia contra o parasito. Quanto à toxicidade para macrófagos, pode ser que os compostos tenham agido sobre as HDACs dessas células, inibindo o seu crescimento.

5.1.2 Grupo 2

O segundo grupo de compostos testados em promastigotas de *L. braziliensis* e macrófagos Raw 264.7 foi cedido pelo Dr. Manfred Jung. Grande parte desses compostos são comerciais e

utilizados para o tratamento do câncer (ANEXO 6). O efeito desses compostos, após 24 horas, pode ser observado para promastigotas e macrófagos no Gráfico 6:

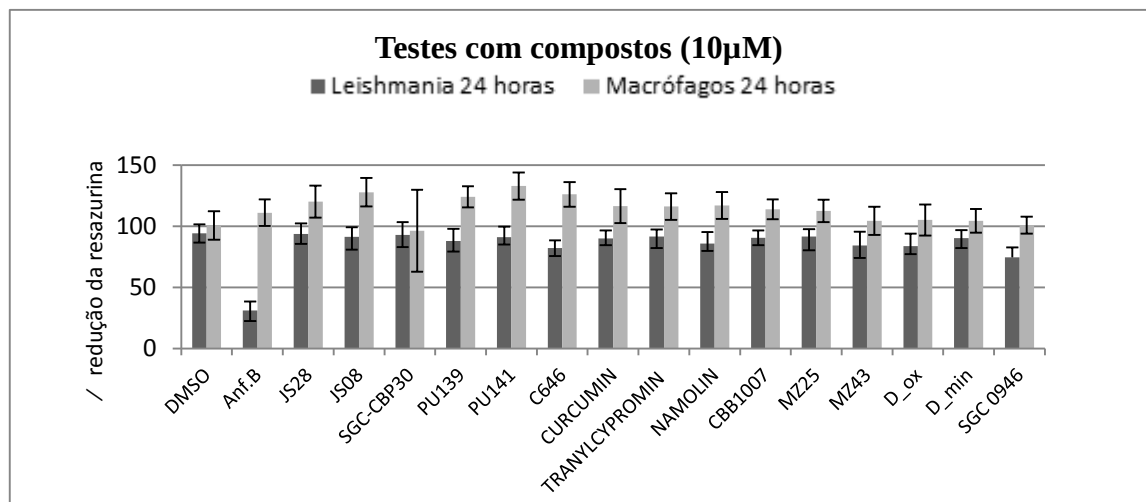


Gráfico 6. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 após 24 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Um total de 23 compostos foram recebidos e testados. Entretanto, como pode ser visto no Gráfico 6, o resultado de 15 compostos está representado para 24 horas. Isso porque os compostos Vorinostat, SW55, Bromosporine, JQ1, AH174, GSK343, PFI-2 e Lie 1417 apresentaram alta toxicidade para macrófagos (% redução da resazurina entre 36-85) e pouco ou nenhum efeito em promastigotas após 24 horas (% redução da resazurina >78). Dessa forma, esses critérios inviabilizam posteriores análises com esses compostos para o tempo analisado. Com relação aos resultados dos compostos presentes no Gráfico 6, praticamente nenhum deles apresentou efeito significativo em promastigotas, com exceção do SGC 0946, cujo efeito foi o maior (% redução da resazurina < 75, mesmo critério utilizado para o primeiro grupo de compostos). Com relação aos macrófagos, é curioso observar que não houve efeito de nenhum dos compostos (% redução da resazurina $\geq$ 100).

A fim de se verificar se algum dos compostos foi tóxico para promastigotas, visto que todos eles não apresentaram efeito significativo após 24 horas, e se essa toxicidade é devida ao composto e não ao DMSO, um Teste t de Student não-pareado bicaudal foi realizado. O resultado é mostrado no Gráfico 7:

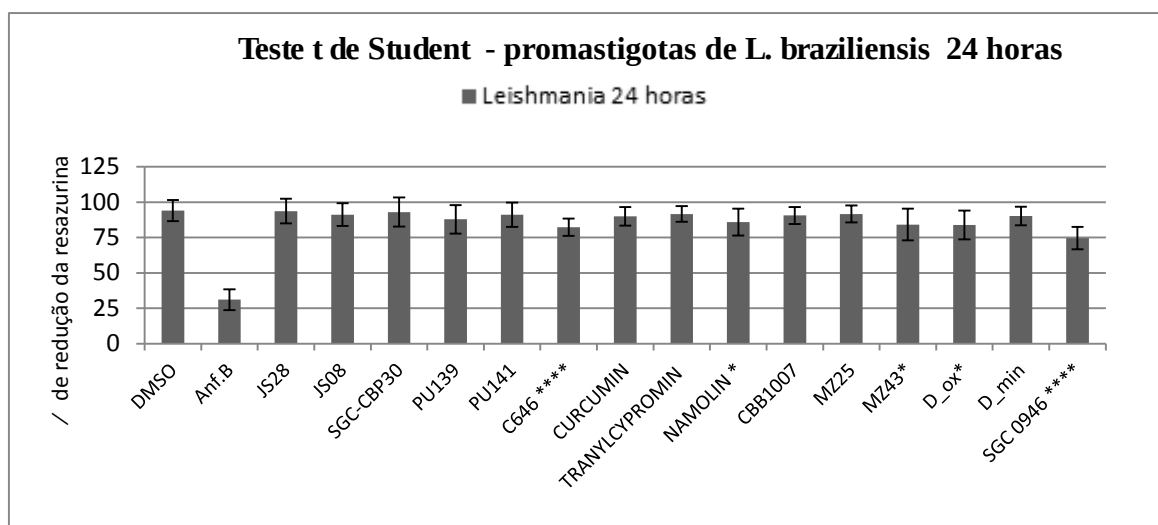


Gráfico 7. Toxicidade dos compostos para promastigotas axênicos de *L. braziliensis* após 24 horas. Os dados no gráfico são referentes a um teste t de Student não-pareado bicaudal realizado para os compostos testados e avaliados após 24 horas. O objetivo era verificar se esses compostos foram tóxicos para *Leishmania* após esse tempo, visto que o efeito leishmanicida destes foi pequeno ou praticamente não existiu. Além disso, se houve toxicidade para *Leishmania*, verificar se esta foi devida ao DMSO, usado como controle negativo dos experimentos e diluente dos compostos, ou foi devida somente à ação dos compostos sobre os parasitos. Os dados utilizados para o teste t foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos e DMSO após 24 horas e fazem um comparativo entre este e os compostos.

Os compostos C646 e SGC0946 foram os mais tóxicos para promastigotas após 24 horas ($P \leq 0,0001$), enquanto a toxicidade do Namolin, Mz43, D_ox foi menor ($P \leq 0,05$). Porém, observa-se que a toxicidade apresentada não é muito alta, atingindo um máximo de inibição da viabilidade dos parasitos de aproximadamente 18% para o C646 e 25% para o SGC0946, quando estas são comparadas à toxicidade apresentada em promastigotas pelos compostos BSFs e TH85 do primeiro grupo de compostos testados. Por exemplo, para o BSF38 após 24 horas, a capacidade de inibição da viabilidade dos parasitos foi de 42%. Os demais compostos testados apresentados no Gráfico 7 não foram tóxicos para promastigotas após as 24 horas.

Após 48 horas, o efeito dos compostos em promastigotas foi, de modo geral, um pouco maior para vários dos compostos testados, mas não para todos, como mostra o Gráfico 8:

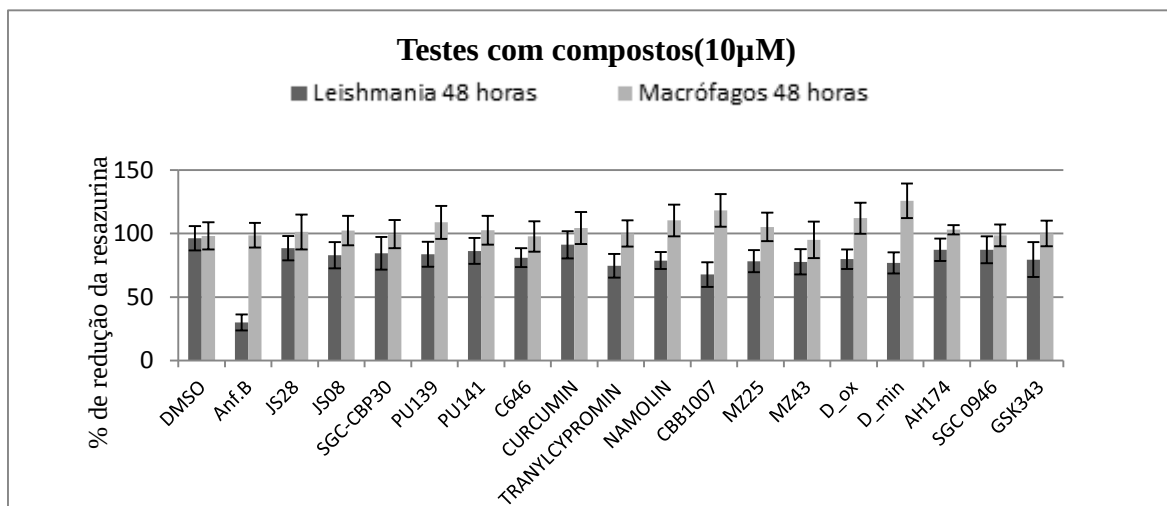


Gráfico 8. Efeito dos compostos em promastigotas axênicos de *L. braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, tanto para *Leishmania* quanto para macrófagos. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

O Tranylcypromin e o CBB1007 foram os compostos cujo o efeito em promastigotas mais se acentuou após 48 horas. Para o Tranylcypromin, o efeito passou de 91 ± 5 SD para 74 ± 9 SD (% redução da resazurina) e para o CBB1007, de 90 ± 6 SD para 67 ± 9 SD (% redução da resazurina). Para os demais compostos, o efeito em promastigotas pouco se alterou. Em relação aos macrófagos, os compostos não tiveram efeito após 48 horas, tendo o mesmo acontecido após 24 horas.

A fim de verificar a toxicidade dos compostos em promastigotas de *L. braziliensis* após 48 horas, um Teste t de Student não-pareado bicaudal foi realizado. O resultado é mostrado no Gráfico 9.

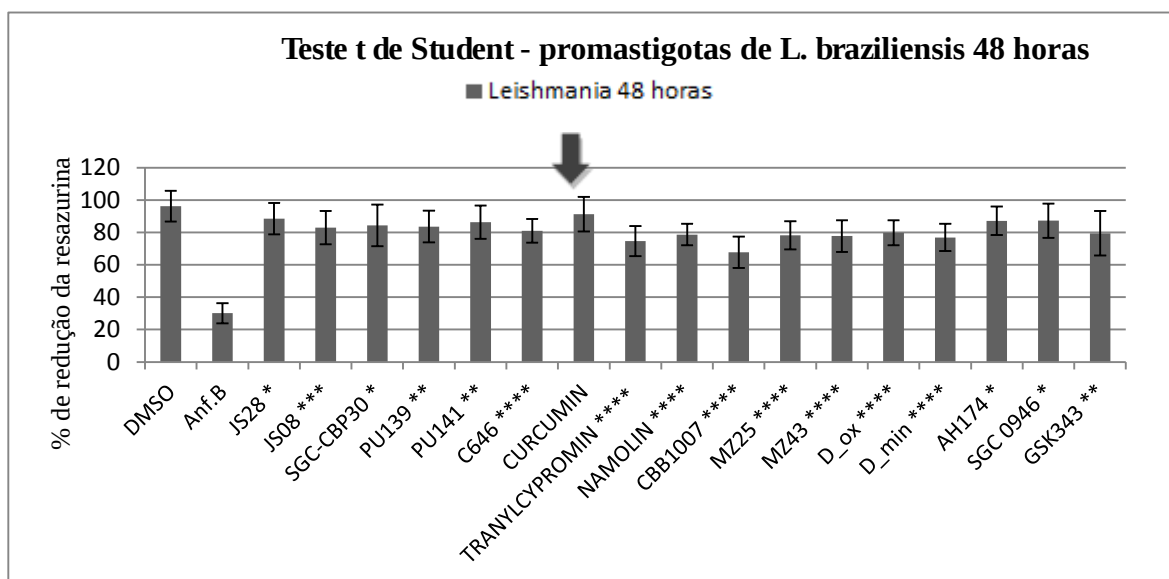


Gráfico 9. Toxicidade dos compostos para promastigotas axênicos de *L. braziliensis* após 48 horas. Os dados no gráfico são referentes a um teste t de Student não-pareado bicaudal realizado para os compostos testados e avaliados após 48 horas. O objetivo era verificar se esses compostos foram tóxicos para *Leishmania* após esse tempo, visto que o efeito leishmanicida destes foi pequeno ou praticamente não existiu. Além disso, se houve toxicidade para *Leishmania*, verificar se esta foi devida ao DMSO, usado como controle negativo dos experimentos e diluente dos compostos, ou foi devida somente à ação dos compostos sobre os parasitos. Os dados utilizados para o teste t foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos e DMSO após 48 horas e fazem um comparativo entre este e os compostos. **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$; ** $P \leq 0,01$; * $P \leq 0,05$.

A toxicidade em promastigotas pode ser observada para todos os compostos, com exceção do Curcumin, (**seta no Gráfico 9**), que foi o único composto sem toxicidade após 48 horas. A maior toxicidade após 48 horas foi dos compostos: C646 (inibição da viabilidade dos parasitos 19%), Tranlycypromin (25%), Namolin (21%), CBB1007 (32%), MZ43 (22%), D_ox (20%) e D_min (23%) ($P \leq 0,0001$), e a menor dos compostos: JS28 (11%), SGC-CBP30 (15%), AH174 (13%) e SGC0946 (13%).

Uma Análise de Variância (ANOVA) foi realizada para verificar se os compostos e o DMSO realmente não foram tóxicos para os macrófagos após 48 horas. O resultado é mostrado no Gráfico 10.

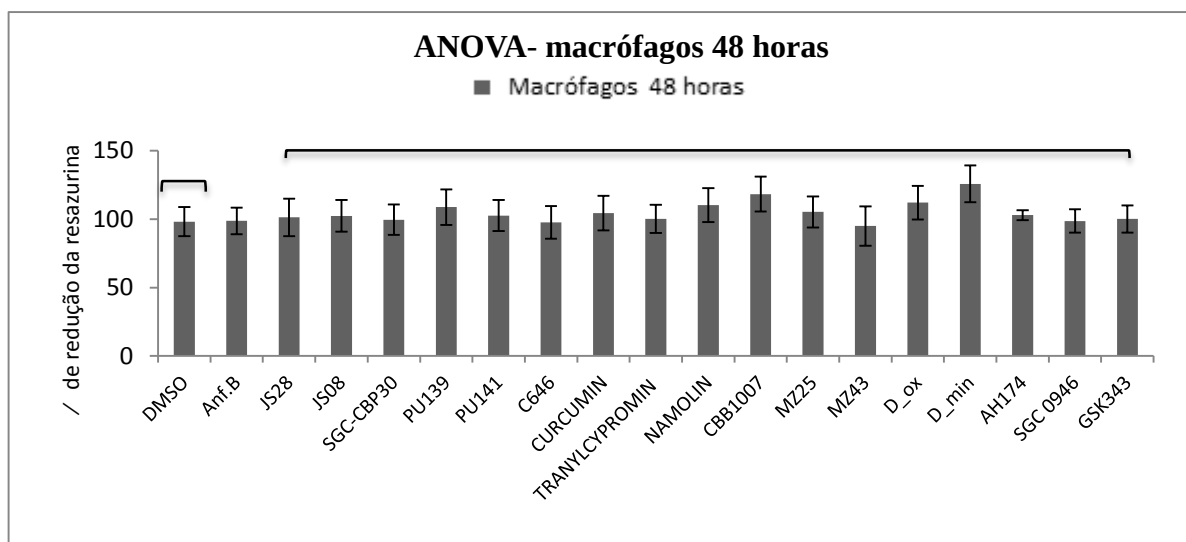


Gráfico 10. Análise de Variância (ANOVA) para toxicidade dos compostos e DMSO em macrófagos após 48 horas. Os dados no gráfico são referentes ao teste ANOVA realizado para os compostos testados e avaliados após 48 horas em macrófagos. O objetivo era verificar se esses compostos e o DMSO, usado como controle negativo dos experimentos e diluente dos compostos, não foram tóxicos para essas células após esse tempo. Os dados utilizados para o teste ANOVA foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos e DMSO após 48 horas e fazem um comparativo entre este e os compostos.

Após 48 horas, nenhum composto apresentou toxicidade para os macrófagos, como pode ser visto no Gráfico 10. Esses compostos foram testados em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* como será apresentado posteriormente.

Os testes para avaliação do efeito dos compostos do segundo grupo após 72 horas não foram feitos, uma vez que como mostrado para o primeiro grupo de compostos testados, após 72 horas não houve alteração no efeito em promastigotas e macrófagos quando comparados à 48 horas, sendo este considerado o tempo limite para avaliação dos compostos nas análises posteriores.

O Tranylcypromin e o CBB1007 são compostos comerciais que têm sido investigados como potenciais agentes terapêuticos para a leucemia mielóide aguda. O Tranylcypromin é um inibidor irreversível de LSD1, enquanto o CBB1007 é um inibidor reversível dessa enzima (MOULD et al, 2015). Uma vez que esses compostos foram os mais eficazes em promastigotas após 48 horas, é possível que o BSF2, que também foi eficaz em promastigotas após esse tempo, seja igualmente um inibidor de LSD1, sendo o mecanismo de inibição enzimática desses compostos os mesmos discutidos anteriormente. Outros compostos comerciais testados nesse segundo grupo (ANEXO 6) também apresentam, além da LSD1, as HDACs e histonas metiltransferases como alvos, o que implica que os mesmos mecanismos de ação dos compostos discutidos anteriormente para o primeiro grupo, possam ser aplicados aos compostos desse segundo grupo, bem como as prováveis hipóteses de sua não eficácia em promastigotas e

toxicidade para macrófagos. Além disso, algum outro mecanismo biológico pode estar interferindo na ação desses compostos nos parasitos e macrófagos, tanto positiva quanto negativamente, sendo necessários outros estudos para se elucidar os efeitos encontrados.

5.2 Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M294-GFP em infecção de macrófagos

Os compostos selecionados a partir dos testes em promastigotas, tanto do primeiro quanto do segundo grupo de compostos, que não foram tóxicos para macrófagos e que apresentaram ou não ação sobre promastigotas, tiveram o seu efeito avaliado em amastigotas de *L. braziliensis* M2904-GFP em infecção de macrófagos.

Os ensaios de infecção seguiram o protocolo descrito anteriormente, sendo os compostos testados na mesma concentração utilizada em promastigotas, 10 μ M. Neste ensaio, os promastigotas totais, contendo formas metacíclicas infecciosas, inicialmente infectam a cultura de macrófagos. Após a infecção, esta é tratada com os compostos por 48 horas e depois os macrófagos são lisados para liberar os amastigotas intracelulares. Estes então são incubados em estufa B.O.D a 25°C por pelo menos 48 horas para que se transformem novamente em promastigotas e repliquem, a fim de ser possível quantificar a fluorescência. O resultado da ação dos compostos é então comparado com os controles internos sem nenhum composto e com o diluente DMSO. Tanto os compostos quanto os controles (Anfotericina B e DMSO) foram testados em quadruplicata dentro de cada experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Para o primeiro grupo de compostos testados, o resultado é mostrado no Gráfico 11:

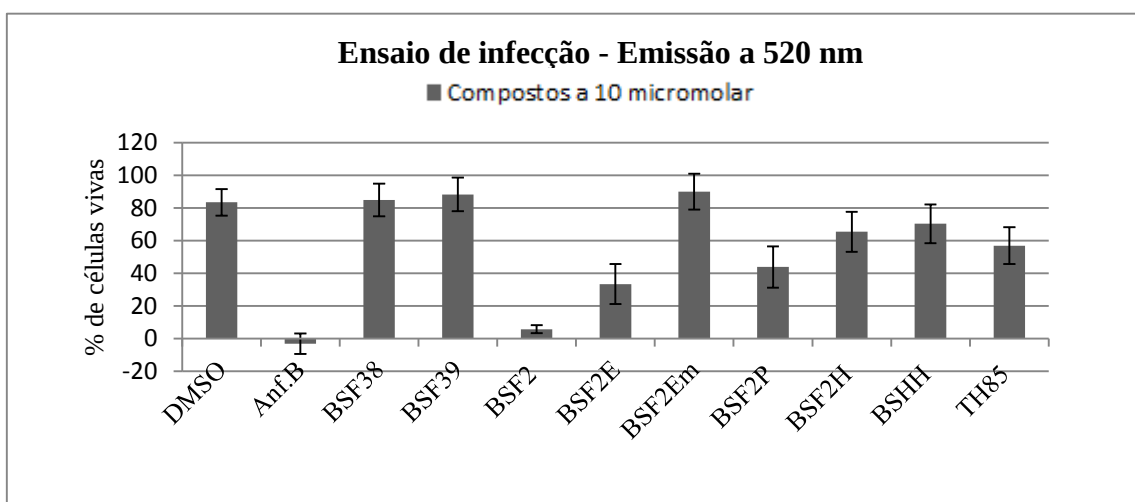


Gráfico 11. Efeito dos compostos do primeiro grupo em amastigotas intracelulares de *L.braziliensis* M2904-GFP após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos. A leitura dos experimentos foi feita em leitora de microplacas, com os seguintes comprimentos de onda: com 490 nm (excitação) e 520 nm (emissão).

Como se pode observar, o BSF2 apresentou um efeito altamente significativo em amastigotas, sendo capaz de inibir a infecção em aproximadamente 95%. Os efeitos do BSF2E e do BSF2P também foram significativos, com uma porcentagem de inibição da infecção em mais de 50%, seguidos do TH85, cuja inibição foi de 43%. É curioso observar que os compostos BSF38 e BSF39, que apresentaram efeito significativo em promastigotas mesmo após 72 horas, em amastigotas não se mostraram eficazes, onde a inibição da infecção não chegou a 20%.

Um Teste t de Student não-pareado bicaudal foi realizado a fim de se verificar se o efeito dos quatro compostos que apresentaram o maior efeito em amastigotas foi realmente significativo. O resultado pode ser visto no Gráfico 12:

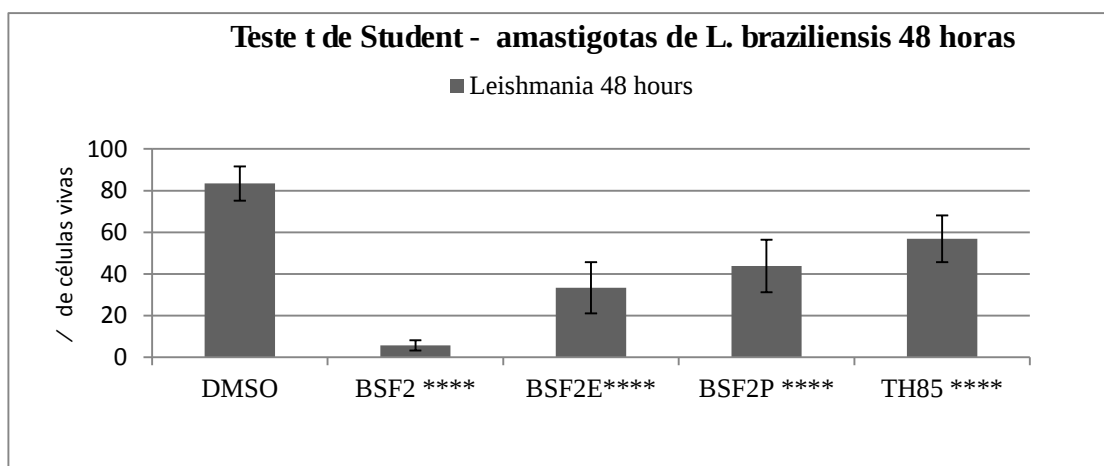
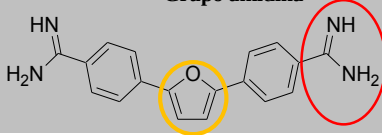
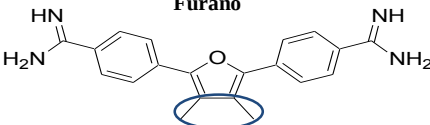
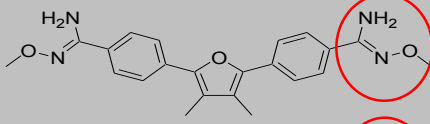
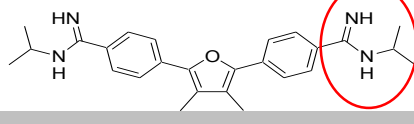
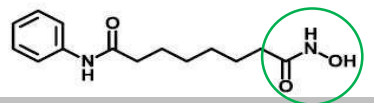
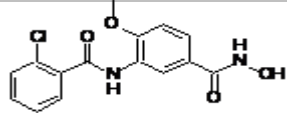


Gráfico 12. Toxicidade dos compostos para amastigotas intracelulares de *L.braziliensis*-M2904 após 48 horas. Os dados apresentados no gráfico são referentes a um teste t de Student não-pareado bicaudal realizado para aqueles compostos com maior efeito em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* após 48. O objetivo era verificar se este efeito leishmanicida era realmente significativo e se era devido à ação dos compostos sobre os parasitos e não do DMSO, controle negativo dos experimentos e diluente dos compostos. Os dados utilizados para o teste t foram aqueles obtidos a partir da média e do desvio padrão calculados para os compostos do primeiro grupo e para o DMSO no ensaio de infecção após 48 horas. **** $P \leq 0,0001$.

Como pode ser observado, o efeito dos compostos em amastigotas foi realmente significativo ($P \leq 0,0001$). Além disso, como pode ser visto na Tabela 3, a estrutura química dos compostos pode ter influenciado a sua eficácia em amastigotas.

Tabela 3. Estrutura química dos compostos e sua eficácia em amastigotas após 48 horas

Composto	Efeito no ensaio de infecção (% de células vivas)	Estrutura química dos compostos
Furamidina	-	Grupo amidina 
BSF2	5	Furano 
BSF2E	33	
BSF2P	44	
SAHA	-	
TH85	57	

Os compostos da série “BSFs” são análogos da furamidina, composto eficaz contra parasitos como discutido anteriormente. Quando a estrutura química do BSF2 é comparada à da furamidina, é possível observar que os grupos amidina do BSF2 permaneceram inalterados, porém, houve a adição de duas metilas no anel furano (destacado em azul na estrutura do BSF2). Essa alteração, no entanto, não diminuiu a eficácia do BSF2, que foi capaz de inibir o crescimento de amastigotas intracelulares em 95%. Já para o BSF2E, os seus grupos amidinas foram alterados (destacado em vermelho na estrutura do BSF2E), havendo a oxidação do grupo amina, o que resultou na diminuição da eficácia do composto quando comparada à do BSF2. Dessa forma, é possível observar que a presença do grupo amina interfere na atividade do composto. Com relação ao BSF2P, os grupos amidinas também foram alterados, havendo a substituição do grupo amina pelo grupo isopropil (destacado em vermelho na estrutura do BSF2P). Essa modificação no BSF2P fez com que este composto fosse o menos eficaz contra amastigotas intracelulares em comparação com o BSF2 e BSF2E. Para o composto TH85 (da

série de compostos TH's), este é um iHDAC do tipo hidroxamato, assim como o SAHA. Como é possível observar nas estruturas dos ácidos hidroxâmicos na página 24, SAHA e TSA, estes são formados pelo grupo cap, que se liga à enzima, por um linker, e por um grupo de ligação ao zinco (ZBG) (destacado em verde na estrutura do SAHA). Quando a estrutura do TH85 é comparada à do SAHA, é possível observar que o ZBG do TH85 permaneceu inalterado, porém, o grupo cap e o linker foram modificados. Uma vez que a inibição de amastigotas intracelulares pelo TH85 foi menor que 50%, é possível que a alteração do grupo cap que se liga à enzima, tenha de alguma forma diminuído a eficácia deste composto.

O segundo grupo de compostos selecionados, foi subdividido em dois grupos para a realização dos testes de infecção. No Gráfico 13 estão representados os resultados do primeiro subgrupo:

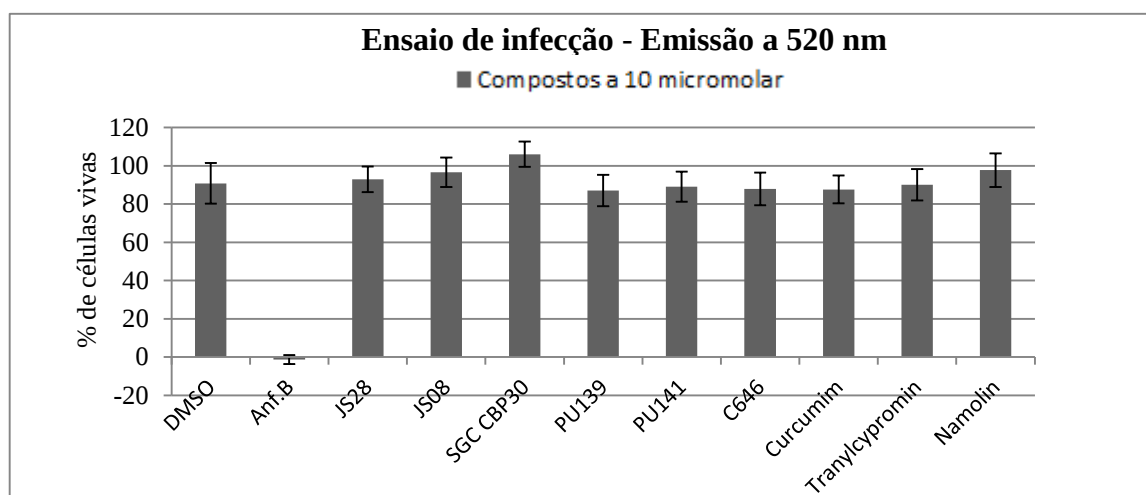


Gráfico 13. Efeito dos compostos do primeiro subgrupo em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2904-GFP após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Para o primeiro subgrupo de compostos, nenhum deles apresentou efeito significativo em amastigotas. O composto SGC-CBP30 foi o único que não exerceu qualquer efeito sobre os parasitos na infecção. O JS28, JS08 e o Namolin apresentaram pouco ou nenhum efeito nos amastigotas. No Gráfico 14 estão representados os resultados do segundo subgrupo:

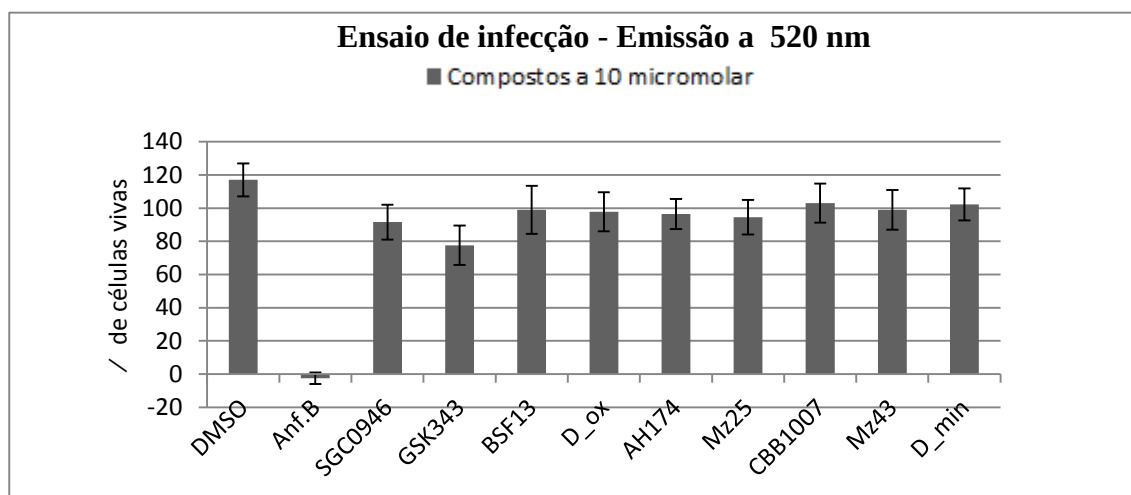


Gráfico 14. Efeito dos compostos do segundo subgrupo em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2904-GFP após 48 horas. Os compostos e os controles (Anfotericina B – controle positivo; DMSO – controle negativo) foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Os dados apresentados no gráfico são referentes à média calculada para cada composto a partir de todos os experimentos realizados e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Assim como para o primeiro subgrupo, os compostos deste grupo também não apresentaram efeito significativo em amastigotas, uma vez que a capacidade de inibição da infecção foi menor que 25% (em comparação com a Anfotericina B). O GSK343 foi o que apresentou o maior efeito, mas este também não foi significativo.

O processo de transformação de *Leishmania* de promastigota para amastigota é um processo complexo que envolve várias modificações morfológicas e bioquímicas. Modificações no metabolismo ocorrem principalmente no que diz respeito a uma faixa de pH ótimo (para sobreviver dentro dos fagolisossomos) e captação de nutrientes. Além disso, o padrão de expressão genética do parasito também se modifica de forma a se adequar ao ambiente intracelular. Sendo assim, várias podem ser as explicações para as diferenças na eficácia dos compostos testados em promastigotas e amastigotas.

Em primeiro lugar, a captação da droga pelos amastigotas pode ser influenciada por transportadores presentes na sua membrana, que podem não carregar de forma eficiente o composto para o interior da célula parasitária. Esse fato pode explicar a eficácia do BSF38 e BSF39 em promastigotas (que podem ter sido prontamente captados pelo parasito) e a sua ausência de efeito em amastigotas. Aliado a isso, a capacidade dos amastigotas em metabolizar a droga pode ser mais ou menos eficiente, influenciado assim, em uma maior ou menor toxicidade. Segundo, uma vez que a expressão genética também se altera, pode ser que as

enzimas-alvo dos compostos (HDACs, LSD1 e PRMTs) sejam mais ou menos expressas em amastigotas, o que influencia diretamente a eficácia do composto. Isso pode explicar o efeito do BSF2 em promastigotas, que foi significativo, e em amastigotas que foi altamente significativo. Além disso, para o BSF2, pode ser que os amastigotas não sejam capazes de metabolizá-lo, o que o torna tóxico para o parasito. Por último, fatores relacionados aos macrófagos devem ser levados em conta quanto a uma maior ou menor toxicidade de um composto para amastigotas *in vitro*. Primeiro, os macrófagos de diferentes tecidos podem apresentar propriedades diferentes, e isso pode influenciar na sobrevivência do parasito no interior da célula e também na metabolização do composto. Segundo, os macrófagos podem se tornar ativados na presença de moléculas dos amastigotas e dessa forma matar o parasito, sendo o efeito de inibição da infecção visto devido à ação dos macrófagos e não do composto. Terceiro, estudos com antimoniais pentavalentes em 1989, mostraram que a ativação dos macrófagos pode também fazer com que estes acumulem a droga em seu interior, aumentando as chances de matar o parasito. Além disso, outros estudos com compostos contendo diamidinas mostram que esses não são entregues de forma suficiente para os amastigotas (CROFT & YARDLEY, 2002; SAXENA et al, 2007; HU, 2008).

Para os compostos do segundo grupo, a captação destes por promastigotas e amastigotas, pode não ter sido eficiente, influenciando diretamente na sua eficácia contra o parasito, que foi menor tanto para promastigotas quanto para amastigotas quando comparada à do primeiro grupo de compostos testados. Para o GSK343, que apresentou o maior efeito em amastigotas para este segundo grupo de compostos (% da inibição da infecção = 22), a expressão das enzimas-alvo (HDACs, LSD1 e PRMTs) pode ter sido maior, fazendo com que o composto fosse mais eficaz na infecção. Para os demais compostos do segundo grupo, pode ser que a da estrutura química destes esteja influenciando diretamente a sua menor eficácia contra promastigotas e amastigotas.

Mais estudos são necessários para que seja possível afirmar o porquê da diferente eficácia de todos os compostos testados em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*.

5.3 Ensaio de Toxicidade em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* M2904 e M2904-GFP para determinação de IC₅₀

Os ensaios de toxicidade em promastigotas foram realizados para os compostos eficazes contra o parasito após 48 horas. Esses compostos foram testados nas concentrações de: 80 µM, 40 µM, 30 µM, 15 µM, 10 µM, 5 µM, 2,5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,05 µM e 0,005 µM. Tanto estes quanto os controles (Anfotericina B e DMSO) foram testados em quadruplicata e pelo menos três experimentos independentes foram realizados, sendo a toxicidade avaliada pelo Método da Resazurina após 48 horas.

Dessa forma, o IC₅₀ (a concentração de cada composto capaz de inibir o crescimento dos parasitos em 50%) foi determinado para nove dos dez compostos eficazes contra promastigotas de *L. braziliensis*, como mostra a Tabela 4:

Tabela 4. IC₅₀ para promastigotas axênicos de *L. braziliensis* após 48 horas

Composto	IC₅₀ (µM)
BSF2E	>10
BSF2Em	14,07
BSSH	34,56
BSF2P	3,14
BSF13	12,40
BSF2	187,7 (?)
BSF2H	3,63
BSF38	16,02
BSF39	18,99

?: valor a ser confirmado.

Como se pode observar, para o BSF2E, o IC₅₀ foi maior que 10 µM. O programa utilizado para os cálculos do IC₅₀ de todos os compostos foi o GraphPad Prisma, através da regressão não-linear. As concentrações testadas não foram suficientes para que este programa calculasse um valor exato de IC₅₀ para o BSF2E. Talvez sejam necessários outros testes com concentrações maiores que 80 µM e concentrações intermediárias e até mesmo mais baixas que as utilizadas para que se possa determinar o IC₅₀ para este composto. O BSF2P e o BSF2H apresentaram os menores valores de IC₅₀, 3,14 µM e 3,63 µM, respectivamente, enquanto o BSSH foi o

composto que apresentou o maior valor de IC₅₀, 34,56 µM. Para o BSF2, um valor de IC₅₀ prévio foi encontrado (187,7 µM); novos testes serão feitos para a confirmação, pois os dados não foram conclusivos. Para o BSF13, BSF2Em, BSF38 e BSF39 o valor do IC₅₀ foi 12,40 µM, 14,07 µM, 16,02 µM e 18,99 µM, respectivamente. O IC₅₀ para o TH85 será determinado juntamente com os testes para confirmação do IC₅₀ para o BSF2, pois não foi possível concluir os experimentos para finalizar este dado.

Os IC₅₀ dos compostos na infecção foram determinados para o BSF2, BSF2E e TH85, uma vez que o efeito desses compostos em amastigotas foi o mais significativo. Sendo assim, os testes seguiram o protocolo de infecção descrito anteriormente, e a toxicidade dos compostos foi determinada após 48 horas. Os compostos foram testados nas seguintes concentrações: 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, 0,1 µM e 0,001 µM, e os resultados encontrados são apresentados na Tabela 5:

Tabela 5. IC₅₀ dos compostos para amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M2904-GFP após 48 horas.

Composto	IC₅₀ (µM)
BSF2	0,64
BSF2E	18,21
TH85	7,20

O BSF2 foi o composto com menor valor de IC₅₀, sendo este de 0,64 µM, ou seja na ordem de nmolar (640 nanomolar). O valor do IC₅₀ do TH85 foi de 7,20 µM e o BSF2E foi o composto com o maior IC₅₀ entre os compostos, 18,21 µM. Pelo menos mais um teste será feito para confirmação do IC₅₀ desses compostos e o IC₅₀ para o BSF2P também será determinado posteriormente.

O IC₅₀ reflete a eficácia de uma determinada droga, quanto maior o seu valor, menos eficaz a droga é; quanto menor o valor, maior a eficácia. Dessa forma, em promastigotas é possível observar que o BSF2P e BSF2H apresentaram os menores valores de IC₅₀, podendo ser considerados os compostos mais eficazes dentre os testados. O BSF38 e o BSF39 são estruturalmente semelhantes, sendo assim, a concentração desses compostos para inibir 50% do crescimento dos parasitos também foi semelhante. Para o BSF2E, o IC₅₀ tanto em promastigotas quanto em amastigotas foi maior que 10 µM, sugerindo uma eficácia semelhante sobre os dois estágios do parasito. O valor de IC₅₀ encontrado para o BSF2 na infecção de 0,64 µM é uma confirmação da sua eficácia, que ficou comprovada uma vez que ele foi capaz de inibir aproximadamente 95% da infecção por amastigotas.

O Índice de Seletividade (IS) é utilizado em ensaios de citotoxicidade para avaliar o quanto uma droga é mais eficaz contra determinado parasito sem causar danos à viabilidade de células mamíferos. Quanto maior o IS, mais seletiva é a droga sobre o parasito e menos efeito ela tem sobre as células de mamíferos (ENGEL et al, 2015). Segundo a Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), que é uma organização sem fins lucrativos que visa o desenvolvimento de novas drogas para doenças negligenciadas, incluindo as leishmanioses, um $IS > 10$ em um ensaio de infecção com *Leishmania*, valida determinado composto para testes in vivo (DNDi, 2009). O IS é calculado dividindo-se o IC_{50} do composto para células de mamíferos pelo IC_{50} do composto para o protozoário parasito:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ células de mamíferos}}{IC_{50} \text{ composto}}$$

Uma vez que a concentração de 10 μM do BSF2 não foi tóxica para os macrófagos após 48 horas, e o IC_{50} desse composto na infecção foi de 0,64 μM após esse mesmo tempo, um $IS > 15$ seria determinado para o BSF2, o que consequentemente, o valida para que sua ação seja testada em camundongos, uma próxima fase para testes com compostos prevista no A-ParaDDisE.

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, diferentes efeitos dos compostos testados em *L.braziliensis* e em macrófagos Raw 264.7 foram encontrados.

Em promastigotas, o BSF38 e BSF39 foram os compostos com maior efeito após 48 horas. Além disso, estes, juntamente com o BSF13, BSF2H e BSF2P foram capazes de manter o efeito em promastigotas mesmo após 72 horas. Para os compostos do segundo grupo, a eficácia de todos eles em promastigotas foi menor quando comparada à dos compostos do primeiro grupo. O Tranylcypromin, Namolin e CBB1007 foram os compostos mais eficazes deste grupo após 48 horas.

Em macrófagos, o efeito de quase todos os compostos do primeiro grupo foi mínimo ou inexistente. À exceção do BSF2P que inibiu a viabilidade dos macrófagos em aproximadamente 50% após 72 horas. Para o segundo grupo de compostos, o pouco efeito ou a sua ausência foram mantidos. Porém, quando comparado o efeito de ambos os grupos em macrófagos, os compostos do segundo grupo apresentaram um efeito na inibição da viabilidade celular ainda menor.

Em amastigotas, o BSF2, BSF2E, BSF2P e o TH85 foram os compostos mais eficazes na inibição da infecção para o primeiro grupo. Para o segundo grupo, o efeito dos compostos sobre o parasito foi mínimo ou inexistente. Entre todos os compostos testados, o BSF2 foi o composto mais eficaz em amastigotas, com uma capacidade de inibição da infecção de aproximadamente 95%.

Um total de 41 compostos foram testados, mas para a maioria deles, o seu efeito em *Leishmania* não foi significativo. Entretanto, um composto foi altamente eficaz contra as formas amastigotas do parasito, as quais, para a seleção de potenciais drogas contra as Leishmanioses, são os alvos de interesse. Sendo assim, o BSF2 é um alvo para posteriores testes visando a seleção de novas drogas contra a doença.

7. PERSPECTIVAS

Embora os alvos específicos dos compostos testados ainda não tenham sido identificados ou esclarecidos, a sua toxicidade para *Leishmania* deve ser levada em consideração e outros estudos podem ser feitos para se tentar elucidar e identificar esses possíveis alvos e os mecanismos biológicos envolvidos na sua toxicidade.

Para o BSF2, análises por Western blot empregando anticorpos anti-metil histonas podem ser feitas para investigar se esse composto inibe a metilação de histonas ou de proteínas, uma vez que seus potenciais alvos podem ser as PRMTs ou as LSD1.

Para o BSF2, TH85, BSF2P e BSF2E, que foram os compostos mais eficazes contra amastigotas intracelulares, análises de microscopia eletrônica e de citometria de fluxo para avaliação de ciclo celular podem ajudar a elucidar os mecanismos de ação desses compostos no parasito.

Para o BSF2P e TH85 é fundamental determinar o valor do IC₅₀ na infecção, bem como é também imprescindível determinar este valor para os macrófagos, uma vez que ambos IC₅₀ são necessários para o cálculo do IS, como discutido anteriormente.

Para o Tranylcypromin, Namolin e CBB1007, ensaios para avaliar o seu efeito em promastigotas em concentrações maiores que 10 µM também podem ser feitos. Concentrações maiores podem validar ou não esses compostos para posteriores testes, uma vez que são compostos comerciais.

Esse conjunto de ações e melhorias é de extrema importância na continuação deste trabalho e na contribuição para o A-ParaDDIsE.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERT, M., HELIN, K. Histone methyltransferases in cancer. **Semin Cell Dev Biol.**, v.21, n.2, p. 209-220, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=ALBERT+%26+HELIN%2C+2010>.

Acesso em: 09 jan 2016.

ALMEIDA, L.S.; SANTOS, J.B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **An Bras Dermatol**, v.86, n 3, p. 497-506, 2011. Disponível em:

<http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n3/en_v86n3a12.pdf>. Acesso em: 12 jan 2016.

ALONSO, V.L.; SERRA, E.C. Lysine Acetylation: Elucidating the Components of an Emerging Global Signaling Pathway in Trypanosomes. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.2012, p.1-16, 2012. Disponível

em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2012/452934/>>. Acesso em 14 jan 2016.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n.5, p. e35671, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22693548>>. Acesso em: 12 jan 2016.

ANAND, R.; MARMORSTEIN, R. Structure and Mechanism of Lysine-specific Demethylase Enzymes. **The journal of biological chemistry**, v. 282, n. 49, p. 35425–35429, 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/282/49/35425.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 jan 2016.

ANDREOLI, F.; DEL RIO, A. Computer-aided Molecular Design of Compounds Targeting Histone Modifying Enzymes. **Comput Struct Biotechnol J.**, v. 13, p. 358-365, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4459771/>>. Acesso em: 08 jan 2016.

ANDREOLI, F.; DEL RIO, A. Physicochemical modifications of histones and their impact on epigenomics. **Drug Discov Today**, 2014. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24853949>>. Acesso em: 14 jan 2016.

ANDREWS, K.; HAQUE, A.; JONES, M.K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunol Cell Biol**, v. 90, n.1, p. 66-77, 2012. Disponível em:

<<http://www.nature.com/icb/journal/v90/n1/full/icb201197a.html>>. Acesso em: 08 jan 2016.

ARAFA, R.K. et al. Synthesis, DNA Affinity, and Antiprotozoal Activity of Fused Ring Dicationic Compounds and Their Prodrugs. **J. Med. Chem**, v.48, n. 14, p. 5480-5488, 2005. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm058190h>>. Acesso em: 15 jan 2016.

AURRECOECHEA, C. et al. PlasmoDB: a functional genomic database for malaria parasites. **Nucleic Acids Res.**, v.37, Database issue, p. D539-43, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18957442>>. Acesso em: 11 jan 2016.

BALI, P. et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. **J Biol Chem**, v. 280, p. 26729-34, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15937340>>. Acesso em: 13 jan 2016.

BARNEDA-ZAHONERO, B.; PARRA, M. Histone deacetylases and cancer. **Molecular Oncology**, v.6, n.6, p. 579-589, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1574789112000750>>. Acesso em: 14 jan 2016.

BEDFORD, M.T. Arginine methylation at a glance. **Journal of Cell Science**, v.120, p. 4243-4246, 2007. Disponível em: < <http://jcs.biologists.org/content/120/24/4243>>. Acesso em: 13 jan 2016.

BOSE, P.; DAI, Y.; GRANT, S. Histone deacetylase inhibitor (HDACI) mechanisms of action: emerging insights. **Pharmacol Ther**, v. 143, n. 3, p. 323-336, 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24769080>>. Acesso em: 9 jan 2016.

CANZONERI, J.C.; CHEN, Po. C.; OYELERE, A.K. Design and synthesis of novel histone deacetylase inhibitor derived from nuclear localization signal peptide. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 19, n.23, p. 6588-6590, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19854643>>. Acesso em: 11 jan 2016.

CARVALHO, L.P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front Immunol**, v. 3, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3463898/>>. Acesso em: 11 jan 2016.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews Microbiology**, v. 5, n.11, p. 873-882. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17938629>>. Acesso em: 13 jan 2016.

CLOCCHIATTI, A.; FLOREAN, C.; BRANCOLINI, C. Class IIa HDACs: from important roles in differentiation to possible implications in tumourigenesis. **J Cell Mol Med**, v. 15, n. 9, 2011. Disponível: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1582-4934.2011.01321.x/abstract;jsessionid=F87B03670D52FC29830473792140B10B.f02t01>>. Acesso em: 09 jan 2016.

CROFT, S.L.; YARDLEY, V. Chemotherapy of Leishmaniasis. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p. 319-342, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860369>>. Acesso em: 14 jan 2016.

CULHANE, J.C. et al. Comparative Analysis of Small Molecules and Histone Substrate Analogues as LSD1 Lysine Demethylase Inhibitors. **J. Am. Chem. Soc**, v. 132, n.9, p. 3164-3176, 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20148560>>. Acesso em: 15 jan 2016.

DARKIN-RATTRAY, S. J. et al. Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, n.23, p.13143–13147, 1996.

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC24060/>>. Acesso em: 15 jan 2016.

DE SOUZA, E.M. et al. Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 593–600. Disponível em: <http://www.immtechpharma.com/downloads/Sci_Lib_7_de_Souza_et_al_2004.p>. Acesso em: 15 jan 2016.

DHALLUIN, C. et al. Structure and ligand of a histone acetyltransferase bromodomain. **Nature**, v. 399, n. 6735, p. 491-496, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10365964>>. Acesso em: 09 jan 2016.

DNDi. Drug Screening for Kinetoplastids Diseases. A Training Manual for Screening in Neglected Diseases, 2009. Disponível em: <http://www.dndi.org/images/stories/pdf_scientific_pub/2009/kinetoplastid_drug_screening_manual_final.pdf>. Acesso em: 04 fev 2016.

DOWDEN, J. et al. Toward the development of potent and selective bisubstrate inhibitors of protein arginine methyltransferases. **Bioorg Med Chem Lett.**, v. 20, n.7, p. 2103-2105, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20219369>>. Acesso em: 08 jan 2016.

ENGEL, J.A. et al. Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against *Plasmodium* and *Trypanosoma* parasites. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v.5, n.6, p. 117-126, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211320715000123>>. Acesso em: 09 jan 2016.

FERREIRA, T.R. Altered expression of an RBP-associated arginine methyltransferase 7 in *Leishmania major* affects parasite infection. **Mol Microbiol**, v. 94, n. 5, p. 1085–1102, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111111>>. Acesso em: 15 jan 2016.

FIRMINO, R. C. **Clonagem das regiões codificadoras das histonas deacetilases 1 e 3 de *Leishmania braziliensis***. Trabalho de Conclusão de Curso. Viçosa, 2015.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Exposure of phosphatidylserine on *Leishmania amazonensis* isolates is associated with diffuse cutaneous leishmaniasis and parasite infectivity. **PLoS One**, v. 7, n.5, p.e36595, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3344919/>> Acesso em: 25 março 2016.

GLOZAK, M.A. et al. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. **Gene**, v. 363, p. 15-23, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16289629>>. Acesso em: 14 jan 2016.

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. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1586/eri.10.19>>. Acesso em: 06 jan 2016.

GOTO, H.; LINDOSO, L.J.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am.**, v. 26, n.2, p. 293-307, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22632640>>. Acesso em: 12 jan 2016.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n.2, p. 309-322, 2012. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0891552012000141/1-s2.0-S0891552012000141-main.pdf?_tid=3ffaf31e-b4e5-11e5-9619-00000aacb362&acdnat=1452133421_55f14c5812f93d950276b37e71664ff0>. Acesso em: 09 jan 2016.

GROZINGER, C.M.; SCHREIBER, S.L. Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. **Chem Biol**, v.9, n.1, p. 3-16, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=GROZINGER+%26+SCHREIBER%2C+2002>>. Acesso em: 22 jan 10 jan 2016.

GU, W.; ROEDER, R.G. Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. **Cell**, v.90, n.4, p.595-606, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9288740>>. Acesso em: 13 jan 2016.

GUPTA, G., OGHMU, S., SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Adv Appl Microbiol**, v. 82, p. 155-184, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3697132/>>. Acesso em: 06 jan 2016.

HA, M. Understanding the chromatin remodeling code. **Plan Sci**, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23987819>>. Acesso em: 14 jan 2016.

HABERLAND, M.; MONTGOMERY, L. R.; OLSON, E.N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat Rev Genet.**, v. 10, n. 1, p. 32-42, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19065135>>. Acesso em: 09 jan 2016.

HANDLER, M.Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**, v. 73, n.6, p.897-908, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26568335>>. Acesso em: 06 jan 2016.

HU, L. et al. Azaterphenyl diamidines as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.18,n.1, p. 247-251, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006310>>. Acesso em: 15 jan 2016.

IMHOF,A. et al. Acetylation of generaltranscription factors by histone acetyltransferases. **Curr Biol**, v.7, p. 689-92, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9285713>>. Acesso em: 14 jan 2016.

INGRAM, A.K.; HORN, D. Histone deacetylases in Trypanosoma brucei: two are essential and another is required for normal cell cycle progression. **Mol Microbiol**, v.45, n.1, 2002. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2958.2002.03018.x/abstract>>. Acesso em: 08 jan 2016.

JAIN, K.; JAIN, N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **J Immunol Methods**, v.422, p. 1-12, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25858230>>. Acesso em: 06 jan 2016.

KAYE, P.; SCOT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, v. 9, n.8, p. 604-15, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747391>>. Acesso em: 12 jan 2016.

KELLY, J.M. et al. Inhibitors of human histone deacetylase with potent activity against the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 22, n.5, p. 1886-1890, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314994/>>. Acesso em: 17 jan 2016.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World Leishmania Infections. A Practical Review. **Dermatol Clin.**, v.33, n.3, p. 579-93, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143433>>. Acesso em: 07 jan 2016.

KOUZARIDES, T. Chromatin Modifications and Their Function Tony Kouzarides. **Cell**, v.128, n.4, p. 693-705, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17320507>>. Acesso em: 16 jan 2016.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS**, Belém, Pará, Brasil, 2010. Disponível em: <http://scielo.iec.pa.gov.br/scielo.php?pid=s2176-62232010000200002&script=sci_arttext>. Acesso em: 12 jan 2016.

LANCELOT, J. et al. Schistosoma mansoni Sirtuins: Characterization and Potential as Chemotherapeutic Targets. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n. 9, p. e2428, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002428>>. Acesso em: 15 jan 2016.

LIAO, D. Profiling technologies for the identification and characterization of small-molecule histone deacetylase inhibitors. **Drug Discovery Today:Technologies**, v. 18, p.24-28, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1740674915000499>>. Acesso em: 15 jan 2016.

LUPI, O. et al. Tropical dermatology: tropical diseases caused by protozoa. **J Am Acad Dermatol**, v. 60, n.6, p. 897-925. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467364>>. Acesso em: 12 jan 2016.

MAREK, M. et al. Structural Basis for the Inhibition of Histone Deacetylase 8 (HDAC8), a Key Epigenetic Player in the Blood Fluke *Schistosoma mansoni*. **PLOS Pathogens**, v 9, n. 9, p. e1003645, 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.100364>>. Acesso em: 14 jan 2016.

MARIADASON, J.M. HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. **Epigenetics**, v.3, n.1, p. 28-37, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.4161/epi.3.1.5736>>. Acesso em: 12 jan 2016.

MENDITI, K.B.C.; KANG, H.C. O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.4, p. 453-460, 2007. Disponível em: http://www.inca.gov.br/rbc/n_53/v04/pdf/revisao2.pdf>. Acesso em: 16 jan 2016.

Methyltransferase 1. **J Med Chem.**, v. 57, n.6, p. 2611-2622, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24564570>>. Acesso em: 14 jan 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013**, 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>>. Acesso em: 12 jan 2016.

MOAL, V. Liévin-Le.; LOISEAUL, P.M. Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments. **Febs J**, Epub ahead of print, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Leishmania+hijacking+of+the+macrophage+intracellular+compartments>>. Acesso em: 11 jan 2016.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Trop Parasitol**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3992802/?report=classic>> Acesso em: 06 jan 2016.

MOULD, D.P. et al. Reversible Inhibitors of LSD1 as Therapeutic Agents in Acute Myeloid Leukemia: Clinical Significance and Progress to Date. **Med Res Rev**, v.35, n.3, p.586-618, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25418875>>. Acesso em: 12 jan 2016.

MURR, R. Interplay Between Different Epigenetic Modifications and Mechanisms. **Adv Genet**, v. 70, p. 101-141, 2010. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123808660600058>>. Acesso em: 18 jan 2016.

NEBBIOSOA, A. et al. Trials with ‘epigenetic’ drugs: An update. **Mol Oncol**, v. 6, p. 657-682, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103179>>. Acesso em: 14 jan 2016.

OWEN, D.J. et al. The structural basis for the recognition of acetylated histone H4 by the bromodomain of histone acetyltransferase Gcn5p. **Embo J**, v.19, n. 22, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC305837/>>. Acesso em: 18 jan 2016.

PACE, D. Leishmaniasis. **J Infect**, v. 69, s. 1, p. S10-S18, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238669>>. Acesso em: 12 jan 2016.

RAJALAKSHMI, R.; CHEN, YI-PING. P. Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, v.20, n 8,

p. 958–968, 2015. Disponível em:
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644615001555>>. Acesso em: 06 jan 2016.

RATH, S et al . Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 26, n. 4, p. 550-555, Aug. 2003 . Disponível em:
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422003000400018&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 27 abril 2016.

REICHERT, N.; CHOUKRALLAH, M.A.; MATTHIAS, P. Multiple roles of class I HDACs in proliferation, differentiation and development. **Cell Mol Life Sci.**, v. 69, n.13, p. 2173-2187, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286122>>. Acesso em: 10 jan 2016.

RIVERA, C. et al. Histone lysine methylation and chromatin replication. **Biochim Biophys**, v. 1839, n.12, p.1433-9, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24686120>>. Acesso em: 16 jan 2016.

ROTHBART, S.B.; STRAHL, B;D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. **Biochim Biophys Acta**, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24631868>>. Acesso em: 14 jan 2016.

RUIJTER, A.J. et al. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. **Biochem J.**, v. 370, n. Pt 3, p. 737-749, 2003. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429021>>. Acesso em: 15 jan 2016.

SACKS, D.L; MELBY,P.C. Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. **Curr Protoc Immunol**, v.108, n.2, p. 1-24, 2015. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25640990>> Acesso em: 25 março 2016.

SAXENA, A. et al. Analysis of the Leishmania donovani transcriptome reveals an ordered progression of transient and permanent changes in gene expression during differentiation. **Mol Biochem Parasitol**, v. 152, n.1, p. 53-65, 2007. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17204342>>. Acesso em: 10 jan 2016.

SCHMITT, M.L. et al. Non-peptidic propargylamines as inhibitors of lysine specific demethylase 1 (LSD1) with cellular activity. **Med Chem**, v. 56, n.18, p. 7334-7342, 2013. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24007511>>. Disponível em: 15 jan 2016.

SINGH,N.; KUMAR , M.; SINGH, R.K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pac J Trop Med**, v. 5, n. 6, p. 485-97, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575984>>. Acesso em: 06 jan 2016.

SPANNHOFF,A.; SIPPL, W.; JUNG, M. Cancer treatment of the future: Inhibitors of histone methyltransferases. **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n.1, p. 4-11, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18773966>>. Acesso em: 14 jan 2016.

- STERNER, D.E.; BERGER, S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* v. 64, n.2, p. 435–459, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10839822>>. Acesso em: 14 jan 2016.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 7, n.6, p. e2278, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688540/>>. Acesso em: 06 jan 2016.
- STRAHL, B.; ALLIS, D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, v.403, n. 6765, p. 41-5. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638745>>. Acesso em: 14 jan 2016.
- STRAZZULLA, A. et al. Mucosal Leishmaniasis: An Underestimated Presentation of a Neglected Disease. *Bio Med Research International*, v.2013, 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/805108/>>. Acesso em: 11 jan 2016.
- SWYGERT, S., PETERSON, C.L. Chromatin dynamics: Interplay between remodeling enzymes and histone modifications. *Biochim Biophys Acta*, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24583555>>. Acesso em: 16 jan 2016.
- TANG, J.; YAN, H.; ZHUANG, S. Histone deacetylases as targets for treatment of multiple diseases. *Clin Sci (Lond)*, v. 124, n. 11, p. 651-662, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568123/>>. Acesso em: 18 jan 2016.
- TAVARES, J. et al. The Leishmania infantum cytosolic SIR2-related protein 1 (LiSIR2RP1) is an NAD⁺-dependent deacetylase and ADP-ribosyltransferase. *Biochem J.*, v. 415, n. 3, p. 377-386, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598238>>. Acesso em: 15 jan 2016.
- TROPBERGER, P.; SCHNEIDER, R. Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol.*, v. 20, n.6, p. 657-661, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23739170>>. Acesso em: 08 jan 2016.
- VELASQUEZ, L.G. ET AL. Distinct courses of infection with Leishmania (L.) amazonensis are observed in BALB/c, BALB/c nude and C57BL/6 mice. *Parasitology*. V. 143, n. 6, p.692-703. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=10291771&fileId=S003118201600024X>> Acesso em: 25 março 2016.
- WAGNER, F. et al. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. *Neurotherapeutics*, v.10, n.4, p. 589–604, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805861/>>. Acesso em: 15 jan 2016.
- WANG, Q. et al. Targeting Lysine Deacetylases (KDACS) in Parasites. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 9, n.9, p. e0004026, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26402733>>. Acesso em: 15 jan 2016.
- WILSON, W.D. et al. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie*, v. 90, n.7, p. 999-1014, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18343228>>. Acesso em: 15 jan 2016.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION, Neglected tropical diseases. **Geneva: World Health Organization, 2015.** Disponível em:

<http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/>. Acesso em: 06 jan 2016.

WORLD AND HEALTH ORGANIZATION. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012. **Geneva: World Health Organization, 2013.** Disponível em:

<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_CL.png?ua=1>. Acesso em: 12 jan 2016.

YAN, L. et al. Diamidine Compounds for Selective Inhibition of Protein Arginine

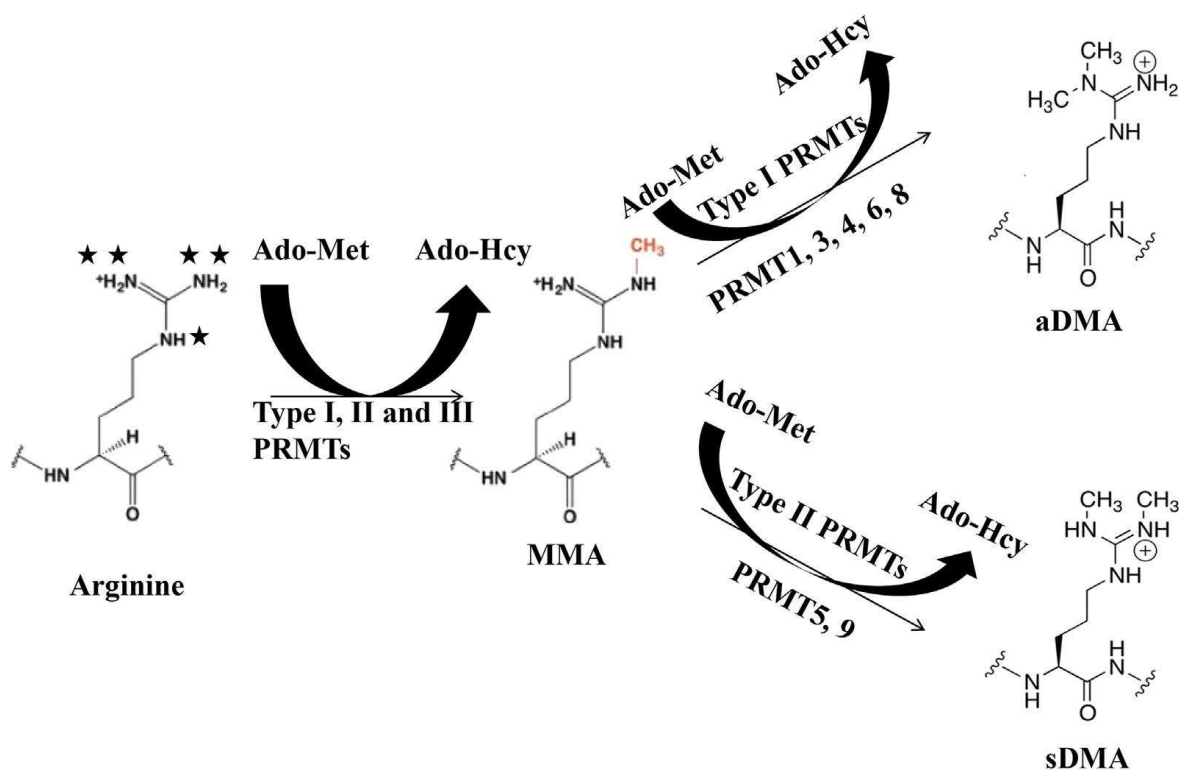
YE, J. Improving Insulin Sensitivity With HDAC Inhibitor. **Diabetes**, v.62, n.3, p. 685–687, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3581218/>>. Acesso em: 14 jan 2016.

ZENTNER, G.E.; HENIKOFF, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 20, n.3, p. 259-266, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23463310>>. Acesso em: 08 jan 2016.

ZHANG, J.; ZHONG, Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. **Cell Mol Life Sci**, v.71, n.20, p. 3885-3901, 2014. Disponível em:

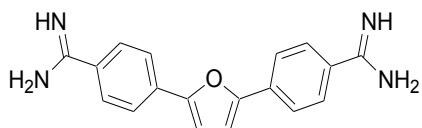
<<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00018-014-1656-6#page-1>>. Acesso em: 09 jan 2016.

9. ANEXO 1. Metilação dos resíduos de arginina pelas PRMTs. A arginina contém cinco potenciais locais para ligações de hidrogênio. As PRMTs transferem um grupo metil para esses locais a partir do S-adenosilmetionina (AdoMet), resultando em S-adenosilhomocisteína (Adohcy) e metilarginina. Essa reação origina monometilargininas (MMA); deimetilargininas assimétricas (aDMA) e dimetilargininas simétricas (sDMA). (Jahan & Davie, 2015).

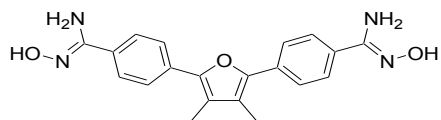


10. ANEXO 2. Estruturas químicas dos compostos inibidores de HMEs do primeiro grupo, da Furamidina e Pentamidina.

BSF1 (Furamidina)



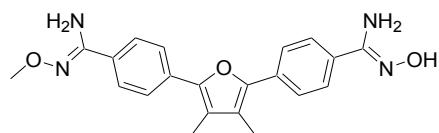
BSF2H



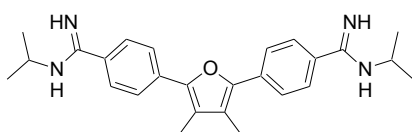
BSF2



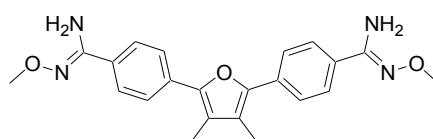
BSF2Em



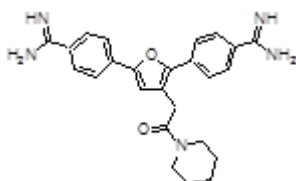
BSF2P



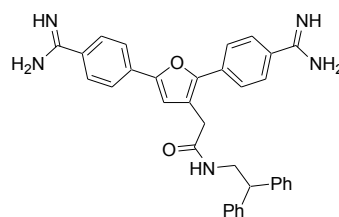
BSF2E



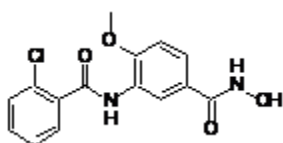
BSF13



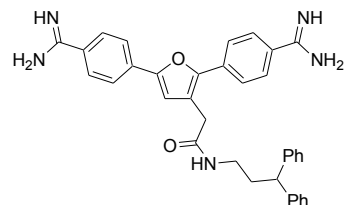
BSF38



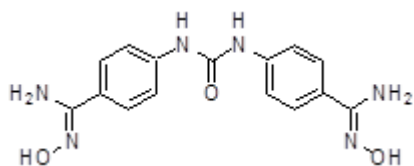
TH85



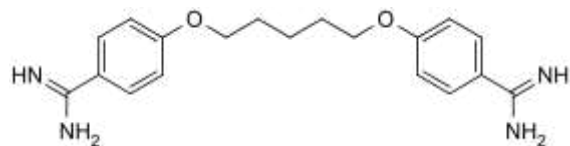
BSF39



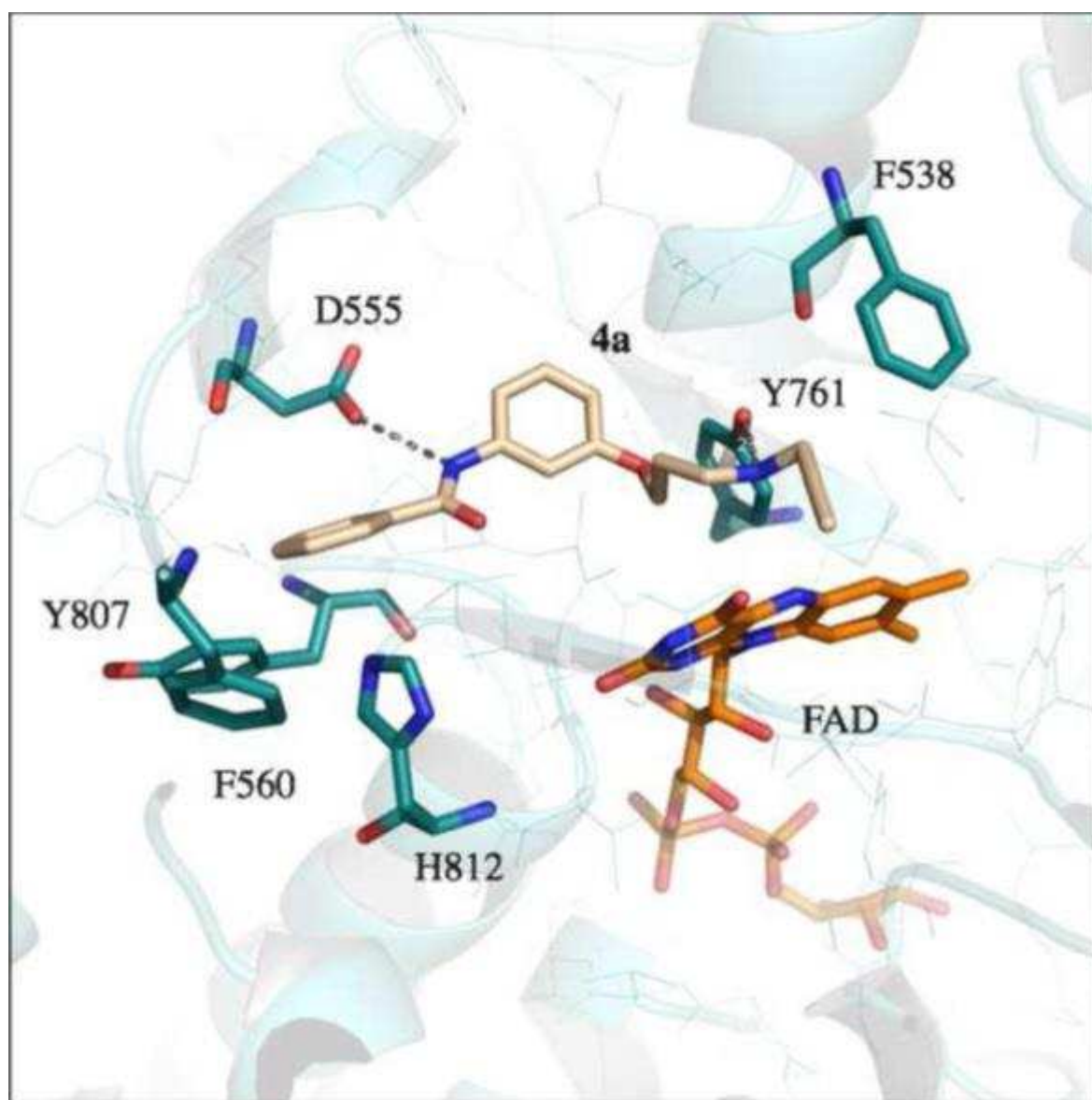
BSHH



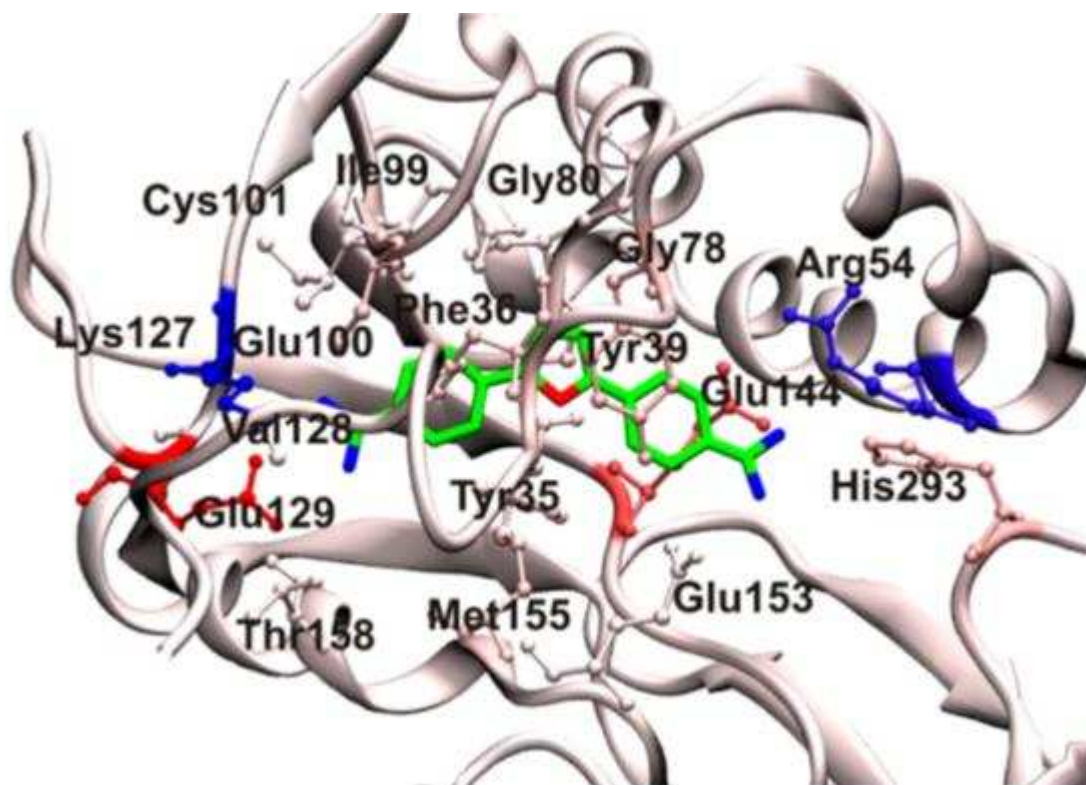
Pentamidina



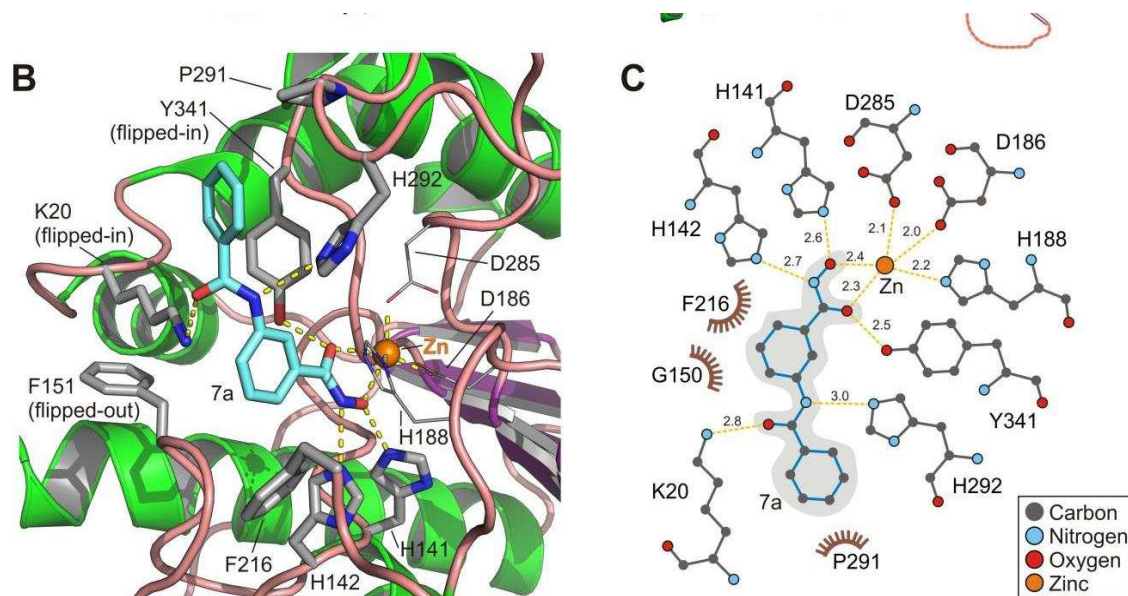
11. ANEXO 3. Exemplo de inibição de LSD1. O co-fator FAD está representado pela cor laranja e interage com os resíduos de aminoácido que estão coloridos de verde. As ligações de hidrogênio são mostradas pelas linhas pontilhadas. (Schmitt et al, 2015).



12. ANEXO 4. Modelo de inibição da PRMT1 por composto contendo diamidinas. Os resíduos de aminoácidos em azul apresentam contribuição positiva para ligação ao Inibidor, enquanto aqueles em vermelho apresentam contribuição negativa. (Yan et al, 2014).



13. ANEXO 5. Inibição da smHDAC8 por um inibidor de HDAC contendo hidroxamato. São mostradas as ligações do Inibidor com os resíduos de aminoácidos chave para a Inibição: His141, His 142 e Y341. As ligações de hidrogênio são mostradas pelas linhas alaranjadas pontilhadas (Marek et al, 2013).



14. ANEXO 6. Inibidores de HMEs testados comercialmente disponíveis.

Compound	Target	Molecular weight	CAS-No.	PubChem ID
Vorinostat	HDAC	364.32	149647-78-9	CID 5311
Bromosporine	Bromodomains	404.44	1619994-69-2	CID 72943187
SGC-CBP30	Bromodomains	509.04	/	CID 72201027
JQ1	Bromodomains	456.99	1268524-70-4	CID 46907787
C646	HAT	445.42	328968-36-1	CID 1285941
Curcumin	HAT/LSD1	368.38	458-37-7	CID 969516
Tranilcypromin	LSD1	133.19	155-09-9	CID 5530
Namolin	LSD1	293.58	/	CID 715694
CBB1007	LSD1	534.6	379573-92-8	CID 72199289
SGC0946	Dot1L	618.57	/	CID 71729976
GSK343	EZH2	541.69	1346704-33-3	CID 71268957
PFI-2	Set7/9	535.98	/	CID 71300326