

LOURDES FANNY APAZA CALLA

**BUSCA DE INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES COM ATIVIDADE
LEISHMANICIDA NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania
braziliensis***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

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

T

A639b
2018 Apaza Calla, Lourdes Fanny, 1978-
Busca de inibidores de histonas deacetilases com atividade
leishmanicida na infecção de macrófagos por leishmania
braziliensis / Lourdes Fanny Apaza Calla. – Viçosa, MG, 2018.
ix, 59f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Juliana Lopes Rangel Fietto.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.51-56.

1. Leishmaniose. 2. Infecção. 3. Epigenética.

I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica
e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Biologia
Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22 ed. 616.9364

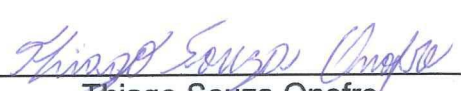
LOURDES FANNY APAZA CALLA

**BUSCA DE INIBIDORES DE HISTONAS DEACETILASES COM ATIVIDADE
LEISHMANICIDA NA INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania
braziliensis***

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2018.


Eduardo de Almeida Marques da Silva


Thiago Souza Onofre


Juliana Lopes Rangel Fietto
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por dar-me a oportunidade de chegar até aqui, e completar mais uma etapa da minha vida.

Agradeço à professora Juliana Rangel Fietto, por ter me orientado no mestrado e por sua dedicação, paciência e conhecimentos.

Luciana Ângelo de Souza, minha co-orientadora, que os ensinamentos e conhecimentos foram fundamentais para este trabalho acontecer.

Agradeço a meus professores e colegas do laboratório, pelo incentivo, pela ajuda e por contribuírem com meu crescimento acadêmico e pessoal. E a todos meus amigos, pelo incentivo, e por me ajudarem nos momentos que mais precisei. E a Dayse pela ajuda na preparação dos materiais.

A meu pai Heraclio e a minha mãe Agripina e meus irmãos Enoch e família e Gelmer, pelo apoio e por estarem presentes em todos os momentos da minha vida acadêmica,

À Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade da formação.

A Beth, secretária do programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, por sua disponibilidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Aos professores participantes da minha banca avaliadora pela disponibilidade em participar da avaliação deste projeto. Sinto-me honrada em ter profissionais como vocês participando deste momento tão especial.

Agradeço ao Wolfgang Sippl, pelos compostos enviados para que fossem testados

A todos o meu muito obrigada

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmaniose	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Leishmaniose Tegumentar	4
2.2. Ciclo de Vida	8
2.3. Tratamento	10
2.3.1. Antimoniais Pentavalentes	10
2.3.2. Pentamidina	11
2.3.3. Anfotericina B	11
2.3.4. Paromomicina	11
2.3.5. Miltefosina	12
2.5. Modificações das histonas	13
2.6. Inibidores HDAC	17
2.6.1. Ácidos graxos de cadeia curta	19
2.6.2. Benzamidas	20
2.6.3. Peptídios cíclicos	20
2.6.4. Ácidos hidroxâmicos	20
2.7. Atividade antiparasítica de inibidores de HDAC	24
2.8. O Consórcio A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics)	26
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo geral	27
3.2. Objetivos específicos	27

4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Células de macrófagos da linhagem Raw.264.7	28
4.2. Meio de cultivo das células de macrófagos Raw.264.7	28
4.3. Manutenção dos macrófagos Raw.264.....	28
4.4. <i>L. braziliensis</i> cepa M2904.....	29
4.5. Meio de cultivo de <i>L. braziliensis</i> cepa M2904 WT.	29
4.6. Manutenção de <i>L. braziliensis</i> cepa M2904	29
4.7. Curva de crescimento dos parasitos.....	30
4.8. Avaliação da ação dos compostos.....	31
4.9. Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos Raw. 264.7.....	31
4.10. Ensaio de infecção <i>in vitro</i> e teste de toxicidade em amastigotas de <i>L. braziliensis</i> M2904	32
4.11. Análise dos dados.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Curva de Crescimento de <i>L. braziliensis</i> M2904.....	34
5.2. Teste de toxicidade dos compostos em células de macrófagos. Raw 264.7	35
5.3. Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>L. braziliensis</i> M294 em infecção de macrófagos Raw 264.7.....	41
6. CONCLUSÕES.....	50
7. BIBLIOGRAFIA.....	51
ANEXO 1	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Status endêmico da Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015....	4
Figura 2 - Manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar e Leishmaniose mucocutânea	7
Figura 3 - Ciclo de vida do parasito.....	9.
Figura 4 - Reação reversível de acetilação controlada por HATs e HDACs	16
Figura 5 - Estrutura de cristal de raios X da proteína de histona desacetilase bacteriana ligada ao inibidor de HDAC	19
Figura 6 - Estrutura do SAHA.....	21
Figura 7 - Exemplos de Estrutura de Ácidos Hidroxamicos inibidores de HADACs	22
Figura 8 - Estrutura composto 13 e tubacina	23
Figura 9 - Estrutura do composto 14	24
Figura 10 - Curva de crescimento in vitro de <i>L. braziliensis</i> em meio líquido...35	
Figura 11 - Teste de compostos EGs nos macrófagos Raw. 264.7	37
Figura 12 - Teste de compostos EGs, ATb2 nos macrófagos Raw. 264.7.....	38
Figura 13 - Teste de compostos THS, nhs nos macrófagos Raw. 264.7	39
Figura 14 - Macrófagos com compostos EGs e Teste t de Student não pareado bicaudal	40
Figura 15 - Macrófagos com pompostos ATb2, THs, NHs e Teste t de Student não pareado bicaudal	41
Figura 16 - Infecção de macrófagos com <i>L. Braziliensis</i> e tratados com compostos EGs.....	43
Figura 17 - Infecção de macrófagos com <i>L. Braziliensis</i> e tratados com compostos ATb2, THs, NHs.....	45
Figura 18 - Comparativo da ação dos compostos EGs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de <i>L. braziliensis</i> M2904	49
Figura 19 - Comparativo da ação dos compostos ATb2, THs e NHs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de <i>L. braziliensis</i> M2904	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Famílias de HATs, seus membros e as modificações relacionadas	15
Tabela 2 - Famílias, clases, membros e localização dos HDACs	17
Tabela 3 - Estrutura química dos compostos EG10, EG13, EG11	41
Tabela 4 - Estrutura química dos compostos EG3, EG5 e EG21	43
Tabela 5 - Estrutura química dos compostos ATb2	45
Tabela 6 - Estrutura química dos compostos THs	46
Tabela 7 - Estrutura química dos compostos NHs	47

RESUMO

APAZA, Lourdes Fanny Calla, Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2018. **Busca de inibidores de histonas deacetilases com atividade leishmanicida na infecção de macrófagos por *Leishmania braziliensis*.** Orientadora: Juliana Lopes Rangel Fietto. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan, Tiago Antonio de Oliveira Mendes, Raphael de Souza Vasconcellos e Luciana Ângelo de Souza.

A leishmaniose refere-se a um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. A espécie *Leishmania braziliensis* é a principal responsável pela Leishmaniose Tegumentar no Novo Mundo, sendo o Brasil o país com a maior incidência da doença na América do Sul. A maioria das drogas leishmanicidas disponíveis são tóxicas, têm problemas de resistência pelos parasitos ou necessitam de hospitalização para a sua utilização; portanto, o desenvolvimento de novos medicamentos é urgente. Uma alternativa para novas terapias são fármacos que atuam a nível epigenético, como inibidores de histonas desacetilases (HDACs). Inibidores de HDACs (iHDACs) são conhecidos por apresentarem atividades antiproliferativas, anti-inflamatórias e antiparasitárias. Neste trabalho foram testados iHDACs pertencentes à classe dos ácidos hidroxâmicos produzidos pelo consórcio Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics (A-ParaDDisE). Os compostos foram primeiramente testados em relação aos seus efeitos tóxicos em células hospedeiras de macrófagos da linhagem Raw 264.7. Os compostos que não apresentaram efeito tóxico foram testados em infecção de macrófagos contendo amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Foram testados 41 compostos, 22 do grupo do EGs, 9 THs, 6 ATb2, 4 NHs. Os resultados mostraram que os compostos EG10, EG11, EG13 foram considerados tóxicos para macrófagos, e os compostos EG3, EG5, EG21, ATb210, TH136, TH142, TH135 e NH5 apresentaram ação leishmanicida de pelo menos 50% sobre amastigotas intracelulares. O composto com maior atividade foi o ATb210 que apresentou atividade similar à ação da droga controle positivo Anfotericina B (pelo menos 80% de ação leishmanicida). Sendo assim, podemos concluir que

foi possível selecionar 28 compostos com atividade leishmanicidas sobre a infecção *in vitro* de macrófagos por *L. braziliensis*

ABSTRACT

APAZA, Lourdes Fanny Calla, Universidade Federal de Viçosa, February, 2018. **Search for inhibitors of histone deacetylases with leishmanicide activity against *leishmania braziliensis* at the macrophage infection.** Adviser: Juliana Lopes Rangel Fietto. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan, Tiago Antonio de Oliveira Mendes, Raphael de Souza Vasconcellos and Luciana Ângelo de Souza.

Leishmaniasis refers to a group of diseases caused by obligate intracellular protozoan parasites of the genus *Leishmania*. Cutaneous leishmaniasis is a public health problem in 85 countries, distributed across four continents (Americas, Europe, Africa and Asia) and an annual record of 0.7 to 1.3 million new cases. *Leishmania braziliensis* is the main species responsible for Cutaneous Leishmaniasis in the New World, Brazil being the country with the highest incidence of the disease in South America. Most of the available leishmanicidal drugs are highly toxic, have resistance problems by the parasites or require hospitalization for their use, so the development of new drugs is urgent. An alternative to new therapies are epigenetic drugs, such as those acting on histone-modifying enzymes like histone deacetylases (HDACs). Inhibitors of HDACs (iHDACs) are endowed with a multitude of biological functions, including antiproliferative, anti-inflammatory and antiparasitic activities. In this work, iHDACs belonging to the class of hydroxamic acids sent by the consortium Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics (A-ParaDDisE) were tested. The compounds were first tested for their toxic effects on macrophage host cells Raw 264.7. Compounds which showed no toxic effect were tested on macrophage infection containing intracellular amastigotes of *L. braziliensis*. In total, 41 compounds were tested, 22 from the EG group, 9 THs, 6 ATb2, 4 NHs. The results showed that compounds EG10, EG11, EG13 were considered to be toxic to macrophages, and compounds EG3, EG5, EG21, ATb210, TH136, TH142, TH135 and NH5 had equal or above 50% significant leishmanicidal effects for intracellular amastigotes, and the compound ATb210 presented similar activity to the action of the positive control drug of Amphotericin B (more than 80% leishmanicidal activity). Thus, we can conclude that it was possible to select 28 compounds with leishmanicidal activity on the in vitro infection of macrophages by *L. braziliensis*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose

O termo leishmaniose refere-se a um grupo de doenças transmitidas por vetores causadas por parasitas protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, pertencentes à família *Trypanosomatidae*, ordem Kinetoplastida (ELMAHALLAWY et al, 2014).

A leishmaniose tegumentar (LT) constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e a capacidade de produzir deformidades. (BRASIL, 2017)

A transmissão natural do parasito ocorre principalmente por intermedio da picada de fêmeas infectadas do gênero *Phlebotomus* do Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. (ELMAHALLAWY et al, 2014). Mamíferos, como roedores, edentados, marsupiais, canídeos, primatas não humanos e também humanos, foram incriminados como possíveis reservatórios de *Leishmania* em diferentes regiões do mundo, dependendo do contexto eco-epidemiológico (FERNÁNDEZ et al., 2018).

Existem pelo menos 14 espécies patogênicas de *Leishmania* distribuídas nas Américas, e reconhecidas como parasitos de importância médica. Estas se encontram incluídas nos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). As espécies reconhecidas até então associadas com doença em humanos que pertencem ao subgênero *Leishmania* são: *L.(L) mexicana*, *L.(L) amazonensis*, *L.(L) venezuelensis*, *L.(L) chagasi* e *L.(L) major símile*. Dentre este grupo *L.(L) infantum chagasi* se destaca como principal responsável pela leishmaniose visceral. As espécies que pertencem ao subgênero *Viannia* são: *L.(V) braziliensis*, *L.(V) peruviana*, *L.(V) guyanensis*, *L.(V) panamensis*, *L.(V) lainsoni*, *L.(V) naiffi*, *L.(V) colombiensis* e *L.(V) shawi*, sendo que *L.(V) braziliensis* é uma das principais espécies causadora de leishmaniose tegumentar americana (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A leishmaniose pode se manifestar clinicamente nas formas do tipo tegumentar com lesões ulcerativas únicas ou múltiplas ao longo da epiderme

(forma cutânea), podendo afetar ou não as mucosas (formas mucocutânea e forma mucosa), ou ainda sob a forma disseminada com lesões múltiplas não ulcerativas. Já a forma visceral compromete principalmente órgãos como o fígado e o baço. As manifestações clínicas e o curso da infecção dependem tanto de fatores relacionados ao protozoário, como a espécie de *Leishmania* envolvida, de características genótípicas e de sua patogenicidade; quanto a fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro, como o sistema imunológico e estado nutricional (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007).

As drogas utilizadas no tratamento das Leishmanioses são poucas, apresentam toxicidade que incluem diversos efeitos colaterais o que pode levar os pacientes a abandonarem o tratamento, e conseqüentemente gerarem linhagens de *Leishmanias* resistentes. Ademais, o custo alto dos compostos torna o tratamento muitas vezes inviável (SINGH; SIVAKUMAR, 2004). O tratamento combinado para a terapia de leishmaniose visceral tem sido indicado como uma forma de aumentar a eficácia e a tolerância do paciente ao tratamento, com finalidade de reduzir a duração e o custo e limitar o surgimento de resistência à droga (GRIENSVEN et al, 2010).

Assim, existe ainda a necessidade de se intensificar os programas de pesquisa em leishmaniose para melhoria das estratégias de controle, o que inclui melhorias nas formas terapêuticas para redução da incidência, morbidade e mortalidade desta doença.

Drogas epigenéticas têm o potencial de ser uma terapia muito eficaz contra uma série de doenças, especialmente em câncer. Originalmente alvejadas para o uso no câncer, estão sendo também investigadas para redirecionar seus usos para doenças parasitárias (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012).

Entre muitos fármacos contra o câncer denominados coletivamente "terapias direcionadas ou moleculares" as drogas epigenéticas são claramente promissoras. Diferentemente de outros agentes que visam um único produto genético, os fármacos epigenéticos têm a cromatina como alvo por meio da inibição de enzimas como histonas deacetilases (HDACs) e metiltransferases de DNA (DNMTs) (GONZALEZ et al, 2008).

O potencial dos inibidores de HDAC como agentes antiparasitários foi visto pela primeira vez a cerca de uma década atrás, quando o tetrapeptídeo cíclico apicidina se mostrou com atividade antiparasitária de amplo espectro.

Desde então, um número crescente de estudos se concentrou na atividade antiparasitária dos inibidores de HDAC de várias classes estruturais, destacando o potencial desses quimiotipos para a intervenção antiparasitária (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012).

Foi identificada uma vasta gama de estruturas que são capazes de inibir a atividade de diferentes classes de HDAC, como as classes 1, classe 2 e classe 4. Eles derivam de fontes naturais e de rotas sintéticas. Com algumas exceções, todos podem ser divididos em classes químicas, incluindo derivados de ácido hidroxâmico, carboxilatos, benzamidas, cetonas eletrofílicas e peptídios cíclicos (MINUCCI; PELICCI, 2006).

Os ácidos hidroxâmicos incluem a maioria dos iHDAC atualmente em ensaios clínicos. As peculiaridades das moléculas à base de hidroxamato são: o grupo hidroxâmico polar, um espaçador hidrofóbico de metileno de 4 a 6 carbonos (CU, unidade de conexão polar), um segundo local polar e um grupo hidrofóbico terminal. Na maioria dos iHDAC, o CU pode interagir com aminoácidos no túnel e um ligante de 4 ou 6 unidades de carbono, fazendo com que o seguinte grupo de ligação ao zinco se ligue ao íon zinco o que inibe a enzima (NEBBIOSO, 2012).

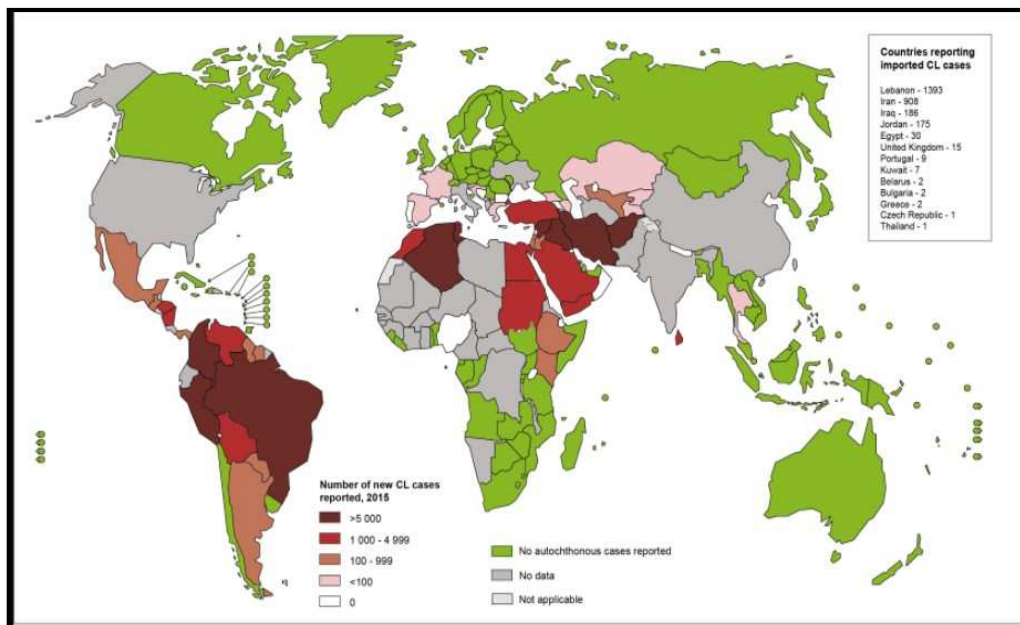
Este trabalho apresenta a busca por novos compostos candidatos a novas drogas da classe dos inibidores de histonas deacetilases derivados do ácido hidroxâmico para tratamento de leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis*. Os compostos testados foram disponibilizados pelo Consórcio internacional A-ParaDDisE, financiado pela Comunidade Européia, e que reuniu pesquisadores europeus, brasileiros e da Austrália em um esforço conjunto na busca de iHDACs com atividade anti-parasitária.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Leishmaniose Tegumentar

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de apresentação da leishmaniose tegumentar. Cerca de 95% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e Ásia Central. Mais de dois terços dos novos casos LC ocorrem em 6 países, Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Estima-se que 0,6 milhão a 1 milhão de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente na (figura 1) podemos observar o status endêmico da leishmaniose (WHO, 2017).

Figura 1 - Status endêmico da Leishmaniose Cutânea no mundo em 2015



Fonte: OMS http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015.png?ua=1
Acessado em 01/09/2017

De acordo com a OMS, nas Américas, no período de 2012 a 2014, registrou-se, em média, 51.092 casos novos de LT. Entretanto, mais de 80% dos casos estão em quatro países: Brasil (40%), Colômbia (20%), Peru (16%) e Nicarágua (5%). O Brasil é o terceiro país com o maior número de casos novos registrados no mundo, com uma média anual de aproximadamente 21.000 casos no período de 2009 a 2013, 10% dos casos registrados no mundo, superado apenas por Síria e Afeganistão. A doença atinge todas as Unidades

Federativas do Brasil. Em 2014 foram notificados 20.418 casos novos. (Comissão nacional de incorporação de tecnologia do SUS. CONITEC, 2016)

Nas Américas, a leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, edentados e primatas). Dessa forma, o homem adquire a infecção ao entrar em contato com as áreas florestais onde existem as enzootias pelas diferentes espécies de *Leishmania*. (BRASIL; 2000)

A transmissão da doença acontece em virtude da propagação do parasito pelo inseto vetor, sendo os gêneros mais frequentemente associados o *Lutzomyia* no novo mundo e *Phlebotomus*, no velho mundo (DE ALMEIDA et al, 2003).

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 12 espécies dermatópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No entanto, no Brasil, já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (BRASIL, 2017).

Dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e da resposta imune mediada por células do indivíduo infectado, se desenvolve um amplo espectro de formas clínicas da doença, convencionalmente conhecido como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutânea anérgica difusa ou simplesmente leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose cutâneomucosa-(LCM) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

A leishmaniose cutânea localizada (Figura 2a) representa a manifestação clínica mais frequente. Nela, as lesões são exclusivamente cutâneas e tendem à cicatrização. Mais frequentemente, são únicas ou em pequeno número. Em casos mais raros, as lesões podem ser numerosas, caracterizando a forma denominada leishmaniose cutânea disseminada. As lesões apresentam aspectos variados e a infecção secundária bacteriana altera este aspecto tornando-as mais inflamadas, dolorosas e purulentas. (BRASIL, 2013).

A forma cutânea disseminada (Figura 2b) se caracteriza pela presença de mais de 10 lesões, geralmente acneiformes ou papulares, em duas ou mais áreas não contíguas do corpo. Em 29% dos casos pode ocorrer lesão de mucosa. *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* são as duas espécies conhecidas como causadoras desta forma de LTA (TURETZ et al, 2002)

A Leishmaniose cutânea difusa (Figura 2c) é uma forma anérgica, rara e caracterizada por lesões nodulares, ricas em parasitos, de difícil tratamento e prognóstico ruim. (SILVEIRA et al, 2009)

A forma mucosa ou mucocutânea (Figura 2d). Ocorre normalmente anos após a cura clínica da lesão cutânea, podendo ser concomitante ou aparecer até décadas depois. Acomete as mucosas oral, nasal, faríngea e laríngea, levando à destruição tecidual e lesões desfigurantes. (GUERRA et al, 2011)

Figura 2 - Manifestações clínicas de leishmaniose tegumentar e Leishmaniose mucocutânea



Figura 2a. LT Lesão ulcerada franca, única, arredondada, com bordas elevadas, infiltradas e fundo granuloso



Figura 2b. LT Forma cutânea disseminada, com acometimento facial, apresentando múltiplas lesões ulceradas.



Figura 2c. LT Forma cutânea difusa – Lesão infiltrada com áreas descamativas na orelha. Tempo de doença: 12 anos.



Figura 2d. LT Forma mucosa – Lesão de mucosa nasal com ulceração das asas do nariz e diversas lesões nódulo infiltrativas, algumas com crostas na face

Fonte: Adaptado de (BRASIL, 2017)

L. braziliensis é a espécie capaz de produzir a forma clínica mais frequente da doença, a LCL. Embora os aspectos clínicos da LCL variem de acordo com a espécie, a lesão clássica inicia-se como uma pápula ou nódulo no sítio da inoculação que expande lentamente (REITHINGER et al., 2007). Evoluindo para uma lesão ulcerativa na pele, que é a apresentação clínica mais comum da LTA, caracterizada por baixo parasitismo tecidual, podendo mesmo

evoluir para a cura espontânea. A LCL pode também evoluir para a formas clínicas de leishmaniose mucosa (LM) (BRASIL, 2009; OLIVEIRA, 2017).

2.2. Ciclo de Vida

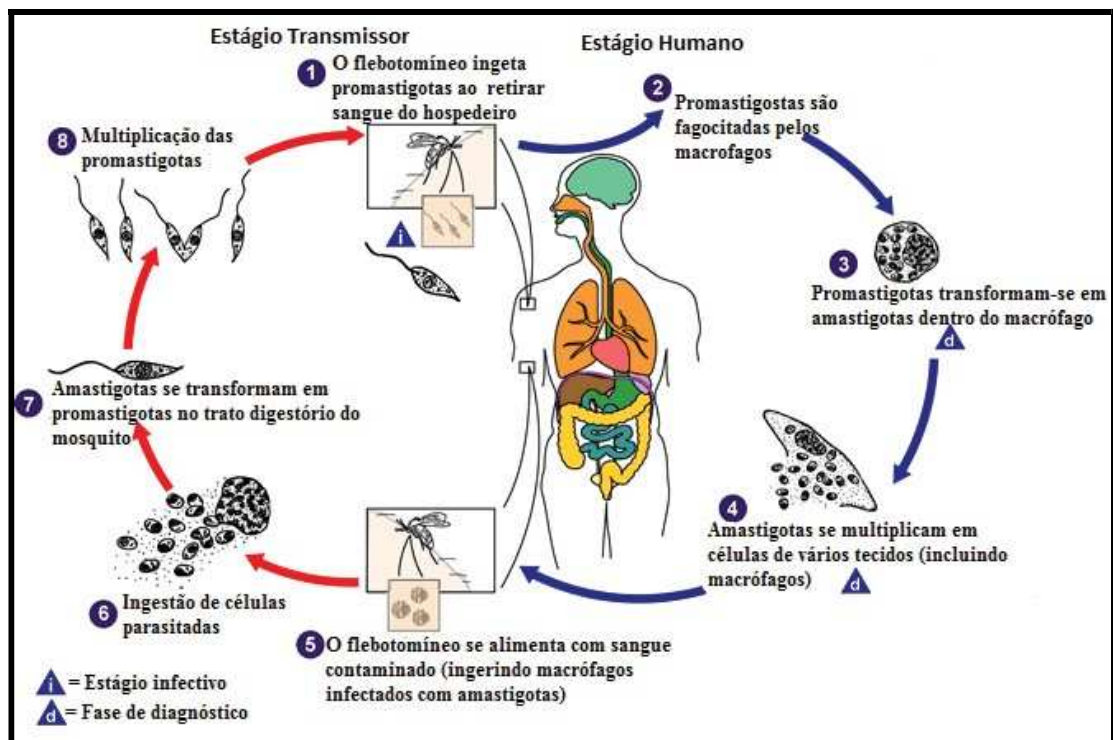
O parasito *Leishmania* é um eucariota unicelular que é exposto a diferentes estresses e ambientes extra e intracelulares durante seu ciclo de vida, o que caracteriza um modelo biológico genética e ecologicamente complexo. Uma das principais características destes parasitos é o fato de serem organismos ditos digenéticos por apresentarem dois estágios em seu ciclo de vida, sendo, um estágio extracelular, no vetor invertebrado (flebotomíneos hematófagos) e um estágio intracelular, no hospedeiro vertebrado. Desta forma, os parasitos se apresentam basicamente sob duas formas morfológicas denominadas promastigotas, encontradas nos vetores invertebrados, e amastigotas, encontradas nos hospedeiros vertebrados (BAÑULS et al, 2007).

A forma amastigota desenvolve-se intracelularmente, multiplicando-se especialmente em macrófagos, apresenta-se como uma forma arredondada e sem flagelo externalizado e as formas promastigotas são móveis, encontrando-se no aparelho digestivo do inseto vetor, possuem um flagelo que tem origem no corpo basal próximo ao cinetoplasto. Durante o processo de desenvolvimento dos promastigotas no tubo digestivo do inseto vetor, observam-se duas formas distintas: as procíclicas, que são alongadas e maiores que as formas amastigotas, possuindo um flagelo habitualmente mais curto que o corpo celular, e as formas metacíclicas, que são relativamente curtas e arredondadas com um flagelo longo, duas a três vezes mais comprido que o corpo celular e com grande mobilidade. Estas formas constituem a fase final de desenvolvimento que ocorre no vetor e é a forma infectante inoculada no hospedeiro vertebrado (KILLICK-KENDRICK, 1990).

O ciclo biológico de *Leishmania* se inicia quando fêmeas dos flebotomíneos parasitadas inoculam formas promastigotas metacíclicas infectantes em um hospedeiro vertebrado suscetível durante o repasto sanguíneo (BAÑULS et al, 2007). A saliva também inoculada parece exercer papel importante na infecção, por intermédio de diversos mecanismos dentre eles a quimiotaxia de macrófagos e monócitos ao local da picada (ROGERS et al, 2002). Após a interiorização em macrófagos as formas promastigotas

metacíclicas se diferenciam em formas amastigotas que proliferam no interior de vacúolos parasitóforos. A intensa multiplicação das formas amastigotas leva a lise dos macrófagos infectados havendo liberação de amastigotas que podem infectar novos macrófagos. O fechamento do ciclo se dá através de nova ingestão de formas amastigotas através da picada do vetor flebotomíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. A figura 3 resume as etapas do ciclo de vida do parasito (BAÑULS et al., 2007),

Figura 3 - Ciclo de vida do parasito.



Fonte: modificada de CDC <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.htm>>. Acessado em 03/09/2017

A sobrevivência e a proliferação de *Leishmania* dentro dos vacúolos parasitóforos dependem principalmente da sua estratégia de evadir as moléculas eceptoras dos macrófagos e de desviar a resposta imune. Os macrófagos estão cheios de poderosas armaduras, como espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, lisozimas e outras moléculas microbicidas, bem como a produção de várias citocinas Th1 para inibição parasitária. Na infecção parasitária começa a perseguição, o ataque dos macrófagos ao parasita com suas moléculas reativas de nitrogênio e oxigênio como resultado da indução de

atividade respiratória, enquanto o parasita deve se defender para sobreviver, tem que produzir algo que contra ataque e exclua essa atividade ou desenvolva uma estratégia para ignorar esse ataque. As estratégias de sobrevivência de *leishmania* inclui: a glicoproteína (gp63 uma metaloproteinase) que facilita a ligação do promastigotas metacíclico aos macrófagos via receptor CR3 sem induzir explosão oxidativa em macrófagos; inativação de componentes do complemento (C3, C5, C9), utilização da superóxido dismutase para quelar reativos intermediários de oxigênio, supressão da Óxido Nítrico Síntase (iNOS) e de citocinas de perfil Th1, além da indução de uma resposta do perfil Th2 exarcebada (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

2.3. Tratamento

A quimioterapia para o tratamento das leishmanioses inclui fármacos antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (CROFT; COOMBS, 2003; BRASIL, 2017).

2.3.1. Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (AP) estibogluconato de sódio e o antimoniato de meglumina (Glucantime) continuam sendo o tratamento de primeira linha para todas as formas clínicas de leishmaniose, apesar da resposta terapêutica variável e da preocupação crescente da falha no tratamento. Uma das razões por trás da resposta variável poderia ser a diferença intrínseca na sensibilidade das espécies à droga. O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está claro. É pensado que o metabolismo tiol único de *Leishmania* desempenha um papel fundamental no mecanismo de ação de drogas antimoniais (CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010).

A base bioquímica para a sua eficácia é desconhecida, mas pode envolver a inibição da síntese de ATP. Ademais, parece estar ligado à inibição da ATP sintetase (BLUM; HATZ, 2009). Os medicamentos podem causar vários efeitos colaterais que levam a problemas no tratamento, dentre eles mialgia, rigidez articular, dor abdominal, anorexia, alterações eletrocardiográficas, bradicardia e em casos mais raros pode levar a sinais de dano hepático, pancreatite, anemia hemolítica, nefrotoxicidade e anafilaxia (DAVID; CRAFT, 2009).

2.3.2. Pentamidina

A pentamidina é utilizada como alternativa para os antimoniais pentavalentes. O mecanismo de ação da pentamidina ainda não é conhecido, porém o mecanismo possível inclui a inibição da biossíntese de poliaminas, a ligação ao sulco do DNA e efeito sobre o potencial da membrana interna mitocondrial. (CHAKRAVARTY, SUNDAR, 2010). Os efeitos colaterais são dor no local da injeção, gosto metálico, cefaléia, congestão, dispnéia e os menos frequentes são febre, transpiração e fadiga. Ademais, os pacientes devem ser monitorados quanto a hipotensão arterial e hipoglicemia (DAVID; CRAFT, 2009).

2.3.3. Anfotericina B

A anfotericina B tem tempo de meia-vida curto e é usada em pacientes clinicamente resistentes à pentamidina. A anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteróide da membrana de *leishmania*, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito (BERMAN, 1997). A anfotericina B também pode reconhecer o colesterol da célula humana, o que é prejudicial para o paciente. Adicionalmente, o custo de produção é alto o que inviabiliza o tratamento à base deste medicamento em países pobres (SANTOS et al., 2008). A principal desvantagem é a alta incidência de reações adversas como: a hiperpirexia, mal-estar grave, hipotensão, tromboflebite, azotemia, dano tubular renal, hipocalcemia, anemia e hepatite (BLUM; HATZ, 2009).

2.3.4. Paromomicina

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídeo que mostra atividade contra Leishmaniose visceral (LV), com taxas de cura globais superiores a 90%. Ele concluiu com sucesso os ensaios clínicos de fase III, mostrando vantagens de um curso de tratamento mais curto, maior perfil de segurança e baixo custo de fabricação, tornando-se uma opção terapêutica acessível em condições de campo indianas. Como resultado, foi registrado na Índia em agosto de 2006 e pode ser uma promissora ferramenta de saúde pública no programa nacional de eliminação de LV (KULSHRESTHA et al, 2011). O mecanismo de ação é por inibição da síntese protéica. Existem vários ensaios

clínicos que reconhecem os resultados de eficácia desta droga por rotas diferentes. No entanto, existe uma chance provável de adquirir resistência com a monoterapia com paromomicina. Mais recentemente, surgiram formulações mais novas como paromomicina carregada com microesferas de albumina e paromomicina com lipossoma apresentando melhores resultados (MOHAPATRA, 2014).

2.3.5. Miltefosina

Um éster de fosforilcolina de hexadecanol, designado como miltefosina, originalmente desenvolvido como um fármaco anticancerígeno, mostrou ser o primeiro fármaco oral contra o LV e LC. No entanto, pode-se notar que a miltefosina (Impavido®) possui uma meia-vida longa capaz de gerar isolados de *Leishmania* resistentes e exibe contra-indicação na gravidez por causa de efeitos adversos. Apesar destas limitações, a miltefosina é agora bem sucedida em combinação com a AmBisome®, a fim de prevenir a resistência dos medicamentos a ambos os medicamentos (LOISEAU; COJEAN; SCHREVEL, 2011).

As vantagens da miltefosina sobre AP incluem administração oral, e os efeitos secundários menos graves (náuseas, vômitos, diarreia e creatinina elevada). Miltefosina é uma opção para indivíduos que são resistentes à AP ou apresentam resistência cruzada à anfotericina B (DAVID; CRAFT, 2009).

Devido à falta de vacinas eficientes, ao limitado número de fármacos disponíveis e à toxicidade destes que exigem administração parenteral, aos constantes relatos de falhas terapêuticas, ao aumento dos casos de leishmaniose por causa de co-infecções com HIV, bem como ao aumento de viagens e conflitos internacionais, faz-se necessário a busca de novos fármacos leishmanicidas (GUPTA; NISHI, 2011).

A fim de desenvolver novas drogas alvo específicas pode-se explorar mecanismos moleculares que sejam importantes para a infecção e sobrevivência dos agentes patogênicos. Um mecanismo molecular que pode ser explorado neste contexto é o remodelamento da cromatina feito através de epigenética.

2.4. Epigenética

O termo epigenética (do grego *epi*, sobre + “genética”) foi cunhado por Conrad Waddington 1947 (JABLONKA; LAMB, 2002) e pode ser definido como o conjunto de mecanismos que levam a modificações funcionais do genoma ao induzir alterações estáveis na expressão gênica, sem que haja alterações na sequência de nucleotídeos de ácido desoxirribonucleico (DNA) que compõe o genoma (NIERATSCHKER; BATRA; FALLGATTER, 2013).

Os mecanismos epigenéticos levam a modificações funcionalmente relevantes do genoma, pois induzem mudanças estáveis na expressão gênica, o que conseqüentemente influencia o resultado fenotípico. Estes mecanismos de controle da transcrição, que podem ser hereditários, não são acompanhados por alterações de nucleotídeos na sequência de DNA subjacente. Os mecanismos epigenéticos incluem modificações nas histonas, metilação de DNA e RNAs de interferência (NIERATSCHKER; BATRA; FALLGATTER, 2013).

De todos estes mecanismos de regulação epigenética, somente a metilação de DNA foi mostrada como hereditária na divisão celular (WIGLER; LEVY; PERUCHO, 1981). Contudo, algumas modificações pós-traducionais de histonas podem contribuir para a transmissão de informação epigenética, outras diretamente no processo de transcrição, e ainda outras somente têm função estrutural na cromatina (BERGER et al, 2009).

2.5. Modificações das histonas

A sequência de DNA encontra-se envolta em proteínas denominadas histonas e de outras proteínas presentes que formam a cromatina (KOOISTRA; HELIN, 2012). A cromatina é a forma como o DNA se apresenta compactado, sendo sua unidade fundamental o nucleossomo.

O nucleossomo é composto por um octâmero de proteínas histonas de subunidades H2A, H2B, H3 e H4. O cerne de histonas enovela 145-147 pares de bases em 1,65 voltas e tem sua estrutura regulada de acordo com o estado epigenético da célula. Uma histona adicional, H1, se liga ao complexo estabilizando o nucleossomo (KOOISTRA; HELIN, 2012).

As histonas são proteínas básicas com um domínio globular C-terminal e uma cauda N-Terminal. A região N-terminal das cadeias peptídicas histônicas

é responsável pelas modificações relativas à estrutura da cromatina e por consequência dos processos de regulação celular que dependem do envelhecimento do DNA, como transcrição e replicação (KOOISTRA; HELIN, 2012). Assim, o remodelamento da cromatina e a modificação das histonas desempenham um papel importante na regulação da expressão dos genes (HO et al, 2011).

As modificações pós-traducionais das histonas incluem acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação. (KOOISTRA; HELIN, 2012). Dentre os processos de modificação das histonas o melhor caracterizado é o de acetilação/deacetilação.

O processo de acetilação ocorre pela ação de duas famílias de enzimas, histona acetiltransferases (histone acetyltransferase; HATs) e histona deacetilases (histone deacetylases; HDACs). As HATs catalisam a transferência de um grupo acetil, originado do cofator acetil-CoA, ao grupo ϵ -amino da cadeia lateral da lisina. Esta adição neutraliza a carga positiva da lisina enfraquecendo a ligação das histonas com o DNA, que possui naturalmente carga negativa devido aos grupos fosfatos. Isto leva ao relaxamento da cromatina, expondo regiões do DNA e permitindo a transcrição gênica e a replicação (HABERLAND, et al; 2009); (MENDITI; KANG, 2007)

Há dois tipos de HATs: tipo A e tipo B. HATs do tipo A são encontradas no núcleo associadas a complexos multiproteicos, podendo ser classificadas em famílias de acordo com a sua homologia de sequência de aminoácidos e estrutura conformacional em famílias: GNAT (composta por Gcn5 e PCAF), MYST (constituída por MOZ, YBF2/SAS3, TIP60) e p300/CBP. A família Gcn5/PCAF funciona como co-ativadora para um conjunto de ativadores transcricionais. Já a família MYST está envolvida em uma ampla cadeia de funções reguladoras envolvendo ativação transcricional, silenciamento transcricional e progressão do ciclo celular e a família p300/CBP funciona como reguladora global da transcrição (ROSA; CALDAS, 2005). Na tabela 1 podemos observar os membros das famílias de HATs.

Tabela 1. Famílias de HATs, seus membros e as modificações relacionadas.

HAT/KAT family	Representative members	Histone modification
Type A HAT (nuclear HAT)		
1) GNAT family	GCN5/KAT2A, PCAF/KAT2B ELP3/KAT9	H3K9, K14, K18, H2B H3, H4 acetylation
2) p300/CBP family	CBP/KAT3A, p300/KAT3B	H3K9, K14, K18, H2B H2AK5, H2BK12, K15
3) MYST family	TIP60/KAT5, MOZ/KAT6A, MORF/KAT6B, HBO1/KAT7, HMOF/KAT8	H4K5, K8, K12, K16 H3K14 H4K5, K8, K12 H4K16
4) Transcription factor related	TFIIIC90/KAT12, TAF1/KAT4	H3K9, K14, K18 H3, H4 acetylation
5) Nuclear receptor associated	SCR1/KAT13A, ACTR/KAT13B	H3/H4 acetylation
Type B HAT (cytoplasmic HAT)	HAT1/KAT1	H4K5, K12

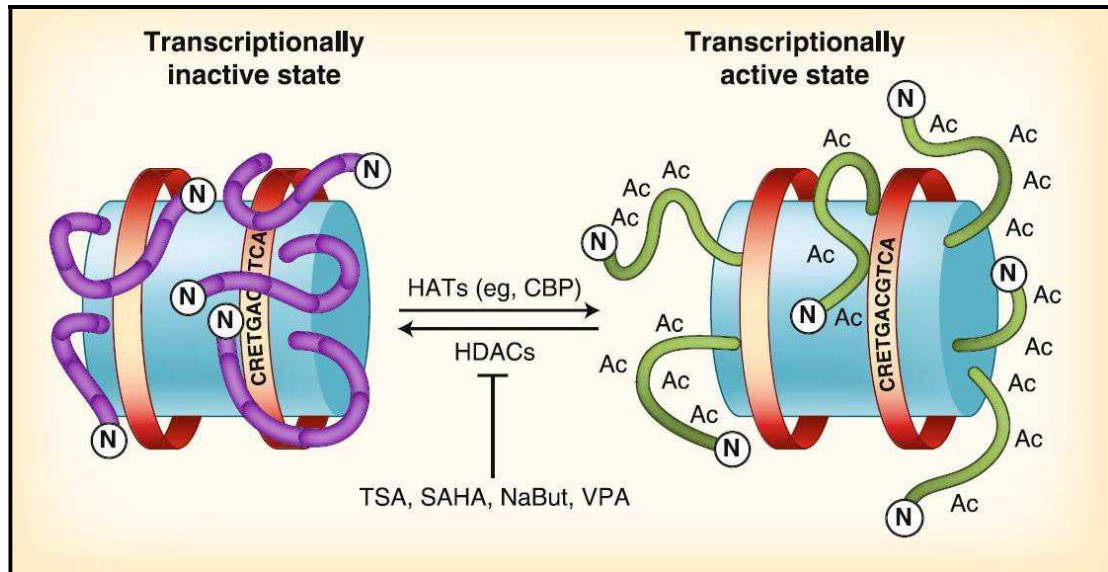
Fonte: (SELVI et al., 2010).

Já as HATs do tipo B localizam-se predominantemente no citoplasma, acetilando histonas livres recentemente sintetizadas, sendo a acetilação uma marcação importante para o seu direcionamento ao núcleo (PARTHUN, 2007).

As HATs participam de um complexo de modificadores pós-traducionais que trabalham cooperativamente regulando a função das proteínas modificadas por elas. Devido a sua dispersa localização na célula, as HATs atuam tanto em proteínas nucleares como citoplasmáticas, o que pode resultar em muitos efeitos. Existe também uma lista crescente de proteínas que não são histonas, das quais as HATs também atuam regulando a sua função (MINUCCI; PELICCI, 2006).

Agindo de forma oposta, as HDACs revertem a acetilação nas lisinas, restaurando sua carga positiva e estabilizando a arquitetura da cromatina, reprimindo a transcrição gênica ou regulando as atividades das proteínas. A Figura 4 ilustra as atividades das HATs e HDACs e mostra que inibidores podem ser usados farmacologicamente para interferir nas ações destas enzimas.

Figura 4 - Reação reversível de acetilação controlada por HATs e HDACs



A figura ilustra a atividade das HATs e HDACs e mostra que inibidores podem ser usados farmacologicamente para interferir nas ações destas enzimas. Fonte: (MCQUOWN e WOOD, 2010).

Em conformidade com as análises filogenéticas e de sequências homólogas, as famílias das HDACs consistem em, pelo menos, 18 membros divididos em duas famílias e quatro classes em células eucarióticas. Essas duas famílias são a família clássica e a das sirtuínas. As HDACs são categorizadas em classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), classe IIa (HDACs 4, 5, 7 e 9), classe IIb (HDACs 6 e 10), classe III, conhecida como família das sirtuínas (Sirt1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) e classe IV (HDAC 11) (BALASUBRAMANIAN; VERNER; BUGGY, 2009).

Os HDAC de classe I, II e IV compõem as "HDACs clássicas", que exigem o zinco como cofator. A Classe III contém uma série de famílias Sir2, que são dependentes de NAD o que as difere das outras classes de HDACs. As HDACs de classe I e II são reconhecidas por estarem envolvidas na patogênese do câncer (ZHANG; ZHONG, 2014).

As HDACs da classe III Sirt-1, -6 e -7 são encontradas no núcleo, enquanto Sirt-2 é citosólica e Sirt-3, -4 e -5 são encontradas nas mitocôndrias. A atividade das sirtuínas intervêm em inúmeros processos fisiológicos, afetando a sobrevivência celular, o metabolismo e o ciclo celular (HAIGIS; GUARENTE, 2006); (ZHANG; ZHONG, 2014). Na tabela 2 podemos observar as famílias, clases, membros e a localização dos HDACs já descritas.

Tabela 2. Famílias, classes, membros e localização das HDACs

Group	Class	Name	Location in cell	
Classical (Zn dependent)	Class I (Rpd3)	HDAC1	Nucleus	
		HDAC2		
		HDAC3		
		HDAC8		
	Class IIa (Hda1)	HDAC4	Nucleus/ cytoplasm	
		HDAC5		
		HDAC7		
	Class IIb (Hda1)	HDAC6	Cytoplasm	
		HDAC10		
	NAD dependent	Class IV (Rpd3/Hda1)	HDAC11	Nucleus/ cytoplasm
		Class III	SIRT (1-7)	Nucleus/ cytoplasm

Fonte: Modificada de

<http://www.cancerjournal.net/viewimage.asp?img=JCanResTher_2014_10_3_469_137937_t3.jpg>. Acessado em 21/02/2018.

O equilíbrio das atividades de HATs e HDACs coordena a fisiologia de processos de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, entre outros. E seu respectivo desequilíbrio foi observado em inúmeras patologias, já que o balanço entre suas ações governa inúmeros processos do desenvolvimento e da fisiologia animal (MARKS; XU, 2009); (FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014). Desta maneira, as HDACs se tornaram alvos terapêuticos favoráveis no controle dos estados de acetilação defeituosos e na recuperação do seu equilíbrio.

2.6. Inibidores HDAC

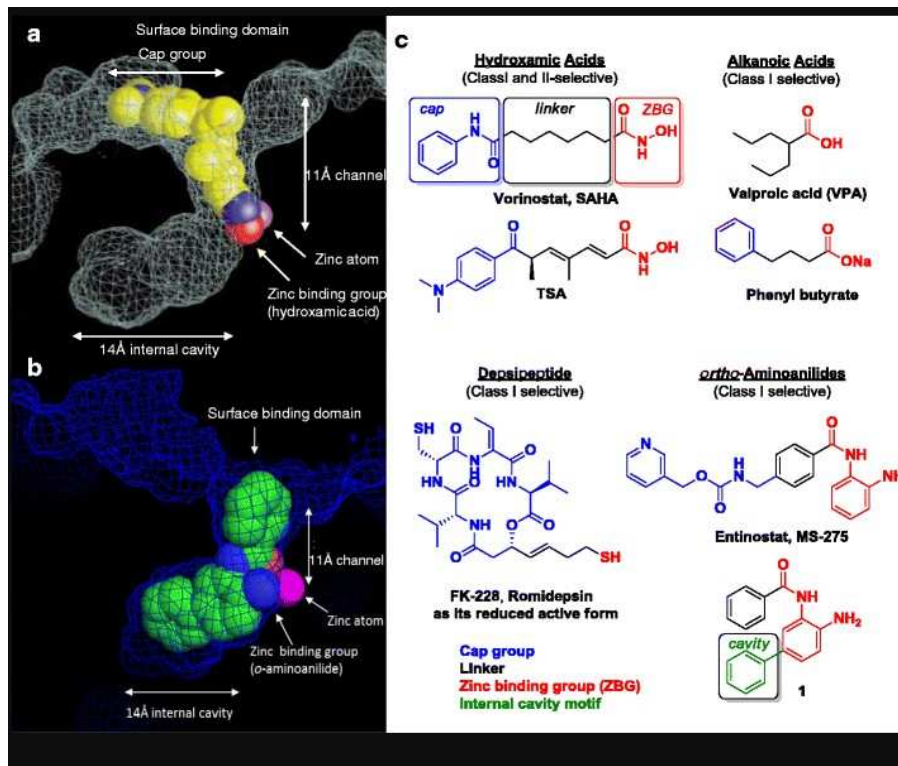
Os Inibidores de HDACs (iHDAC) são moléculas pequenas capazes de promover hiperacetilação de histonas impedindo o silenciamento de genes ativos (MINUCCI; PELICCI, 2006).

Os iHDACs fazem parte de uma nova classe de agentes que atuam sobre a regulação da expressão gênica e tem mostrado diversos efeitos como indução de parada do crescimento celular, da diferenciação e indução de apoptose em diversos tipos de neoplasias. Além disso, células não-neoplásicas

são mais resistentes aos efeitos dos iHDACs comparando-se com células neoplásicas (BERNHARD et al., 2001); (BI; JIANG, 2006); (NEBBIOSO et al., 2012); (MINUCCI; PELICCI, 2006); (ROMANSKI et al., 2004).

O trabalho de WAGNER e colaboradores (2013) mostra uma estrutura cristalina de alta resolução de um homólogo bacteriano de deacetilases eucarióticas, a proteína do tipo histona deacetilase (hdlp) (Figura 5a). A estrutura de cristal obtida com o ácido hidroxâmico trichostatina A (TSA), um conhecido inibidor de HDACs destacou elementos-chave das interações inibidor-enzima e apresentou quatro domínios de ligação proeminentes: 1) um domínio de ligação à superfície, 2) um canal de aproximadamente 11 Å que vai da superfície da enzima exposta ao solvente para o interior da cavidade de ligação do inibidor, 3) o domínio de ligação ao zinco catalítico e 4) uma cavidade interna adjacente de aproximadamente 14 Å, definida por vários resíduos hidrofóbicos, (Figura.5). Esta figura também destaca as classes de inibidores clássicos de HDACs.

Figura 5 - Estrutura de cristal de raios X da proteína histona desacetilase bacteriana e HDAC2 humana ligada a um inibidor de HDAC.



a) A estrutura de cristal de raio X de proteína de tipo desacetilase da histona bacteriana. b) Estrutura cristalina de raio X da histona desacetilase humana (HDAC) 2 e composto 1, clássico inibidor de HDAC. c) Inibidores prototípicos de HDAC. Fonte: Adaptado (Wagner et al, 2013)

Muitos compostos estruturalmente diversos podem se ligar a os HDACs e inibir a atividade enzimática. Esses compostos são vistos como a primeira geração de inibidores de HDAC e podem ser subdivididos em: ácidos graxos de cadeia curta, benzamidas, peptídios cíclicos e ácidos hidroxâmicos (PARK et al., 2004).

2.6.1. Ácidos graxos de cadeia curta

Os ácidos graxos de cadeia curta têm como princípio a ação do grupo carboxílico, que ocupa um espaço sob forma de túnel cedido pela liberação do grupo acetato, e que deste modo, pode assim realizar duas funções: formar uma ligação com o íon Zn^{2+} ou competir com o grupo acetato anteriormente liberado por deacetilação. Os dois compostos de ácidos graxos de cadeia curta que se encontram na fase de ensaios clínicos são o ácido valpróico (AVP) e o fenilbutirato de sódio. O AVP, usado pela primeira vez como agente

anticonvulsivo e estabilizador do humor, é um pan-iHDAC (inibidor geral de HDACs). Os ensaios clínicos de fase 1 e 2 testaram AVP sozinho ou em tratamento combinado para leucemia linfocítica, e outras doenças. Existem também dois ensaios clínicos com fenilbutirato de sódio, um na fase 2 para o tratamento da doença de Huntington e um na fase 1-2 para a esclerose lateral amiotrófica (NEBBIOSO et al., 2012).

2.6.2. Benzamidinas

As benzamidinas são iHDACs que apresentam uma estrutura composta por 2-aminoanilida, que liga com aminoácidos específicos presentes no sítio ativo em forma de túnel situados no núcleo deste tipo de enzima, com participação ou não do íon zinco. Pelo menos duas benzamidinas, MS-275 (SNDX-275, Entinostat) e MGCD0103 (Mocetinostat) estão em desenvolvimento clínico. Esses agentes estão em testes como agentes únicos e em combinação com outros medicamentos (NEBBIOSO et al., 2012).

2.6.3. Peptídios cíclicos

Romidepsina (Depsipeptídeo ou FK228) atua como um iHDAC com a ligação dissulfureto submetida a redução dentro da célula para liberar um tiol de ligação ao zinco. O tiol interage com um átomo de zinco no bolso vincutivo de HDAC dependente de zinco para bloquear sua atividade. Romidepsina é um produto natural obtido a partir da bactéria *Chromobacterium violaceum*. Em 5 de novembro de 2009, foi aprovado pelo FDA para o tratamento do linfoma cutâneo de células T (CTCL). Os ensaios clínicos terminados mostram a actividade deste composto no tratamento do linfoma (NEBBIOSO et al., 2012).

2.6.4. Ácidos hidroxâmicos

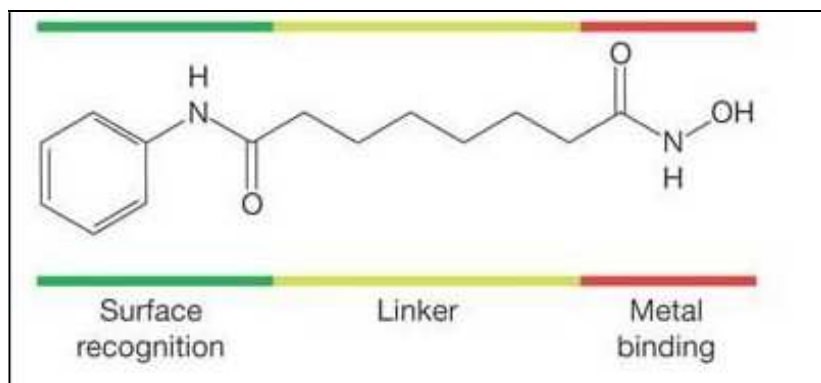
Os ácidos hidroxâmicos possuem moléculas contendo o grupo funcional –CONHOH são denominadas ácido hidroxâmico e têm sido estudadas devido a sua importância biológica relacionada à sua habilidade de formar complexos metálicos (RODRIGUES, 2015). O ácido hidroxâmico também é conhecido como constituinte de fatores de crescimento, aditivos alimentares, antibióticos, antagonistas de antibióticos, inibidores de tumores, agentes antifúngicos e fatores de divisão celular, também são potentes

inibidores específicos da atividade da urease, termolisina, elastase e aminopeptidases (KURZAK; KOZLOWSKI; FARKAS, 1992).

O grupo hidroxâmico possui três átomos doadores em potencial, o átomo de oxigênio da carbonila C=O, e os átomos de oxigênio e de nitrogênio do grupo hidroxilamina, –NHOH. Com o grupo –NHOH desprotonado, eles podem atuar como ligantes bidentados coordenados pelos átomos de oxigênio, formando um complexo quelato de cinco membros bastante estável. Os ácidos hidroxâmicos derivados de aminoácidos contêm o grupo amina, –NH₂, e podem conter outros grupos complexantes na cadeia lateral do aminoácido, o que aumenta as possibilidades de complexação ao íon metálico (RODRIGUES, 2015).

O ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA; ou Vorinostat) (Figura 6) é um inibidor das HDACs 1, 2, 3 e 6 que, até o momento, está aprovado pela FDA para o tratamento de linfoma cutâneo de células T (GAMMOH et al., 2012).

Figura 6 - Estrutura do SAHA

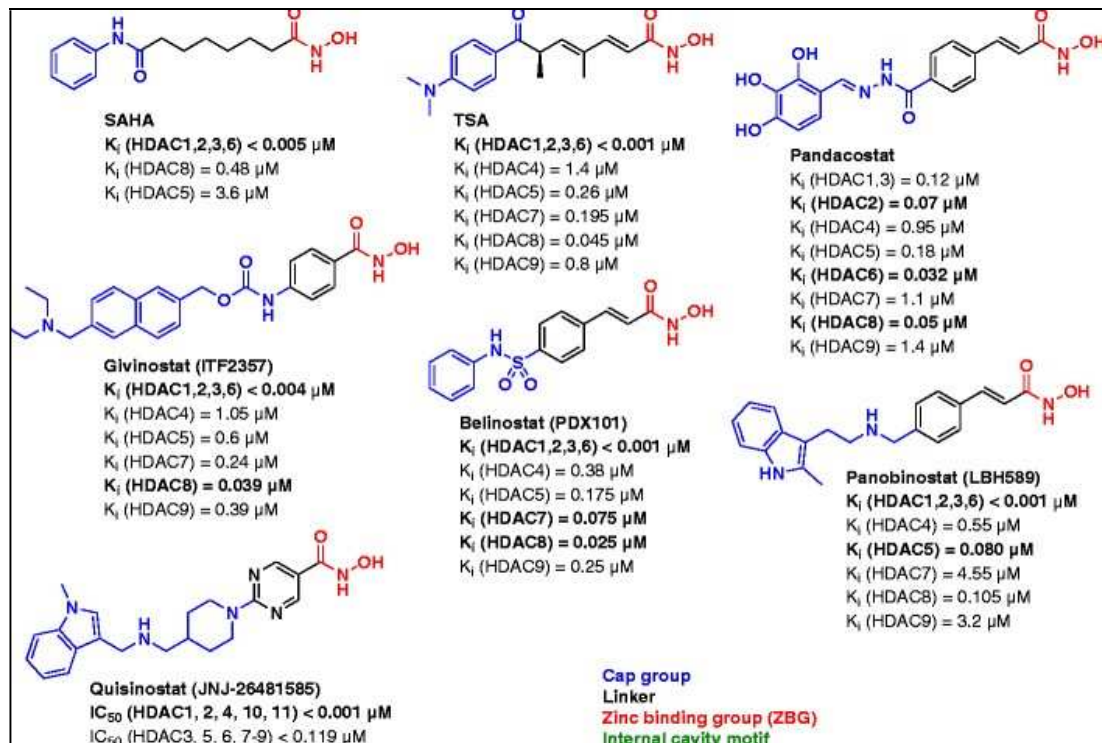


Características estruturais dos inibidores de HDACs à base de ácido hidroxâmico. Unidade de ligação ao metal zinco (vermelho); linker (amarelo) e porção superficial (verde). Fonte: (KELLY; MARKS, 2005).

Os detalhes estruturais das interações inibidor-enzima HDAC foram elucidados por estudos cristalográficos de raios-X em que um análogo de HDAC (HDAC-like proteína, HDLP) foi usado para resolver sua estrutura quando ligado com os iHDAC TSA e SAHA (FINNIN MS, 1999). Existe uma interação direta da fração hidroxâmica do SAHA com o local do zinco no bolsão catalítico de HDAC (Figura 7). A fração de ácido hidroxâmico é um quelante de metal altamente eficiente, portanto, a maioria dos ácidos hidroxâmicos

pode ser iHDAC altamente potente com IC₅₀ na faixa baixa de nanomolar (KELLY; MARKS, 2005).

Figura 7. Exemplos de Estrutura de Ácidos Hidroxâmicos inibidores de HDACs.



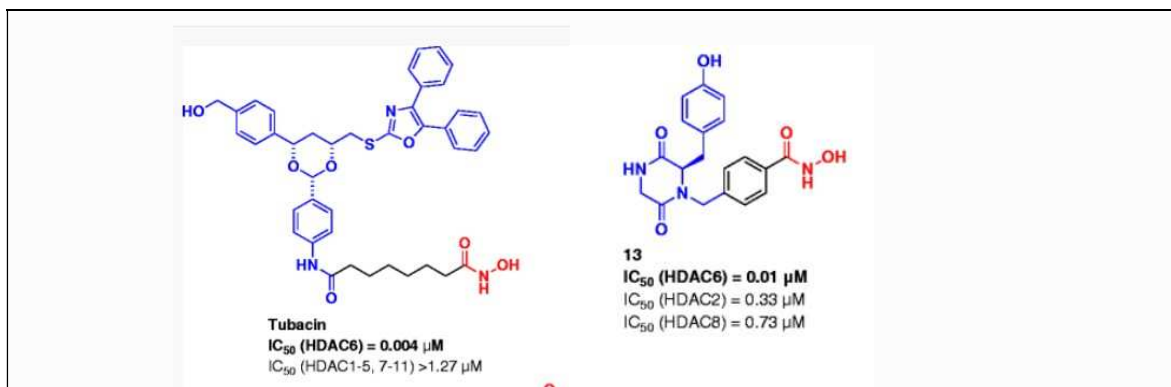
Inibidores de histona desacetilases da classe dos ácidos hidroxâmicos. A figura mostra as regiões importantes dos iHDACs e o K_i para diferentes isoformas de HDAC humanas. Fonte: Adaptado de (WAGNER et al, 2013).

Muitos iHDACs baseados em ácido hidroxâmico estão estruturalmente relacionados à SAHA, com variações nos motivos de ligação e topografia. Os diferentes ligantes incluem grupos alceno substituído (TSA), cinâmico (belinostat, panobinostat), fenil (givinostat) ou heteroaril (quisinostat). Os grupos da região externa na superfície do sítio de inibição e que se estendem para além da superfície da enzima variam em tamanho e funcionalidade e foram explorados para conferir seletividade de isoforma com a família de classe II (WAGNER et al, 2013). Entre eles temos os inibidores seletivos de HDAC6 e HDAC8.

HDAC6- Inibidores seletivos do tipo ácido hidroxâmico

Inibidores seletivos HDAC6, como a tubacina, podem ser inibidores HDAC6 altamente potentes e seletivos ($IC_{50} = 4 \text{ nM}$;). Embora estruturalmente idêntico ao SAHA em ZBG e motivos de ligação, a seletividade foi atribuída a interações específicas entre o motivo de cobertura único e a topologia de superfície de HDAC6. Outro inibidor HDAC6 altamente seletivo é o composto 13 (Figura. 8), possuindo um motivo de ligação de fenil e uma porção de cobertura quiral. O motivo alternativo de ligação fenil aproveita a topologia do canal HDAC6 mais amplo e mais raso, enquanto o grupo de superfície forma interações superficiais favoráveis que confere a seletividade (WAGNER et al, 2013).

Figura 8 - Estrutura composto 13 e tubacina.



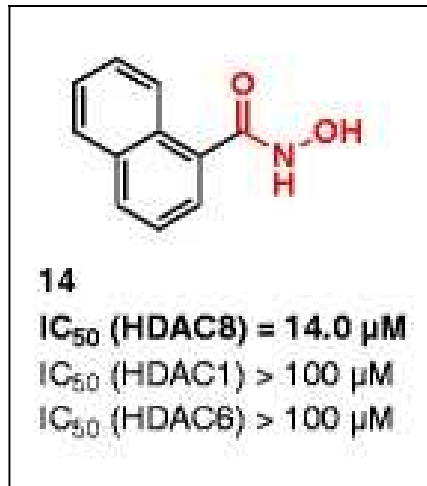
Estrutura de inibidores seletivos para HDAC6 derivados do ácido hidroxâmico. Fonte: adaptado (WAGNER et al, 2013).

HDAC8- Inibidores seletivos derivados do ácido hidroxâmico

Outros inibidores possuem seletividade em relação a HDAC8, entre eles podemos encontrar o composto 14, (Figura 9). Este inibidor tem seletividade ≥ 7 vezes em relação à HDAC6, mas exibe atividade inibitória fraca para HDAC8 ($IC_{50} = 14,0 \mu\text{M}$). Esses inibidores foram projetados para tirar proveito de um grande sub bolsão adjacente ao canal do sítio ativo que foi observado na estrutura cristalina de HDAC8 ligado a outro ácido hidroxâmico ligado a fenil. Vários outros inibidores seletivos de HDAC8 foram relatados, e possuem uma característica estrutural chave comum: um ligante de fenil meta-

substituído. O padrão de substituição meta posiciona estrategicamente o grupo para interagir com o mesmo sub bolsão (WAGNER et al, 2013).

Figura 9 - Estrutura do composto 14



Inibidor seletivos de HDAC 8 derivado do ácido hidroxâmico. Fonte: Adaptado (Wagner et al, 2013).

2.7. Atividade antiparasítica de inibidores de HDAC

Os genomas de diferentes espécies de *Leishmania* e de outros patógenos humanos contêm vários genes que codificam diferentes isoenzimas das famílias de histonas deacetilases (IVENS et al, 2005). Assim foi mostrado que diferentes espécies de *Leishmania* são também susceptíveis à iHDACs, (MAI et al, 2004); (SODJI et al, 2014), sugerindo que as isoenzimas de HDAC são essenciais para a sua viabilidade e proliferação. No entanto, a identidade das isoenzimas HDAC de *Leishmania* que conferem atividade leishmanicida sob ação de iHDACs é atualmente desconhecida. Além disso, a relação de estrutura-atividade (SAR) dos iHDAC ainda não foi completamente elucidada (SODJI et al, 2014).

A atividade antiprotozoária dos iHDAC foi sugerida como resultado da inibição de proteínas de protozoários da família dos HDAC de classe I. Esta sugestão foi apoiada no caso de *Plasmodium falciparum*, o principal causador de malária em humanos. Este parasito tem pelo menos cinco enzimas putativas de HDAC (JOSHI et al,1999). Os genes que codificam duas dessas HDACs PfHDAC-1 e PfSir2 putativos foram parcialmente caracterizados (FREITAS-JUNIOR et al, 2005); (JOSHI et al,1999). Por sua homologia com a família de

HDACs da classe I de humanos e *Saccharomyces cerevisiae*, PfHDAC-1 pode ser um dos alvos intracelulares cuja interação com iHDAC induz a atividade antimalárica observada (MUKHERJEE et al, 2008); (ANDREWS et al, 2008); (JOSHI et al, 1999).

O genoma de diferentes espécies de *Leishmania* contém vários genes que codificam para diferentes isoenzimas HDAC, alguns dos quais têm mostrado ser importantes para a sobrevivência e proliferação do parasito (VERGNES et al, 2005); (OUAISSI; OUAISSI, 2006). No entanto, a relação estrutura-atividade (SAR) das actividades anti-malária e leishmanicidas de iHDAC não é completamente clara (PATEL et al, 2009).

O inibidor de pan-HDAC, SAHA, é ativo contra *P. falciparum*, porém mais de 70 vezes menos ativo contra *Leishmania donovani*, organismo causador de leishmaniose visceral. (PATIL et al, 2009); (MAI et al, 2004). Além disso, vários iHDAC têm relação inversa entre a inibição de HDAC1 e a atividade antileishmania (MAI et al, 2004). As disparidades na sensibilidade dos iHDAC de protozoários como *P. falciparum* e *L. donovani* podem ser devidas a diferenças nos principais resíduos de aminoácidos nos locais ativos de suas isoenzimas HDAC classe I. Alternativamente, as subclasses de HDAC diferentes da classe I podem ser essenciais para a sobrevivência e a proliferação, particularmente de *Leishmania* e podem ser o alvo potencial para a ação de iHDAC anti *Leishmania* (SODJI et al, 2014).

2.8. O Consórcio A-ParaDDisE (Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics)

O A-ParaDDisE é um Projeto do tipo Consórcio Colaborativo Internacional financiado pela Comunidade Europeia que baseia-se no desenvolvimento de novas drogas com alvos epigenéticos voltados para o tratamento de esquistossomose, leishmaniose, doença de Chagas e malária. O alvo é o desenvolvimento de inibidores das principais enzimas modificadoras de histona (HME), em particular aqueles que estão envolvidos na acetilação/deacetilação e metilação/desmetilação. Neste consórcio, diferentes pesquisadores disponibilizaram bibliotecas de compostos potenciais inibidores de HMEs para serem testados contra os parasitos causadores das doenças alvo. Buscando validar as enzimas alvo como novos alvos para o tratamento e desenvolver inibidores específicos como candidatos a novas drogas (<https://research.pasteur.fr/en/project/fp7-a-paraddise-anti-parasitic-drug-discovery-in-epigenetics/>. Acesso em 03 de setembro 2017).

O grupo coordenado pela Profa. Juliana Lopes Rangel Fietto, da Universidade Federal de Viçosa participa do consórcio e tem como um dos objetivos a validação de possíveis iHDACs contra *L. braziliensis*. Este trabalho irá mostrar dados relativos à busca de iHDACs disponibilizados pelo consórcio capaz de diminuir a infecção *in vitro* de *L. braziliensis* em macrófagos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a ação de compostos inibidores de HDACs como possíveis alvos contra *L. braziliensis*.

3.2. Objetivos específicos

1. Avaliar a toxicidade dos compostos inibidores de HDACs na célula hospedeira modelo deste estudo (macrófagos Raw 264.7).
2. Avaliar a ação de compostos inibidores de HDACs não tóxicos para a célula hospedeira, em formas amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* em infecção de macrófagos Raw 264.7.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente estudo foram utilizadas células de macrófagos da linhagem Raw. 264.7 e *L. braziliensis* da Cepa M2904 para a avaliação da ação dos compostos. Os compostos testados foram enviados pelo Dr. *Wolfgang Sippl*, da *Martin Luther Universität Halle- Wittenberg* (MLU) da Alemanha.

4.1.Células de macrófagos da linhagem Raw.264.7

As amostras das células de macrófagos da linhagem Raw 264.7 são provenientes do banco de células ATCC (<http://www.atcc.org/>).

4.2.Meio de cultivo das células de macrófagos Raw.264.7

O meio de cultivo que se utilizou para a manutenção das células de macrófagos da linhagem Raw. 264.7, foi o RPMI completo (RPMI-1640, *Sigma-Aldrich*), que foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (LGC Biotecnologia), penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation), L-glutamina (2 mM) (Serva), e HEPES (1 M) (*Fisher Scientific*) e foi ajustado o pH para 7,5 e filtrado em membrana de 0,22 µm.

Além do RPMI completo foi utilizado o meio RPMI base que não foi suplementado com soro fetal bovino, e sem L-glutamina e penicilina, que foi utilizado para a lavagem das células, todos os meios foram mantidos na geladeira até o uso.

4.3.Manutenção dos macrófagos Raw.264

Primeiramente as células de macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram descongeladas nos criotubos de nitrogênio líquido (*Thermo Scientific*) e colocadas para recuperar em estufa de CO₂ (*Forma Series II Water-Jacketed CO₂ Incubators, Thermo Scientific*) a 37 °C até que a amostra estivesse descongelada. Posteriormente, 1mL de cultura de macrófagos presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de cultura de 250 mL, onde foram adicionados 10 mL de meio RPMI completo. As células foram então incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C até que se recuperaram. O tempo de recuperação dos macrófagos foi em torno de 12-15 dias.

Após a recuperação e a formação da monocamada de células, ou seja, após as mesmas atingirem confluência, o meio RPMI completo das garrafas foi

descartado com o auxílio de uma pipeta de vidro, e os repiques foram feitos de 2 em 2 dias com a contagem de 50.000 macrófagos/mL.

Para o congelamento das células de macrófagos Raw 264.7, se iniciou com a remoção de 8 mL de RPMI completo dos 10 mL da garrafa de 250 mL e só ficando 2 mL de meio e as células de macrófagos ficaram aderidas à superfície plástica da garrafa. Em seguida, 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 10X em PBS e azul de tripan) 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 250 mL foram então transferidos para um tubo Falcon estéril de 50 mL, onde foram adicionados 5 mL de meio de congelamento, composto por RPMI completo com 5% DMSO (Dimetilsulfóxido; *Neon*) esterilizado. Logo após, foram alíquotados 1 mL em cada um dos 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.

4.4. *L. braziliensis* cepa M2904

Os parasitos de *L. braziliensis* cepa M2904 utilizada no presente estudo foram cedidos pelo professor Dr. Luis Carlos Crocco Afonso da Universidade Federal de Ouro Preto.

4.5. Meio de cultivo de *L. braziliensis* cepa M2904 WT.

Os parasitos de *L. braziliensis* cepa M2904 na forma de promastigota, foram mantidas em meio Grace's completo (*Grace's Insect medium*, Sigma), que foi suplementado com 10% SFB inativado (LGC Biotecnologia), penicilina (100 µg/mL) (USB Corporation), L-glutamina (2 mM) (Serva), e o pH foi acertado para pH 6,5 e logo após foi filtrado em membrana de 0,22 µm, o meio foi mantido na geladeira até o uso.

4.6. Manutenção de *L. braziliensis* cepa M2904

Para o descongelamento dos parasitos de *L. braziliensis* M2904, dos criotubos, primeiramente, foram retirados do nitrogênio líquido, e deixados à temperatura ambiente até o descongelamento, posteriormente, 1mL de cultura de *L. braziliensis* presente no criotubo foi transferido para uma garrafa de

cultura de 50 mL, onde foram adicionados 10 mL de meio Grace's completo. As células foram então incubadas em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25 °C até a sua recuperação. O tempo de recuperação das células foi em torno de 3 – 7 dias, que foi acompanhada pelo microscópio convencional.

Após esse tempo, foram realizados entre quatro e cinco dias os repiques de manutenção com a contagem de 1×10^5 células/mL em Câmara de Neubauer e incubados em estufa B.O.D (Incubadora B.O.D 411D – Nova Ética) a 25 °C.

O congelamento de *L. braziliensis* M2904, foi realizado da seguinte forma: os parasitos foram mantidos nas garrafas de cultura de 50 mL em meio Grace's completo, e foram contados em Câmara de Neubauer (diluição de 25X 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 Falcon estéril de 50 mL e o volume total foi centrifugado (*HERAEUS Multifuge X 1R, Thermo Scientific*) a 3000 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos. O *pellet* obtido foi ressuspensionado em 5 mL de meio de congelamento, composto por Grace completo com 6,5% de DMSO (Dimetilsulfóxido; *Neon*) estéril, e posteriormente se alíquotaram 1 mL nos criotubos. Em seguida, os criotubos foram colocados: 1 hora na geladeira, 24 horas no freezer a -20 °C, por 24 horas no freezer -80 °C e por fim, armazenados em nitrogênio líquido (*Thermo Scientific*).

4.7. Curva de crescimento dos parasitos

Foram preparadas três garrafas de cultura celular 50 mL contendo *L. braziliensis* M2904 em 10 mL no meio descrito acima para cultivo dos parasitos, com quantidade inicial de 1×10^5 promastigotas em três garrafas. Foram feitas três contagens diárias em cada garrafa na câmara de Neubauer durante oito dias, com intervalos de 12 h entre cada contagem. O valor diário da população de parasitos foi obtido pelas médias aritméticas das contagens. A curva de crescimento parasitário foi construída utilizando o software *GraphPad Prism*. 6.1.

4.8. Avaliação da ação dos compostos

Para a avaliação da ação dos compostos foi utilizado o método da resazurina que é um composto colorido que muda de cor devido a atividade celular, e que é utilizada em diversos bioensaios *in vitro* realizados atualmente, como por exemplo, na determinação de viabilidade celular, quantificação/proliferação de organismos vivos, função mitocondrial, citotoxicidade, toxicologia, entre outros (RÓLON et al., 2006). Tal mudança de coloração se deve ao fato do reagente ser metabolizado pelas células no meio. A resazurina, de cor azul (em sua forma oxidada), é reduzida a resofurina, de cor rosa.

A resazurina utilizada no projeto (Sigma Aldrich, Mw: 251.17 g/mol) foi preparada a 1 mM 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. Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos Raw. 264.7

Para avaliar a ação dos compostos nos macrófagos Raw 264.7, foram utilizadas as placas de 96 poços. Primeiramente foram desaderidos os macrófagos das garrafas com a ajuda do espalhador de células e colocadas nos tubos falcon e logo foram contadas na Câmara de Neubauer com a ajuda de azul de tripan (diluídas a 10X) para a determinação do número de macrófagos/mL.

Após a contagem dos macrófagos se fez o plaqueamento das células na quantidade de 1×10^5 de macrófagos/poço e junto com as células foi acrescentado o meio RPMI completo, chegando a um volume final de 200 μ L/poço e incubadas as placas na estufa de CO₂ a 37 °C. por 24 h.

Após 24 h as placas foram lavadas 3 x com 100 μ L/poço de RPMI base e logo após foi adicionado 200 μ L/poço de RPMI completo e foram acrescentados os compostos na quantidade de 4 μ L (das soluções de uso a 500 μ M) e também foi acrescentado 4 μ L de DMSO (5%) (controle negativo) e 2,5 μ L de anfotericina B 250 μ g/mL = 3,33 μ M, concentração estipulada por BASTOS (2017) (controle positivo); e um controle para avaliar o crescimento dos macrófagos na ausência de drogas, contendo apenas macrófagos e meio RPMI completo e todos os ensaios foram feitos em quadruplicata interna das amastigotas e triplicata biológica experimental.

Depois da adição dos compostos e dos controles, as placas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C por 47 h. Após 47 horas as placas foram retiradas da estufa e em cada poço foram adicionados 20 µL de resazurina, sendo a placa incubada novamente em estufa de CO₂ por mais 1 hora.

Concluídas as 48 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.

$$\text{Redução da resazurina} = [A570 - (A600 \times R0)],$$

Nessa fórmula, A570 significa a absorbância da resazurina a 570 nm, A600 equivale à absorbância da resazurina a 600 nm, e R0 é um fator de correção (branco), representado pela média das absorbâncias do controle negativo contendo somente meio RPMI e no caso da infecção é o Grace`s completo com resazurina (em quadruplicata). A porcentagem de células viáveis foi calculada segundo a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Células viáveis} = [A570 - (A600 \times R0) \text{ Tratado}] \times 100 / \text{Média}[A570 - (A600 \times R0)] \text{ Não tratado}$$

O protocolo acima descrito foi padronizado pelo Pesquisador Dr. Matheus Silva e Bastos.

4.10. Ensaio de infecção *in vitro* e teste de toxicidade em amastigotas de *L. braziliensis* M2904

O ensaio de infecção *in vitro* foi realizado com a montagem dos magrofaços Raw 264.7 nas placas de 96 poços, o procedimento de montagem das células de macrófago é o mesmo do item 4.9.

Os parasitas encontrados nas garrafas de 50mL nas formas promastigotas totais de fase estacionária de *L. braziliensis* M2904, foram transferidas para os tubos Falcon de 50 mL estéreis e foram centrifugadas a 3000 rpm a 4 °C por 10min. O *pellet* obtido foi suspenso em 5 mL de RPMI completo, então as células foram contadas em Câmara de Neubauer 1,5 x10⁶/poço de *Leishmanias* para fazer a contagem das células foi feita a diluição de 25X em formalina e colocadas na concentração de 4%.

As placas de 96 poços contendo macrófagos e previamente incubadas por 24 h, foram lavadas 3 x com 100 µL/poço de RPMI base e logo foi feita a

infecção com a proporção de 15 *Leishmanias* para um macrófago e esta foi incubada novamente em estufa de CO₂ por mais 24 horas.

Após esse tempo, as placas foram lavadas 3 x com 100 µL/poço de RPMI base e logo após foi adicionado 200 µL de RPMI completo por poço e estas foram incubadas por outras 24 horas em estufa de CO₂.

Decorridas as 24 horas, o meio RPMI completo metabolizado foi substituído por meio novo de RPMI completo e foram adicionados nas placas 4 µL dos compostos (das soluções de uso a 500 µM, concentração final de 10 µM), e também foi adicionado 4 µL de DMSO (5%) (controle negativo) e 2,5 µL de anfotericina B (250 µg/mL) (controle positivo). Foram usados dois controles para avaliar o crescimento dos macrófagos, um não infectado e o outro infectado e todos em quadruplicata, logo a placa foi incubada na estufa de CO₂ por 48 horas.

Trascorridas as 48 horas, as placas foram retiradas da estufa, retirado o RPMI dos poços e posteriormente foram adicionados 50 µL por poço da solução de lise (RPMI base + SDS 0,05%) e a placa foi deixada por 30 a 40 minutos à temperatura ambiente. A lise foi acompanhada por microscopia convencional. Após o tempo necessário para a lise somente dos macrófagos, foram adicionados 150 µL de meio Grace's completo/poço nas placas e estas foram vedadas com *Parafilm* e incubadas em estufa B.O.D a 25 °C por 3 a 7 dias dependendo da recuperação das promastigotas de leishmania, na quantidade de 4X10⁶ por poço.

Subsequentemente a placa foi retirada da estufa e em cada poço foram adicionados 20 µL de resazurina, sendo as placas incubadas novamente em estufa B.O.D por mais 1 hora. Após esse tempo, as placas foram lidas em leitora de microplacas (Spectramax M5) a 570 nm e 600 nm, A porcentagem de redução da resazurina, foi avaliada e calculada segundo a fórmula do item 4.9.

4.11. Análise dos dados

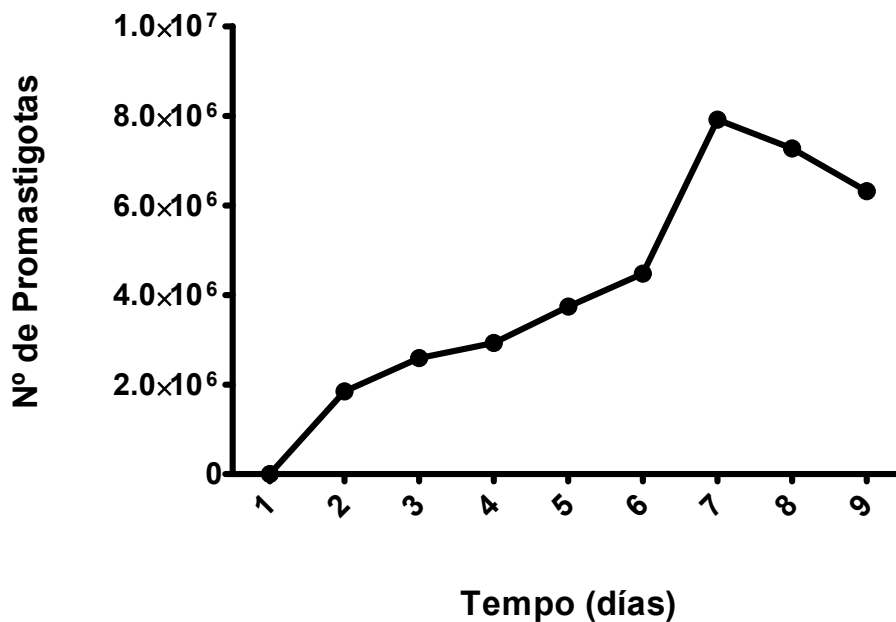
Para análise dos resultados deste trabalho, foi utilizado a análise estatística, Teste T de Student não pareado bicaudal usando o programa GraphPad Prisma, versão 6.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curva de Crescimento de *L. braziliensis* M2904

Para determinar o perfil de crescimento dos parasitos em meio líquido a 25°C, foi estabelecida a curva de crescimento conforme descrito na metodologia. De acordo com os resultados obtidos, os parasitos se encontram em fase logarítmica de crescimento até o sexto dia de cultura, passando então para a fase estacionária (Figura 10). De acordo com este experimento foi definido que todo o repique para manutenção da cultura seria realizado até o quinto dia de crescimento, enquanto as promastigotas do início da fase estacionária (sexto dia de cultura) seriam utilizadas para a infecção de macrófagos.

Figura 10. Curva de crescimento *in vitro* de *L. braziliensis* em meio líquido



A Curva de crescimento *in vitro* de *L. braziliensis* em meio líquido. Os parasitos foram cultivados na concentração inicial de 1×10^5 utilizando formas promastigotas em fase logarítmica, em meio Grace completo. A quantificação dos parasitos foi realizada por 9 dias. A curva representa o resultado de três experimentos independentes.

5.2. Teste de toxicidade dos compostos em células de macrófagos. Raw 264.7

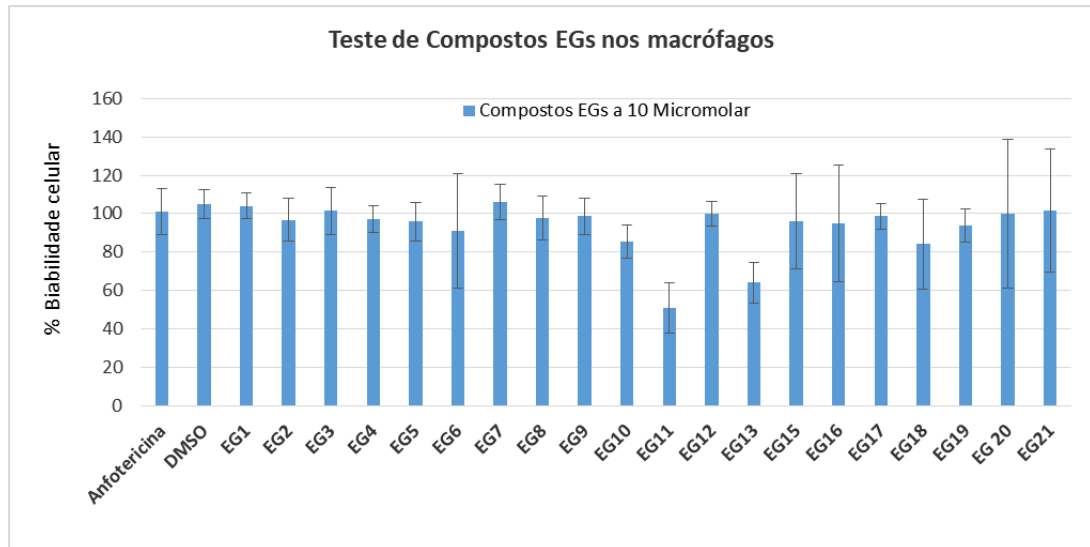
Para analisar a ação dos compostos em macrófagos Raw 264.7, os compostos foram testados a uma concentração de 10 μ M (concentração estipulada pelo projeto A-ParaDDise) e o seu efeito foi avaliado pelo método da resazurina de 48 horas. Na placa também foram colocados os controles (Anfotericina B-controle positivo e DMSO-controle negativo) todos os compostos foram testados em quadruplicata dentro de cada experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados.

Os compostos avaliados foram enviados pelo Dr. *Wolfgang Sippl*, da *Martin Luther Universität Halle- Wittenberg* (MLU), na Alemanha. No total foram testados 41 compostos, 22 compostos pertencem ao grupo denominado EGs, 6 compostos do grupo ATb2, 9 compostos do grupo THs, e 4 compostos ao grupo NHs, como são mostrados nas figuras 10, 11, 12.

Para a avaliação da toxicidade dos compostos contra as células de macrófagos Raw 264.7. Foi utilizado o método da resazurina (% redução da resazurina $\geq 85 \pm$ SD, considerando o máximo de toxicidade apresentado pela droga leishmanicida controle Anfotericina B).

Na figura 11 pode-se observar que os compostos EG6, EG15, EG16, EG18, EG20, EG21 obtiveram um desvio padram alto, que foram repetidos no seguinte experimento, mostrado na figura 12.

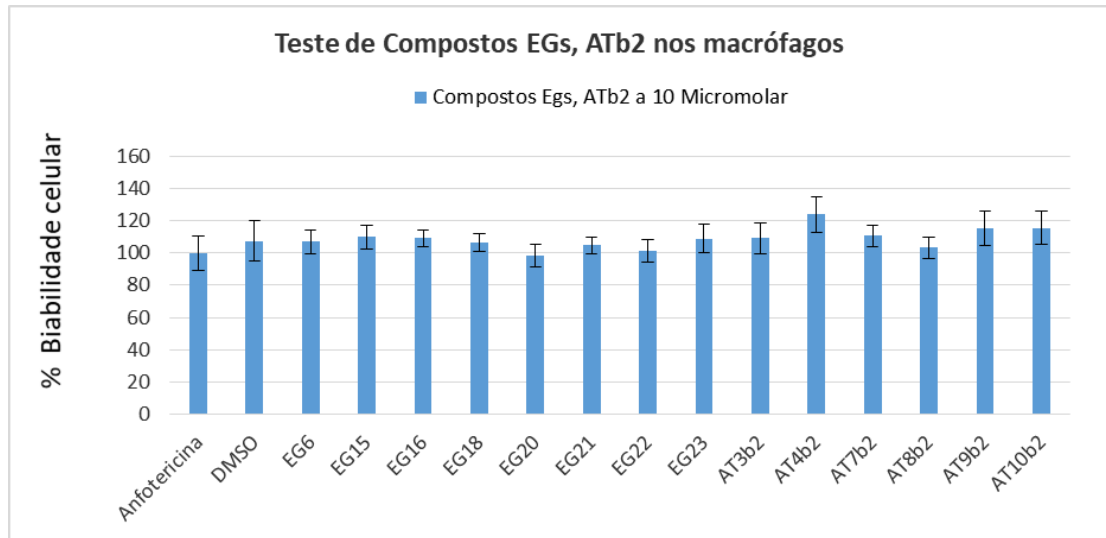
Figura 11. Teste de compostos EGs nos macrófagos Raw. 264.7



Ação dos compostos EGs a 10 µM em macrófagos Raw 264.7, com 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 do gráfico são referentes à média calculada para cada composto e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Foi considerando como padrão de máxima toxicidade o valor da média de % de redução da resazurina em relação ao controle Anfotericina B, visto que esta é a droga controle tóxica para *leishmania* e considerada não tóxica para células hospedeiras como os macrófagos (% redução da resazurina = 98 ± 9 SD). Assim, é possível comparar e observar que o efeito do composto EG11 (% redução da resazurina = 50 ± 13 SD) foi considerado muito tóxico para os macrófagos, e os compostos EG13 (% redução da resazurina = 64 ± 10 SD) e o composto EG10 (% redução da resazurina = 85 ± 8 SD) também foram considerados tóxicos para os macrófagos. Dessa forma, esses compostos não foram levados para posteriores análises na infecção.

Na figura 12 mostra-se novos dados para os compostos EG6, EG15, EG16, EG18, EG20, EG21 que apresentaram um desvio padrão alto na figura 11, com estes compostos foram feitos outro experimento junto aos compostos ATb2 e o desvio padrão de todos eles foram aceitáveis.

Figura 12. Teste de compostos EGs, ATb2 nos macrófagos Raw. 264.7

Ação dos compostos EGs, ATb2, a 10 μ M em macrófagos Raw 264.7, com 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 do gráfico são referentes à média calculada para cada composto e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

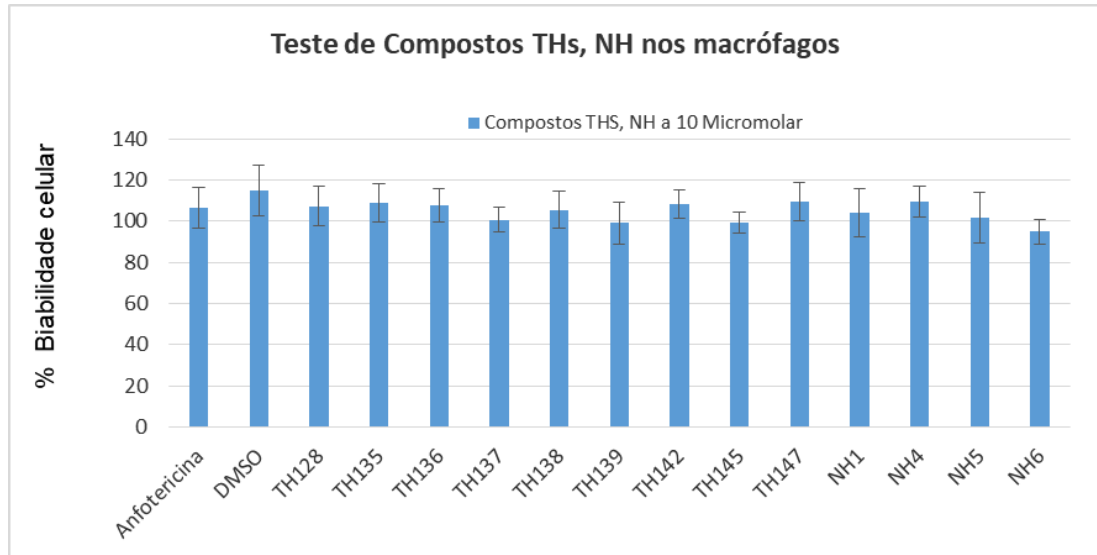
Considerando-se, também o valor da média de % de redução da resazurina neste experimento para a Anfotericina (% redução da resazurina = 99 ± 10 SD) os compostos foram então analisados quanto á toxicidade. Os compostos AT4b2, AT9b2 e AT10b2 obtiveram uma média da redução da resazurina alta (% redução da resazurina = 123, 115, e $115 \pm 11, 10, 10$ de SD, respectivamente). Isto sugere que estes compostos de alguma forma beneficiaram a proliferação dos macrófagos em relação ao controle, e assim não foram consideradas tóxicos para os macrófagos.

Também pode-se observar e comparar os efeitos dos demais compostos, que a redução da resazurina se encontra entre (% redução da resazurina = 98 a 110 ± 5 a 11 SD), então, considerando o máximo de toxicidade apresentado pela droga leishmanicida controle Anfotericina B, os compostos não foram considerados tóxicos para os macrófagos.

Na figura 13 foram testados os compostos pertencentes aos grupos THs, e NHs, que consideraram o valor da média de % de redução da resazurina da Anfotericina (% redução da resazurina = 106 ± 9 SD). O composto NH6 apresenta (% redução da resazurina = 94 ± 5 SD) e todos os outros compostos ficaram na (% redução da resazurina = $99 - 109 \pm 5 - 12$ SD).

Como se pode observar todos os compostos da figura 13, foram considerados não tóxicos para os macrófagos.

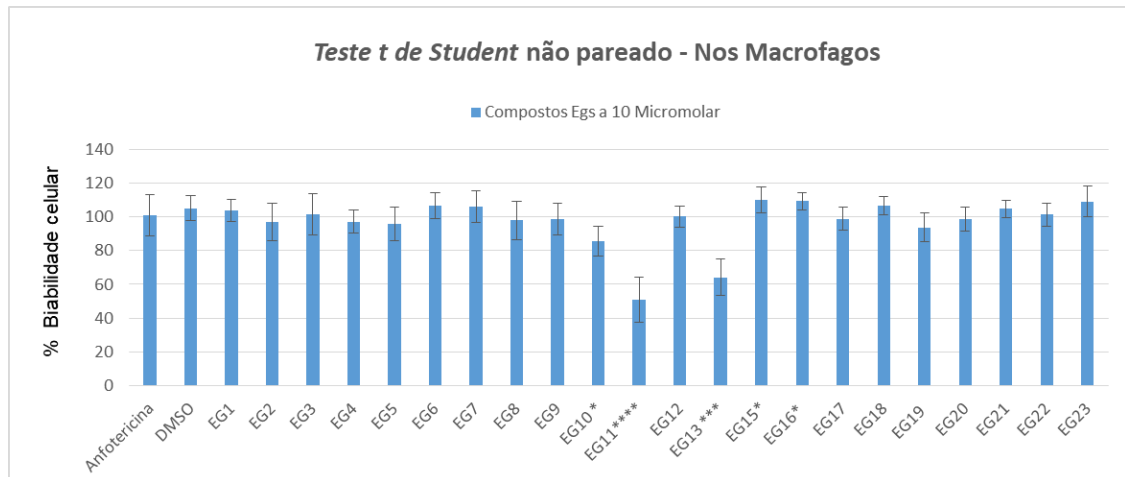
Figura 13. Teste de compostos THS, NHs nos macrófagos Raw. 264.7



Ação dos compostos THs, NHs a 10 μM em macrófagos Raw 264.7, com 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 do gráfico são referentes à média calculada para cada composto e as barras acima de cada coluna indicam o desvio-padrão dos experimentos.

Posteriormente, ainda avaliando os efeitos tóxicos dos compostos em macrófagos após 48 horas, se realizou Teste t de *Student* não-pareado bicaudal para avaliar de forma estatística a toxicidade dos compostos em macrófagos comparando-as com a toxicidade da Anfotericina B. É preciso deixar claro que o Teste t de *Student* não-pareado bicaudal, foi realizado após se ter terminado os experimentos deste trabalho, inclusive aqueles de infecção. Os resultados são apresentados nas figuras 14 e 15.

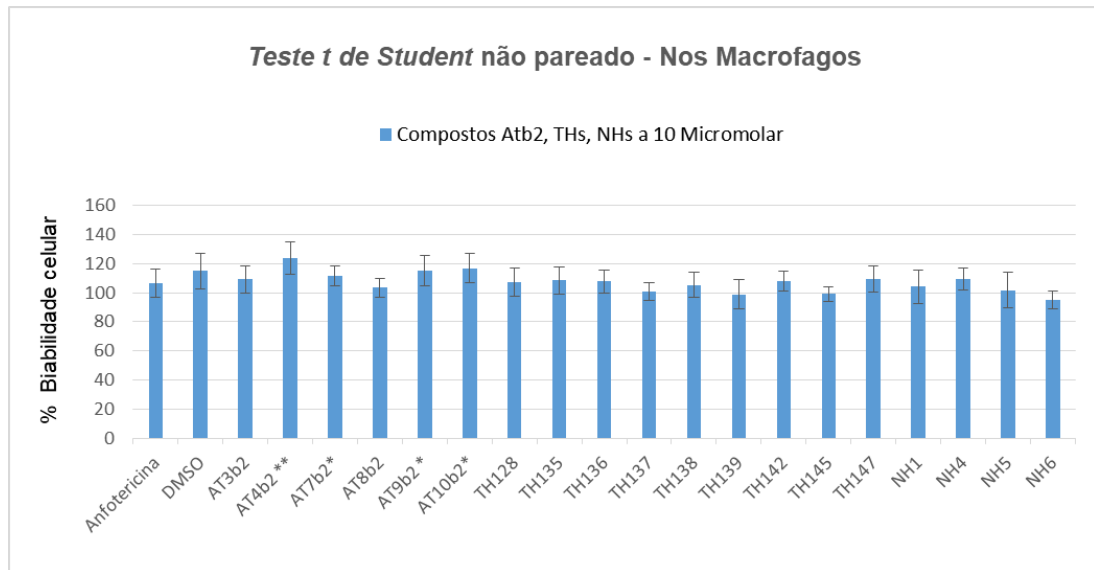
Figura 14. Macrófagos com compostos EGs e Teste t de Student não pareado bicaudal



Análise estatística para verificar a significância dos efeitos tóxicos dos compostos EGs a 10 μ M em macrófagos Raw 264.7, para o análises foi utilizado o teste t de *Student* não-pareado bicaudal fazendo um comparativo da toxicidade da Anfotericina B e os respectivos compostos, onde mostram os dados significativamente diferentes do controle Anfotericina B que foram marcados com asteriscos: **** $P \leq 0,0001$; ** $P \leq 0,01$, * $p < 0,05$.

Na tabela 3 e na figura 14 é possível observar, que houve uma atividade tóxica significativa no efeito do composto EG11 e EG13 em macrófagos, o que confirma os resultados apresentados pela redução da resazurina (% redução da resazurina = 50 e 64 \pm 13 e 10 SD). No composto EG10 estatisticamente apresentou uma leve toxicidade (% redução da resazurina = 85 \pm 8 SD), foi considerando tóxico comparado à droga leishmanicida controle Anfotericina B, e foi inabilitado para os seguintes ensaios. Os compostos EG15 e EG16 mostraram estatisticamente diferentes do controle, porém com desvio para maior atividade de redução da resazurina, mais por que eles apresentaram (% redução da resazurina = 109 e 111 \pm 7 e 6 SD) podendo significar que induzem à proliferação ou aumento do metabolismo dos macrófagos, assim não são realmente tóxicos para estes. Os demais compostos não apresentaram atividade tóxica significativa contra os macrófagos, e deram continuidade nas seguintes análises.

Figura 15. Macrófagos com compostos ATb2, THs, NHs e Teste t de Student não pareado bicaudal

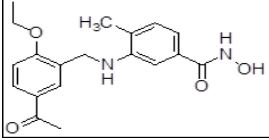
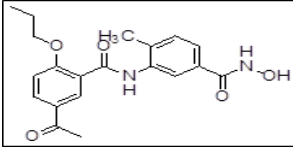
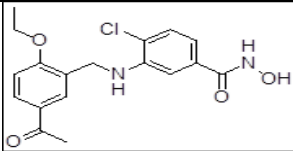


Análise estatística para verificar a significância dos efeitos tóxicos dos compostos ATb2, THs, e NHs a 10 μ M em macrófagos Raw 264.7, para o análise foi utilizado o teste t de *Student* não-pareado bicaudal fazendo um comparativo da toxicidade da Anfotericina B e os respectivos compostos, onde mostram os dados significativamente diferentes do controle Anfotericina B que foram marcados com asteriscos: **** $P \leq 0,0001$; ** $P \leq 0,01$, * $p < 0,05$.

Na figura 15 podemos observar o Teste t de *Student* não-pareado bicaudal dos compostos ATbs, THs, NHs, que mostra que o composto AT4b2 apresenta-se estatisticamente diferente do controle (% redução da resazurina = 123 ± 11 SD), sendo não tóxico e provavelmente favorecendo aos macrófagos, sendo assim confirmado para seguir aos seguintes ensaios. O mesmo ocorreu com os compostos AT7b2, AT9b2 e AT10b2 com (% redução da resazurina = $111, 115$ e $116 \pm 7, 10$ e 10 SD).

A tabela 3 mostra a estrutura dos compostos que foram tóxicos para os macrófagos e os dados numéricos do teste da resazurina.

Tabela 3 - Estrutura química dos compostos EG10, EG13, EG11.

Composto	Estrutura	Macrophage Raw 264.7(48 hours) (10 μ M)	SD
EG10		85,52	8
EG13		64,14	10
EG11		50,94	13

Estrutura química dos compostos EG10, EG13, EG11, mostra a estrutura dos compostos que foram tóxicos para os macrófagos e os dados numéricos do teste da resazurina.

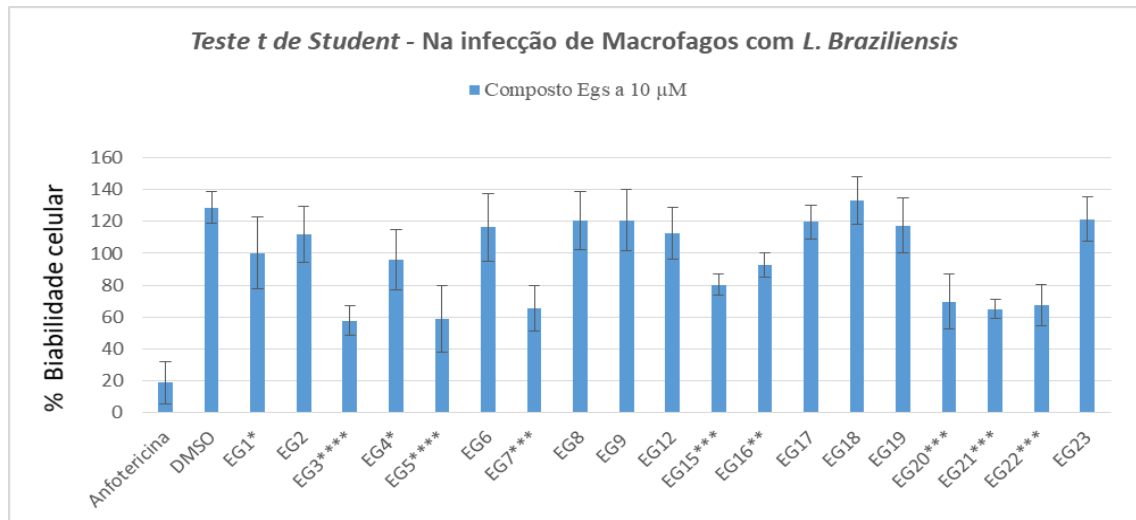
5.3. Efeito dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* M294 em infecção de macrófagos Raw 264.7

Os ensaios realizados na infecção também foram realizados nas placas de 96 poços. Nestes ensaios, os promastigotas totais, contendo formas metacíclicas infecciosas, primeramente infectam a cultura de macrófagos. Depois da infecção, esta é tratada com os compostos na concentração de 10 μ M por 48 horas e posteriormente os macrófagos são lisados para liberar os amastigotas intracelulares. Assim os ensaios são novamente incubados em estufa B.O.D a 25°C pelo menos 3 a 6 dias para que se transformem novamente em promastigotas e repliquem, com a finalidade de realizar a leitura.

O método utilizado foi também da redução da resazurina de 48 horas e o resultado da ação dos compostos foi 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, os resultados são mostrados junto ao Teste t de *Student* não-pareado bicaudal na figura 16.

Figura 16. Infecção de macrófagos com *L. Braziliensis* e tratados com compostos EGs



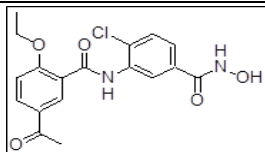
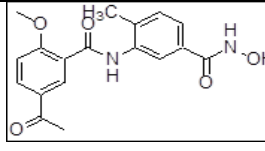
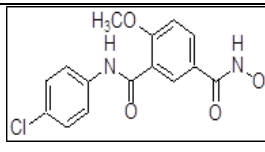
Ação dos compostos EGs a 10 μ M na infecção de *L. braziliensis* M2904 em macrófagos Raw 264.7, os compostos foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Mostrando a ação leishmanicida das drogas, comparando o DMSO com os compostos. O análise estatístico utilizado foi o teste t de *Student* não-pareado bicaudal, onde mostram dados significativamente diferentes do controle DMSO que foram marcados com asteriscos: **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $p < 0,05$.

Após terem sido selecionados os compostos a partir das análises de % redução da resazurina $\geq 85 \pm$ SD de toxicidade em macrófagos Raw 264.7, os compostos agora passam a ser avaliados pelos seus efeitos leishmanicidas em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. A figura 16, também mostra o Teste t de *Student* não-pareado bicaudal, com o objetivo de verificar se o efeito leishmanicida era realmente devido à ação dos compostos ou do diluente dos compostos do DMSO (controle negativo).

Como mostra a figura 16, se pode observar que o composto EG3 (inibição da viabilidade do parasito 55%), EG5 (55%) e EG21 (50%) estatisticamente e pela porcentagem da redução da resazurina são os compostos com maiores efeitos leishmanicidas (indica que o IC_{50} deve ser próximo ou menor que 10 μ M), seguidos dos compostos EG7 (49%), EG22 (47%) e EG20 (46%) com efeitos leishmanicidas, e por últimos os compostos EG15 (38%), EG16 (28%), EG4 (25%) e EG1(22%). Desta forma podemos inferir que todos esses compostos tiveram atividade leishmanicida comparadas ao controle negativo do DMSO, e os demais compostos tiveram efeito leishmanicida $< 12\%$. Na figura também se pode observar o controle positivo da Anfotericina B que teve (inibição da viabilidade do parasito 86%). Dessa

forma, podemos inferir que a droga controle positivo continua tendo maior atividade leishmanicida. Comparando as estruturas dos compostos que obtiveram $\geq 50\%$ podemos observar na tabela 4 que eles têm em comum o grupo ácido hidroxâmico, ligado a um anel benzênico com diferentes substituições (cloro, metil ou éter), ligado por uma amida a um outro grupo volumoso contendo outro anel benzênico com substituições do tipo éter em diferentes posições.

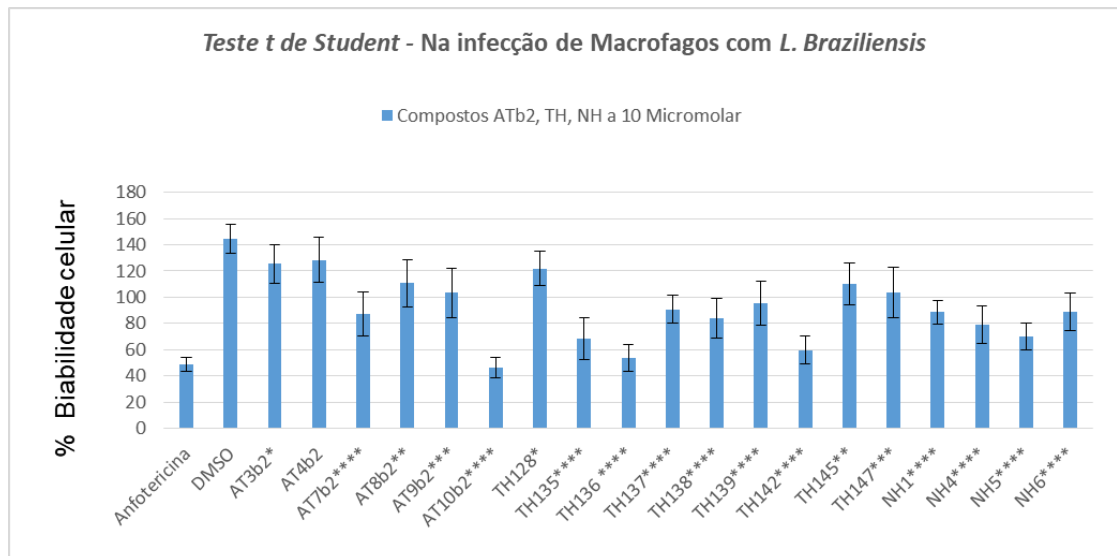
Tabela 4. Estrutura química dos compostos EG3, EG5 e EG21

Composto	Estrutura
EG3	
EG5	
EG21	

Estrutura química dos compostos EG3, EG5 e EG21 mostrando um grupamento comum de ácido hidroxâmico, ligado a um anel benzênico com diferentes substituições (cloro, metil ou éter).

Na figura 17 também mostra o Teste t de *Student* não-pareado bicaudal para verificar os efeitos leishmanicidas dos compostos do grupo ATbs, O composto com maior efeito toxico foi AT10b2 (68%), seguida dos compostos AT7b2(40%) e por último os compostos AT9b2 (29%) e AT8b2 (24%), todos estess composto além de terem uma atividade leishmanicida, também apresentam uma leve toxicidade nos macrófagos, podendo-se recomendar uma nova análise, a fim de confirmar os efeitos leishmanicidas. O AT3b2 (13%), com efeito leve. E o composto AT4b2 estatisticamente não teve efeito podendo concluir que é um composto sem efeitos para as amastigotas intracelulares.

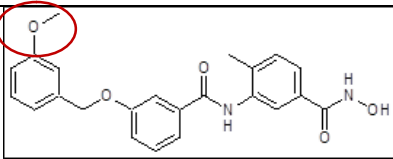
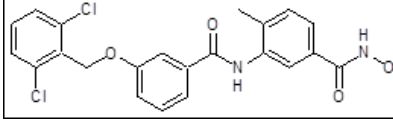
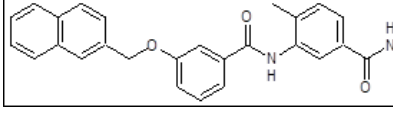
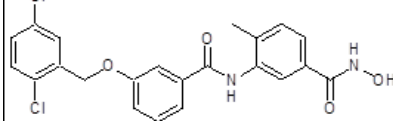
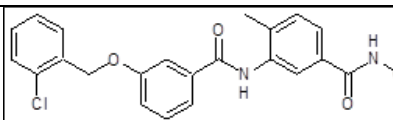
Figura 17. Infecção de macrófagos com *L. Braziliensis* e tratados com compostos ATb2, THs, NHs.



Ação dos compostos ATb2, THs e NHs a 10 μM na infecção de *L. braziliensis* M2904 em macrófagos Raw 264.7, os compostos foram testados em quadruplicata dentro do mesmo experimento e pelo menos três experimentos independentes foram realizados. Mostrando a ação leishmanicida das drogas, comparando o DMSO com os compostos. O análise estatístico utilizado foi o teste t de *Student* não-pareado bicaudal, onde mostram dados significativamente diferentes do controle DMSO que foram marcados com asteriscos: **** $P \leq 0,0001$; *** $P \leq 0,001$, ** $P \leq 0,01$, * $p < 0,05$.

Na tabela 5 as estruturas dos compostos ATb2, podemos observar que os compostos pertencem à categoria dos Ácidos Hidroxâmicos. E comparando as estruturas dos compostos de AT10b2 com maior atividade leishmanicida com o resto das estruturas dos compostos, podemos notar que o AT10b2 tem um grupamento éter unido ao benzeno, que pode ser que ele tenha alguma atividade que favoreça o efeito leishmanicida.

Tabela 5. Estrutura química dos compostos ATb2

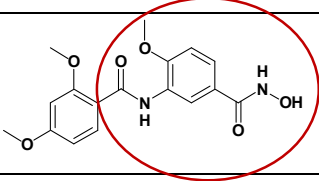
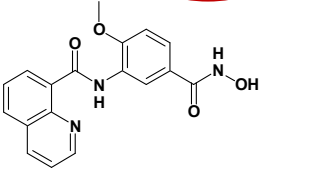
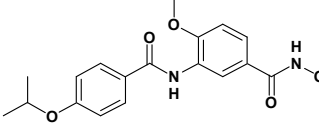
Composto	Estrutura
AT10b2	
AT7b2	
AT9b2	
AT8b2	
AT3b2	

Estrutura química dos compostos ATb2. Mostra a estrutura do composto AT10b2 com maior atividade leishmanicida com o resto das estruturas dos compostos, podemos notar que o AT10b2 tem um grupamento éter unido ao benzeno, que pode ser que ele tenha alguma atividade que favoreça o efeito leishmanicida.

Continuando com os resultados, agora passaremos ao grupo dos THs, os compostos com atividade maior do que 50% (indica que o IC₅₀ deve ser próximo ou menor que 10µM), são os compostos TH136(63%), TH142(59%), e TH135(53%), e os que se seguem são TH138(42%), TH137(37%), TH139(34%), estes compostos estatisticamente podemos considerar com efeitos leishmanicidas. Nestes testes a Anfotericina B apresenta 66% de inibição do parasito. Dessa forma podemos observar que apesar de o controle positivo ainda tem melhor atividade leishmanicida estes compostos foram os que mais se assemelharam ao controle Anfotericina B.

Na tabela 6 dos THs podemos fazer um comparativo das estruturas dos três compostos que tiveram um efeito leishmanicida maior a 50%, e podemos observar a estrutura circulada igual que talvez seja importante para que tenham atividade leishmanicida.

Tabela 6. Estrutura química dos compostos THs

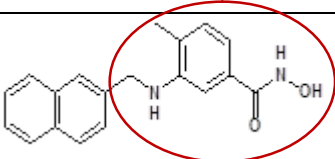
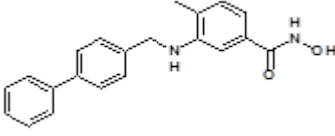
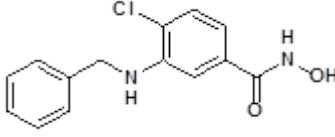
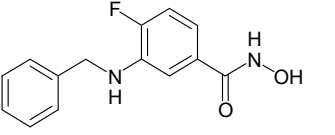
Composto	Estrutura
TH136	
TH142	
TH135	

Estrutura química dos compostos THs. Mostra um comparativo das estruturas dos três compostos que tiveram um efeito leishmanicida maior a 50%, podendo observar a estrutura circulada igual entre eles que talvez seja importante para que tenham atividade leishmanicida.

Ainda continuando com os resultados, passaremos ao grupo dos NHs, os compostos NH5(52%), NH4(45%), NH1(39%) e NH6(39%) foram considerados com atividade leishmanicida. Todo este grupo de compostos podemos comparar com o controle positivo da Anfotericina B (66%), podemos concluir que o controle positivo continua tendo maior atividade leishmanicida.

Comparando as estruturas dos compostos NHs, da tabela 7 podemos observar que os dois compostos com maior atividade leishmanicida tem um grupamento circulado na tabela iguais. Além disso o composto NH5 apresenta um grupamento naftaleno que é um grupamento tóxico e pode ser que tenha ajudado na atividade leishmanicida.

Tabela 7. Estrutura química dos compostos NHs

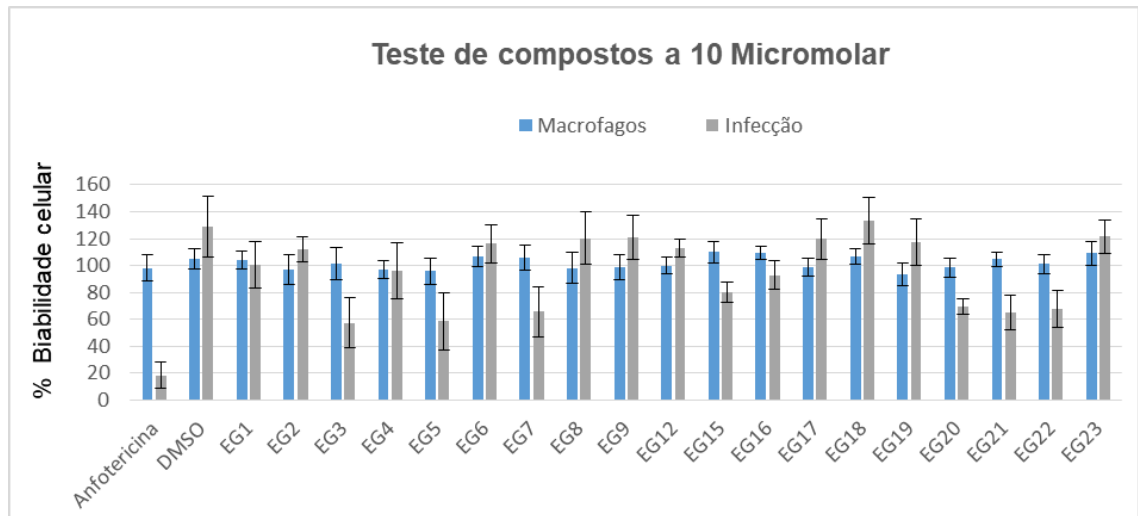
Compostos	Estrutura
NH5	
NH4	
'NH1	
NH6	

Estrutura química dos compostos NHs. Pode ser observada os dois compostos com maior atividade leishmaicida. Apresentaram grupamentos iguais. Além disso o composto NH5 possui grupamento naftaleno que é tóxico e pode ter ajudado na atividade leishmanicida.

Por último temos duas figuras mostrando um comparativo dos efeitos dos compostos nas células de macrófagos e seu efeito nas amastigotas intracelulares, como podemos observar nas figuras 18 e 19.

Na figura 18 mostra-se que tem compostos com efeitos leishmanicidas como: EG1, EG3, EG4, EG5, EG7, EG15, EG16, EG20, EG21, EG22 e também pode-se observar que tem compostos que não tiveram atividade leishmanicida estatisticamente como os compostos EG2, EG6, EG8, EG9, EG12, EG17, EG18, EG19 e EG23.

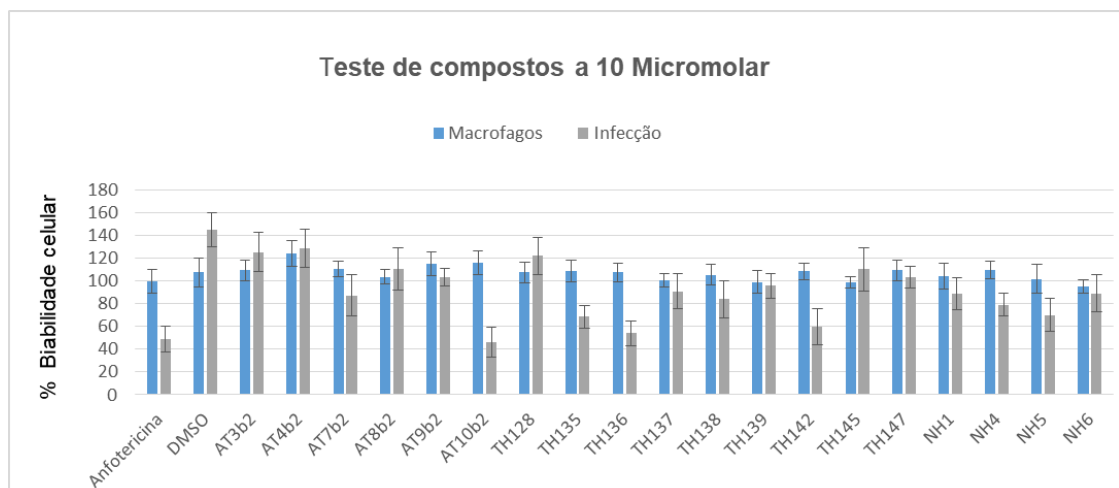
Figura 18. Comparativo da ação dos compostos EGs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de *L. braziliensis* M2904



Comparativo da ação dos compostos EGs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de *L. braziliensis* M2904, mostrando os efeitos da atividade leishmanicidas e proliferativa dos compostos.

Na figura 19 mostra-se o comparativo dos compostos ATb2, THs e NHs. Aqui também se pode avaliar que compostos AT4b2, não teve ação leishmanicida estatisticamente e o resto dos compostos apresentam efeitos leishmanicidas.

Figura 19. Comparativo da ação dos compostos ATb2, THs e NHs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de *L. braziliensis* M2904



Comparativo da ação dos compostos ATb2, THs e NHs em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de *L. braziliensis* M2904, mostrando os efeitos da atividade leishmanicidas e proliferativa dos compostos.

Todos estes grupos de compostos tais como os EGs, ATb2, THs e NHs pertencem ao grupo dos inibidores HDAC da classe dos ácidos hidroxâmicos. A fração de ácido hidroxâmico é um quelante de metal altamente eficiente; portanto, a maioria dos ácidos hidroxâmicos pode ser iHDAC altamente potente (WAGNER et al,2013).

O resumo de todos os dados sobre os macrófagos e na infecção está mostrado no anexo 1, incluindo a estrutura de todos os compostos testados.

6. CONCLUSÕES

Após terem sido testados os efeitos dos compostos em macrófagos Raw 264.7 e na infecção de *L. braziliensis* foram encontrados que, os compostos EG3, EG5 e EG21 são os que maiores efeitos leishmanicidas apresentaram em torno de 50%, e três compostos EGs apresentaram toxicidade nos macrófagos. Os compostos que não tiveram atividade leishmanicida estatisticamente são: EG2, EG6, EG8, EG9, EG12, EG17, EG18, EG19 e EG23, e o resto dos compostos tiveram consideráveis efeitos leishmanicidas. Do grupo ATb2, o composto AT10b2 apresentou maior atividade leishmanicida na porcentagem de 68%, e os demais compostos apresentaram consideráveis efeitos tóxicos para os parasitas. Já no grupo dos THs destacam-se os TH136, TH142 e TH135, com maiores efeitos leishmanicidas em torno ao 50% e o resto dos compostos THs também tiveram efeitos leishmanicidas porém em menor escala. E por último podemos encontrar os compostos NHs, dos quais ressalta-se o composto NH5 com uma inibição de 52%, e os demais NHs também tiveram atividade leishmanicida em menor escala.

No total foram testados 41 compostos, 22 do grupo do EGs, 9 THs, 6 ATb2, 4 NHs, onde podemos concluir que os quatro grupos de compostos apresentaram efeitos tóxicos para *L. braziliensis*, e todos os compostos pertencentes a iHDAC da classe dos ácidos hidroxâmicos.

7. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, K. T; HAQUE, H; JONES, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunology & Cell Biology**, v.90, p.66-77, 2012.

ANDREWS, KT; et al. Potent Antimalarial Activity of Histone Deacetylase Inhibitor Analogues. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 52, n. 4, p. 1454- 1461, 2008.

BALASUBRAMANIAN S, VERNER E, BUGGY J. J. Isoformspecific histone deacetylase inhibitors: the next step? **Cancer Letters**. v. 280, p. :211-221, 2009.

BAÑULS, A. L; HIDE, M; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in Parasitology**, v. 64; p.1-109. 455-458, 2007.

BASTOS, M. S. et al. Achievement of constitutive fluorescent pLEXSY-egfp *Leishmania braziliensis* and its application as an alternative method for drug screening in vitro. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz Scielo**, v. 112, n. 2, 2017.

BERGER, S. L. et al. "An operational definition of epigenetics." **Genes & Development**, v. 23, p.:781-783. 2009.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, v.24, p.684-703, 1997.

BERNHARD D. et al. Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemic lymphoblasts. **Cell Death and Differentiation**. v. 8, p. 1014-1021, 2001.

BI G, JIANG G. The molecular mechanism of HDAC inhibitors in anticancer effects. **Cellular & Molecular Immunology**. v. 3, n. 4, p.285-290, 2006.

BLUM, J.A.; HATZ, C.F. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. **Journal of travel Medicine**, v.16, p.123-131, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, 2 ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde; 2013. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana_2edicao.pdf> Acessado em: 17 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2 ed. Brasília. Editora Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf>. Acessado em: 19 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2009. Cap.11 p.639-701. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7e_d.pdf>. Acessado em: 17 mar. 2018.

CDC centers for disease control and prevention. **Leishmaniasis**, 2017. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html> > Acessado em: 07 set. 2017.

CHAKRAVARTY J.; SUNDAR S. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases** v. 2, n.2, p.167–176, 2010.

Comissão nacional de incorporação de tecnologia do SUS. **Proposta de elaboração protocolo clínico e diretrizes terapêuticas**, 2016. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Escopo_PCDT_LeishmanioseTegumentar_Enquete.pdf> Acessado em: 07 mar. 2018.

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

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous *leishmaniasis*. **Dermatology Therapy**, v.22, p.491-502, 2009.

DE ALMEIDA, et al. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 7, p.861-70. 2003.

ELMAHALLAWY, E. K. et al. Diagnosis of leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 8, p. 961–972, 2014.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, p. 673–691, 2014.

FERNÁNDEZ, M. S. et al. Assessment of the role of small mammals in the transmission cycle of tegumentary leishmaniasis and first report of natural infection with *Leishmania braziliensis* in two sigmodontines in northeastern Argentina. **Parasitology**, v.117, p.405-412, 2017.

FINNIN MS, Donigian JR, Cohen A, et al. Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. **Nature**. v. 401, p. 188-193, 1999.

FREITAS-JUNIOR, L. H; et al. Telomeric Heterochromatin Propagation and Histone Acetylation Control Mutually Exclusive Expression of Antigenic Variation Genes in Malaria Parasites. **Cell**, v. 121, p. 25-36, 2005.

GAMMOH, N. et al. Role of autophagy in histone deacetylase inhibitor-induced apoptotic and nonapoptotic cell death. **PNAS**. v. 109, n. 17, p. 6561-6565, 2012

GONZALEZ, A. D. et al. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. **Cancer Treatment**, v.34, p.206-222, 2008.

GRIENSVEN, J. V. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet infect**, v.10, p.184-194, 2010.

GUERRA, J. Á. et al. Mucosal leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, p. 980, 2011.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **Indian Journal of Medical Research**. v. 133, n. 1, p. 27-39, 2011.

HABERLAND, et al. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nature reviews Genetics**. v. 10, p. 32-42, 2009.

HAIGIS, M. C.; GUARENTE, L. P. Mammalian sirtuins--emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. **Genes & Development**, v. 20, p. 2913-2921, 2006.

HO, E. et al. Dietary factors and epigenetic regulation for prostate cancer prevention. **Advances in Nutrition**. v.2, p.497-510, 2011.

INSTITUT PASTEUR FP7 Anti-parasitic drug Discovery in epigenetics (A-ParaDDise) Disponível em: <<https://research.pasteur.fr/en/project/fp7-a-paraddise-anti-parasitic-drug-discovery-in-epigenetics/>>. Acessado em 03 de set. 2017.

IVENS, A. C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, p. 436-442, 2005.

JABLONCA, E; LAMB, M. The Changing Concept of Epigenetics. **Annals of the new York academy of sciences**, v. 981, p.82-96, 2002

JOSHI, M. B. et al. Molecular cloning and nuclear localization of a histone deacetylase homologue in *Plasmodium falciparum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 99, p. 11-19, 1999.

KELLY, W. K; MARKS, P. A. Drug Insight: histone deacetylase inhibitors development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. **Nature Clinical Practice Oncology**. V. 2, n. 3, mar. 2005.

KILLICK-KENDRICK, R. (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 65, p. 37-42, 1990.

KOOISTRA, S. M., & HELIN, K. Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 13, 2012.

KULSHRESTHA, A. et al. Antimony-Resistant Clinical Isolates of *Leishmania donovani* Are Susceptible to Paromomycin and Sitamaquine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 6, p.2916-2921. 2011.

KURZAK, B.; KOZLOWSKI, H.; FARKAS, E. Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions. **Coodenation Chemistry Review**, v. 114, p. 169-200, 1992.

LOISEAU, P. M; COJEAN, S; SCHREVEL, J. Sitamaquine as a putative antileishmanial drug candidate: from the machanism of action to the risk of drug resistance. **Parasite**, v. 18, N. 2, P. 115-119, 2011.

MAI, A. et al. Antimalarial and Antileishmanial Activities of Aroyl-Pyrrolyl-Hydroxyamides, a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 4, p. 1435-1436, 2004.

MARKS, P. A.; XU, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 107, p. 600-608, 2009.

MENDITI, K. B. C.; KANG, H. Ch. O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 53, n. 4, p. 453-460. 2007.

MINUCCI S, PELICCI, P. G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for câncer. **Nature reviews Cancer**, v.6, p.38–51, 2006.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**, v. 4, n. 1, p. 4-9, 2014.

MUKHERJEE, P. et al. Structural insights into the Plasmodium falciparum histone deacetylase 1 (PfHDAC-1): A novel target for the development of antimalarial therapy. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 16, p. 5254-5265, 2008.

NEBBIOSO, A. et al. Trial with "epigenetic" drugs: An update. **Molecular Oncology**, v.6, p. 657-682, 2012.

NIERATSCHKER V, BATRA A, FALLGATTER A. J. Genetics and epigenetics of alcohol dependence. **Journal of Molecular Psychiatry**. v. 1, 2013.

OLIVEIRA, L. G. et al. Annexin A1 Is Involved in the Resolution of Inflammatory Responses during *Leishmania braziliensis* Infection. **The Journal of Immunology**. v.198, n.8, p.3227-3236, 2017

OUAISSI, M; OUAISSI, A; Histone Deacetylase Enzymes as Potential Drug Targets in Cancer and Parasitic Diseases. **Journal of Biomed and Biotechnol**. v. 2006, p. 1 – 10, 2006.

PARK J. H. et al. Class I Histone Deacetylase-Selective Novel Synthetic Inhibitors Potently Inhibit Human Tumor Proliferation. **Clinical Cancer Research**. v. 10, p. 5271-5281, 2004.

PARTHUN, M. R. Hat1: the emerging cellular roles of a type B histone acetyltransferase. **Oncogene**, v. 26, p. 5319-5328, 2007.

PATEL, V. et al. Identification and Characterization of Small Molecule Inhibitors of a Class I Histone Deacetylase from *Plasmodium falciparum*. **Journal Medicinal Chemistry**. v. 52, p. 2185- 2187, 2009.

PATIL, V. et al. Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. **Bioorganic Medicinal Chemistry**. v. 18, p. 415-425. 2009.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, p. 581-96, 2007.

RODRIGUES, P. B. H. **Síntese e Caracterização de Complexos de Organoantimônio(V) com Ácidos Aminoidroxâmico. 2015. 81f. Dissertação (Mestre em Química – Química Inorgânica)** Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFMG, Belo Horizonte- MG. 2015. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SFSA-9X4MJH/tese_mestrado_vers_o_final_corrigido_modulo_texto.pdf?sequence=1> Acessado em: 10 dez. 2017.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.1-7. 2002.

RÓLON, M. et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**., v. 99, p. 103-107, 2006.

ROMANSKI A. et al. Use of a novel histone deacetylase inhibitor to induce apoptosis in cell lines of acute lymphoblastic leukemia. **Haematologica**. v. 89, p. 419-426, 2004.

ROSA H. S.; CALDAS, C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. **European Journal of Cancer**. v. 41, p. 2381-2402, 2005.

SANTOS, D. O. et al. *Leishmaniasis* treatment--a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v.103, p.1-10, 2008.

SELVI, B. R. et al. Tuning acetylation levels with HAT activators: therapeutic strategy in neurodegenerative diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1799, p. 840-853, 2010.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 423-431, 2009.

SILVEIRA, F. T; LAINSON, R; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.99, n.3, p.239-251, 2004.

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

SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection Chemotherapy**, v.10, n.2, p.307-315, 2004.

SODJI, Q. et al. The antileishmanial activity of isoforms 6- and 8-selective histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, p. 4826-4830, 2014.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p.1829-1834, 2002.

VERGNES, B. et al. Targeted disruption of cytosolic SIR2 deacetylase discloses its essential role in *Leishmania* survival and proliferation. **Gene**, v. 363, p. 85 – 96, 2005.

WAGNER, F. et al. Small Molecule Inhibitors of Zinc-dependent Histone Deacetylases. **Neurotherapeutics**, v.10, n.4, p. 589–604, 2013.

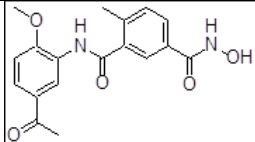
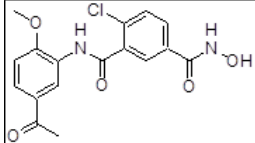
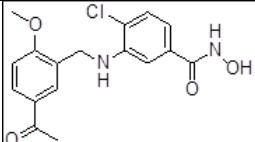
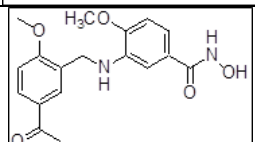
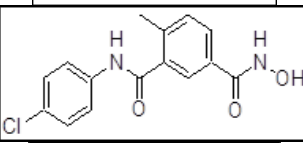
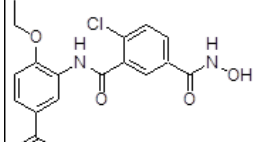
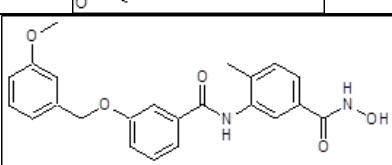
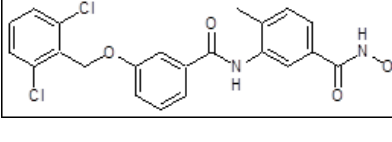
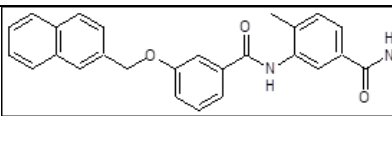
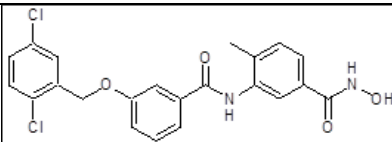
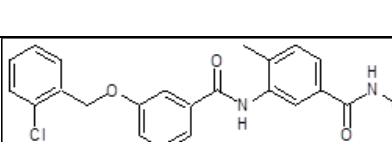
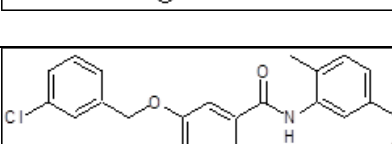
WHO. World Health Organization. Leishmaniasis, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em: 17 jun. 2017.

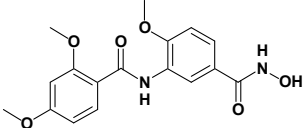
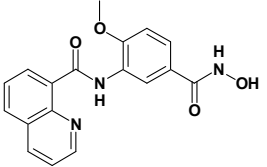
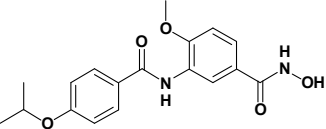
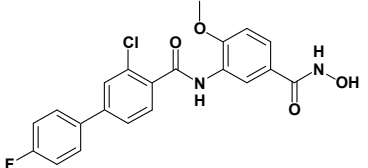
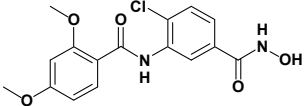
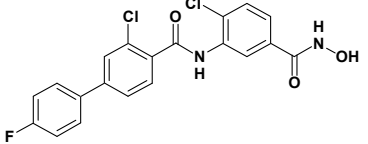
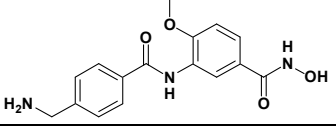
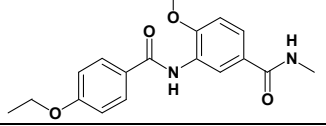
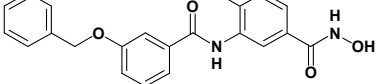
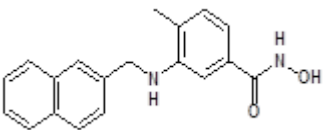
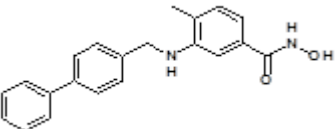
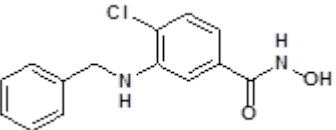
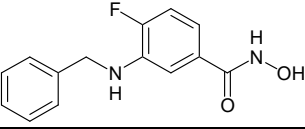
WIGLER, M. LEVY, D. PERUCHO, M. "The somatic replication of DNA methylation." **Cell**. V. 24, p. 33-40, 1981.

ZHANG, J.; ZHONG, Q. Histone deacetylase inhibitors and cell death. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, p. 3885-3901, 2014.

ANEXO 1. Composto EGs, ATbs, THs, NHs.e suas estruturas químicas

Cpd	Structure	Macrophage Raw 264.7 (48 hours) (10 μ M)	\pm SD	<i>L. braziliensis</i> (M2904) Infection Assay (48 hours) (μ M)	\pm SD
EG3		101,50	12,18	57,55	18,80
EG5		95,88	9,91	58,54	21,24
EG21		104,71	5,19	64,89	12,98
EG7		106,11	9,39	65,57	18,43
EG22		101,24	6,91	67,67	13,90
EG 20		98,63	6,99	69,64	5,93
EG15		109,88	7,58	80,28	7,86
EG16		111,00	6,82	92,74	10,52
EG4		97,20	6,81	95,96	21,09
EG1		103,89	6,67	100,26	17,32
EG2		96,79	11,13	111,96	9,27
EG12		100,07	6,28	112,70	6,61
EG6		106,84	7,67	116,36	14,20

EG19		93,70	8,53	117,47	17,14
EG17		98,78	6,74	119,81	14,85
EG8		97,97	11,45	120,46	19,37
EG9		98,69	9,47	120,87	16,25
EG23		109,00	9,11	121,45	12,18
EG18		106,54	5,54	133,30	17,22
AT10b2		116,95	10,37	46,37	12,98
AT7b2		111,61	7,03	87,19	18,25
AT9b2		115,23	10,55	103,38	7,97
AT8b2		103,30	6,43	110,63	18,70
AT3b2		109,10	9,33	125,30	17,14
AT4b2		123,87	11,02	128,29	16,80

TH136		107,67	8,16	53,93	10,93
TH142		108,19	6,93	59,75	15,71
TH135		108,64	9,37	68,46	10,17
TH138		105,39	8,93	83,79	16,67
TH137		100,54	6,09	90,92	15,01
TH139		98,96	9,95	95,57	10,69
TH147		109,43	9,13	103,34	9,20
TH145		99,05	5,03	110,10	19,12
TH128		107,31	9,43	121,94	16,05
NH5		101,81	12,36	70,11	14,41
NH4		109,44	7,70	79,18	9,93
NH1		104,11	11,74	88,63	14,30
NH6		94,97	5,99	88,92	16,48