

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos
inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de
Leishmania spp.**

EDUARDO RAUL PEREIRA VELTRI

Rio de Janeiro
Agosto, 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

EDUARDO RAUL PEREIRA VELTRI

**Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos
inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de
*Leishmania spp.***

Dissertação apresentada ao Instituto
Oswaldo Cruz como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Orientador: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

RIO DE JANEIRO
AGOSTO, 2019

Pereira Veltri, Eduardo Raul .

Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de *Leishmania* spp. / Eduardo Raul Pereira Veltri. - Rio de Janeiro, 2019.

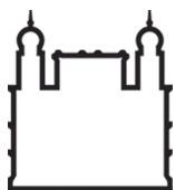
xviii, 67 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientador: Eduardo Caio Torres dos Santos.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. *Leishmania* . 2. Superexpressão. 3. Esterol 24-C-metiltransferase. 4. Quimioterapia. 5. Azasteróides. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: EDUARDO RAUL PEREIRA VELTRI

**Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos
inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de
Leishmania spp.**

ORIENTADOR: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Aprovada em: 30/08/2019

EXAMINADORES:

Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (FIOCRUZ) – Presidente

Dra. Flávia Lima Ribeiro Gomes (FIOCRUZ)

Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (UERJ) - Revisora

Dra. Ariane Jesus Sousa Batista (UFRJ) - Suplente

Dra. Katia da Silva Calabrese (FIOCRUZ) - Suplente

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2019

À guerreira da minha vida, minha mãe Leka.
Ao melhor professor, minha referência, meu pai
Soba.
Ao meu melhor amigo, meu irmão Leozão.

Pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu Pai Oxalá, por toda força e serenidade para realizar as melhores escolhas.

Aos meus pais, Soba e Leka, pelo incentivo. “E o mestrado? Vai fazer quando?”. Obrigado pela paciência. Todo o meu amor. Ao meu irmão, Leozão, meu primeiro e melhor amigo. Obrigado pelos ensinamentos. Todo o meu respeito.

À Beatriz (Bim), pelo companheirismo e paciência. O amor sempre vence. Obrigado por tudo. Caminharemos lado a lado, sempre (desde a monografia). Todo o meu carinho, amor e gratidão.

À minha cunhada, libriana indecisa e uma grande irmã, Carol. Toda a minha parceria.

Ao meu amigo e orientador, Dr. Eduardo Caio, pela oportunidade ímpar de desenvolver um projeto de mestrado sob uma orientação firme, presente e humana! Obrigado pelas trocas de ideias, pelo suporte e pelas aulas informais de farmacologia ao longo desse período. Para quem não sabia a diferença entre potência e eficácia, tenho certeza que aprendi demais com você, tanto profissionalmente quanto como um ser humano. Saudações Rubro Negras. Toda a minha admiração.

Ao meu amigo, companheiro de Maracanã e também orientador, Dr. Valter, o cara da Biologia Molecular. Obrigado pela paciência e por me ensinar tanto, você é um grande professor pra mim. Espero levar comigo sempre sua positividade e foco. “3x0 mengão hoje, meu amigo!”. Toda a minha gratidão.

Ao meu amigo Marcio, um dos responsáveis pela minha entrada no LBqT. Um grande companheiro, o mais sensato dos vascaínos e o melhor ex-peladeiro com quem já joguei bola.

Ao Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral, pelos ensinamentos ao longo do desenvolvimento do projeto e nas apresentações de seminários e congressos.

Ao Dr Edézio Ferreira da Cunha Júnior, pelo suporte intelectual durante o projeto, contribuindo muito para a realização dos experimentos e do projeto.

Um agradecimento especial à Dra. Juliana Pacheco, uma grande tutora e companheira de laboratório. Obrigado pelos ensinamentos de quimioterapia e por me mostrar que é possível em uma tarde realizar um experimento com 12 placas de 96 poços! Obrigado por tudo.

À querida amiga Elisa, obrigado pelo suporte no laboratório. Obrigado pelos conselhos nas apresentações, pela ajuda no processo seletivo e pelas passagens.

Aos membros do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, em especial ao grupo “Torres-Santos *et al.*”

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC, coordenação do programa e aos docentes.

Aos órgãos financiadores deste projeto: CAPES, CNPq e FAPERJ.

Aos membros da banca avaliadora.

“Nunca deixe seus títulos
mudarem seus valores.”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

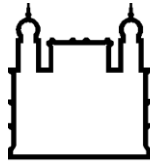
**Desenvolvimento de uma estratégia para a prospecção de fármacos
inibidores da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) de
Leishmania spp.**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Eduardo Raul Pereira Veltri

A leishmaniose é um grave problema de saúde pública, sendo considerada uma doença extremamente negligenciada, para a qual ainda não existe vacina licenciada para uso em humanos e o tratamento é caro e tóxico. Na busca para o desenvolvimento racional de novos fármacos, a escolha de um alvo seletivo no parasito é essencial. Enquanto os mamíferos produzem colesterol, os tripanossomatídeos produzem esteróis com esqueleto ergostano, como o ergosterol. O passo divergente da via dos parasitos é a transferência de um grupamento metila da S-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 24 de esteróis com estrutura colestano, formando uma ramificação no C24 não existente nos esteróis de mamíferos, catalisado pela enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6). Sendo assim, é proposta do presente trabalho estabelecer uma estratégia para a prospecção de fármacos inibidores da enzima ERG6 de *Leishmania* spp. Para esse objetivo, preparamos cepas de *L. infantum* e *L. amazonensis* que superexpressam a ERG6. A confirmação da expressão gênica aumentada em ambas cepas de *Leishmania* foi confirmada por PCR quantitativo (qPCR) em diferentes condições experimentais. Em seguida, essas cepas foram utilizadas para realização de triagem de fármacos. Promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. superexpressando ou não o alvo estudado foram incubados com os diferentes compostos por 72h. Promastigotas de *L. amazonensis* superexpressando a ERG6 se tornaram resistentes aos azapterocarpanos LQB 333, 336, 339 e 341, e a cepa recombinante de *L. infantum* se tornou resistente às substâncias LQB 336, 339, 341 e 343. Em relação aos azasteroides, todos os derivados da série ND apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania* spp. Além disso, promastigotas e amastigotas de *L. infantum* que superexpressam a enzima alvo se tornaram resistentes quando tratadas com as substâncias ND-1 e ND-2. As amastigotas de *L. amazonensis* que superexpressam a ERG6 também se tornaram resistentes à ND-1 e ND-2. Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o mecanismo de ação dos azapterocarpanos e os azasteroides destacados acima pode ser a inibição da ERG6.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Development of a strategy for sterol 24-C-methyltransferase (ERG6) inhibitor drugs prospection from *Leishmania* spp.

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Eduardo Raul Pereira Veltri

Leishmaniasis is a serious public health problem and is considered na extremely neglected disease for which there is no vaccine licensed for humans and the first treatment choice is expensive and toxic. Aiming the rational development of new drugs, a new selective target in the parasites is essential. While mammals produce cholesterol, trypanosomatids produce ergostane skeleton sterols, such as ergosterol. The divergent step in the parasite pathway is a methyl group transfer from S-adenosyl methionine (SAM) to carbon 24 of cholestane skeleton sterols, creating a branch in C-24 that doesn't exist in mammals sterols, catalysed by the enzyme sterol 24-C-methyltransferase (ERG6). Thus, we propose in this work a prospection strategy for ERG6 inhibitors drugs from *Leishmania* spp. For this, we performed *L. amazonensis* and *L. infantum* strains overexpressing ERG6. We confirmed the gene expression increase by quantitative PCR (qPCR) under different experimental conditions. These strains were then used for drug screening. *Leishmania* spp. promastigotes and amastigotes overexpressing or not the target studied were incubated with different compounds for 72h. Promastigotes of *L. amazonensis* overexpressing ERG6 became resistant to azapterocarpan LQB 333, 336, 339 and 341, and the *L. infantum* recombinant strain became resistant to LQB 336, 339, 341 and 343. About azasteroids, all derivatives of the serie ND presented leishmanicidal activity against promastigotes of *Leishmania* spp.. Moreover, *L. infantum* promastigotes and amastigotes overexpressing the target studied became resistant when treated with ND-1 and ND-2. Amastigotes of *L. amazonensis* overexpressing ERG6 also became resistant to this two compounds. Our results presented in this work indicate that the azapterocarpan and azasteroids mechanism of action might be through ERG6 inhibition.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Leishmanioses	1
1.1.1	Aspectos históricos	1
1.1.2	<i>Leishmania</i> spp.: o agente etiológico.....	5
1.1.3	Aspectos Clínicos e Epidemiologia das Leishmanioses	7
1.1.4	Tratamento das leishmanioses	10
1.2	Esteróis	12
1.2.1	Esteróis: alvos farmacológicos	13
1.2.2	Via de biossíntese de esteroides	14
1.2.3	Esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) – EC 2.1.1.43	16
1.2.4	Inibidores conhecidos da biossíntese de esteróis.....	17
1.3	Azapterocarpanos	19
1.4	Azasteroides	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo geral	22
2.2	Objetivos específicos	22
3	METODOLOGIA	23
3.1	Desenvolvimento dos protótipos	23
3.1.1	Azapterocarpanos e azasteroides	23
3.1.2	Imipramina	23
3.2	Considerações éticas	23
3.3	Parasitas	23
3.4	Clonagem, transfecção e superexpressão	24
3.5	Sequenciamento.....	25
3.6	Avaliação da expressão gênica da ERG6 por PCR quantitativo (qPCR)	25
3.7	Caracterização fenotípica: curva de crescimento	27
3.8	Avaliação da atividade leishmanicida.....	27
3.8.1	Atividade antipromastigota	27
3.8.2	Atividade anti-mastigota intracelular	28
3.9	Avaliação da toxicidade	28
4	RESULTADOS	29
4.1	Superexpressão do gene ERG6 em <i>Leishmania</i> spp.....	29
4.1.1	Amplificação do gene ERG6.....	29

4.1.2	Clonagem do gene ERG6.....	30
4.1.2.1	Sequenciamento	32
4.1.3	Subclonagem do gene ERG6.....	33
4.2	Avaliação da expressão gênica	35
4.3	Caracterização fenotípica: curva de crescimento	39
4.4	Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos	41
4.4.1	Estrutura	41
4.4.2	Atividade antipromastigota dos azapterocarpanos	43
4.5	Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade dos azasteroides	45
4.5.1	Estrutura	45
4.5.2	Atividade antipromastigota dos azasteroides	45
4.5.3	Atividade anti-amastigota intracelular e citotoxicidade dos azasteroides ..	47
5	DISCUSSÃO	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Principais formas evolutivas de <i>Leishmania</i> spp.: promastigota (A) e amastigota (B).	6
FIGURA 2. Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	7
FIGURA 3. Distribuição geográfica da LT no mundo.	9
FIGURA 4. Distribuição geográfica da LV no mundo.	10
FIGURA 5. Estrutura do ciclopentanoperidrofenantreno.	13
FIGURA 6. Estrutura dos esteróis de mamíferos (A - colesterol) e tripanossomatídeos (B - ergosterol).....	14
FIGURA 7. Via de biossíntese dos esteróis em <i>Leishmania</i> spp..	16
FIGURA 8. Mecanismo de atuação da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6).....	17
FIGURA 9. Estrutura química dos isoflavonóides (A), pterocarpanos (B), azapterocarpanos (C) e azasteróis (D).....	20
FIGURA 10. Estrutura química da finasterida (A) e do 4-azasteroide (B).	21
FIGURA 11. Eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose (1%) corados com GelRed.	29
FIGURA 12. Eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose (1%) corados com GelRed.	30
FIGURA 13. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de <i>L.amazonensis</i>) após digestão com EcoRI. ...	31
FIGURA 14. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de <i>L. infantum</i>) após digestão com EcoRI.....	31
FIGURA 15. Sequenciamento da ERG6 de <i>L. amazonensis</i>	32
FIGURA 16. Sequenciamento da ERG6 de <i>L. infantum</i>	33
FIGURA 17. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM - T + ERG6) e vetor de expressão (pSP72 α NEO α) após digestão com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	34
FIGURA 18. Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor de expressão recombinante (pSP72 α NEO α + ERG6) após digestão com <i>Bam</i> HI e <i>Hind</i> III.....	35
FIGURA 19. Análise da expressão gênica das promastigotas transfectadas e seus controladores de <i>L. amazonensis</i> mantidas com ou sem G418 72h antes da extração de RNA.	37
FIGURA 20. Análise de expressão gênica das promastigotas transfectadas e seus controladores de <i>L. infantum</i> mantidas com ou sem G418 72h antes da extração de RNA.	38

FIGURA 21. Análise de expressão gênica das promastigotas transfectadas e seus controladores de <i>L. amazonensis</i> mantidas com ou sem G418 144h (seis dias) antes da extração de RNA.	39
FIGURA 22. Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> transfectadas ou não.	40
FIGURA 23. Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. infantum</i> transfectadas ou não.	40
FIGURA 24. Azapterocarpanos da série LQB.....	42
FIGURA 25. Azapterocarpanos da série ND.....	45

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1. Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos, imipramina e miltefosina contra La + pSP72αNEOα e <i>Laerg6^{high}</i>	43
TABELA 2. Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos, imipramina e miltefosina contra Li + pSP72αNEOα e <i>Lierg6^{high}</i>	44
TABELA 3. Atividade antipromastigota dos azasteróides contra La – 4P, La – WT, La + pSP72αNEOα e <i>Laerg6^{high}</i>	46
TABELA 4. Atividade antipromastigota dos azasteroides contra Li – 4P, Li – WT, Li + pSP72αNEOα e <i>Lierg6^{high}</i>	47
TABELA 5. Citotoxicidade (CC50), atividade antiamastigota (IC50) e índice de seletividade dos azasteroides contra <i>L. amazonensis</i>	47
TABELA 6. Atividade antiamastigota (IC50) e índice de seletividade dos azasteroides contra <i>L. infantum</i>	48

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de Adenosina
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
cDNA	DNA complementar
CT	<i>Threshold cycle</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERG6	Gene da esterol 24-C-metiltransferase
GAPDH	<i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase)
GTP	<i>Guanosine triphosphate</i> Trifosfato de Guanosina
HMG CoA redutase	<i>Hydroxymethylglutaryl Coenzyme A reductase</i> (Hidroximetilglutaril Coenzima A redutase)
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i> Metade da concentração inibitória máxima
IF	Índice de Infecção
IPTG	<i>Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside</i> (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosídeo)
La + pSP72αNEOα	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> transfectadas somente com o plasmídeo
La-4P	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas até a quarta passagem
Laerg6 ^{high}	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com pSP72αNEOα + ERG6
La-WT	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> cultivadas com o mesmo número de passagens das cepas transfectadas (nº de passagens indefinidas pelo período de um ano)
LC	Leishmaniose Cutânea

LDPC	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar
Li + pSP72 α NEO α	Promastigotas de <i>L. infantum</i> transfectadas somente com o plasmídeo
Li-4P	Promastigotas de <i>L. infantum</i> cultivadas até a quarta passagem
Lierg6 ^{high}	Promastigotas de <i>L. infantum</i> com pSP72 α NEO α + ERG6
Li-WT	Promastigotas de <i>L. infantum</i> cultivadas com o mesmo número de passagens das cepas transfectadas (nº de passagens indefinidas pelo período de um ano)
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> (Solução tamponada com fosfato)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (PCR quantitativo)
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RPM	Rotações por minuto
SAM	<i>S-Adenosylmethionine</i> (S-Adenosilmetionina)
SFB	Soro Fetal Bovino
SI	<i>Selectivity Index</i> (Índice de seletividade)

VP	Vacúolo Parasitóforo
WHO	<i>World Health Organization</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por pelo menos 20 espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, eucariotos unicelulares da ordem *Trypanosomatida* e família *Trypanosomatidae*. Espécies distintas de *Leishmania* causam diferentes manifestações clínicas, que variam de lesões cutâneas com capacidade de autocura (leishmaniose cutânea - LC) a danos em órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (leishmaniose visceral - LV). A transmissão de *Leishmania* spp. ao hospedeiro vertebrado ocorre a partir de uma fêmea infectada de um inseto vetor da subfamília *Phlebotominae* (Laison, 2010; CDC, 2018; DNDi, 2018).

1.1.1 Aspectos históricos

Poinar & Poinar (2004) relataram a existência de uma espécie pré-histórica de *Leishmania* conservada em âmbar birmanês do Cretáceo inferior (100 milhões de anos) no sudeste asiático. Foram encontradas formas promastigotas e amastigotas de um tripanossomatídeo digenético dessemelhante a *Leishmania* na probóscide e no intestino médio abdominal do inseto vetor já extinto da espécie *Palaeomyia burmitis*. No lúmen do intestino médio das fêmeas foram encontradas células sanguíneas nucleadas, intactas e/ou em estágio de lise/desintegração. Algumas células continham de 4 a 10 pequenos corpos no interior de vacúolos esféricos e esbranquiçados. Esses corpos eram semelhantes em tamanho e forma ao estágio evolutivo conhecido de amastigota dos tripanossomatídeos. A espécie semelhante a *Leishmania* foi descrita em um novo gênero fóssil *Paleoleishmania* e nomeada *P. proterus*.

Sobre a origem das células, foi realizada uma comparação entre as células sanguíneas fósseis do hospedeiro com as dos vertebrados atuais. Com base no tamanho das células (13-23µm de comprimento), ocorrência em flebotomíneos e o conhecimento de que os répteis são infectados por protozoários do gênero *Leishmania* atualmente, concluiu-se que as células sanguíneas do intestino médio do vetor fêmea infectado são de origem reptiliana (Altman, 1961; Telford, 1995).

Em 2008, Poinar descreveu um segundo exemplar fóssil (âmbar dominicano, América Central) de *Paleoleishmania* encontrado em um flebotomíneo já extinto do gênero *Lutzomyia*, datado no período Terciário (20-30 milhões de anos). Promastigotas e amastigotas de *P. neotropicum* foram encontrados na probóscide do extinto inseto

vetor *Lutzomyia adketis*, porém não foram observadas células sanguíneas de origem vertebrata. No entanto, a presença de amastigotas encontradas nos insetos vetores e o fato de que indivíduos flagelados monogênicos não são capazes de infectar flebotomíneos indicam um ciclo de vida digenético de *P. neotropicum*, apresentando um hospedeiro vertebrado. Esse registro fóssil também fornece evidências de que flebotomíneos pré-históricos eram vetores de protozoários parasitos semelhantes às espécies atuais de *Leishmania* desde meados do Oligoceno (23-36 milhões de anos) ao início do Mioceno (5-23 milhões de anos).

A partir dos dados na literatura que relatam a história da leishmaniose, fica evidente que a evolução da doença está intrinsecamente ligada à atividade humana. Embora a doença já tenha afetado hominídeos ancestrais, a leishmaniose não foi uma causa de seleção na evolução dos seres humanos como foi, por exemplo, a tripanossomíase africana (Stervending, 2008). A migração humana demonstrou-se um fator fundamental para a disseminação da doença.

Documentos antigos e dados paleoparasitológicos indicam que a leishmaniose já era difundida na antiguidade. A identificação de parasitos do gênero *Leishmania* como agentes etiológicos e de flebotomíneos como vetores transmissores da leishmaniose iniciou-se nos primeiros anos do século XX, e a descoberta de novos protozoários do gênero, assim como novas espécies de flebotomíneos se estende até os dias atuais (Stervending, 2017).

Na era moderna, foram evidenciadas lesões cutâneas características das leishmanioses em países da América do Sul, como Equador e Peru. A partir do século XV, no período Inca, vários relatos característicos da doença em diferentes localizações eram nomeados de acordo com o local no qual eram registrados. Apesar das diferentes nomenclaturas, como “Doença do Vale”, “Doença Andina” e “Lepra Branca”, as condições clínicas eram semelhantes à LC atualmente encontrada na América do Sul (Revisado por: Akhoundi *et al.*, 2016). No caso do Oriente Médio, “Febre de Aleppo”, “Febre de Bagdá” e “Botão do Oriente” foram alguns dos diferentes nomes dados a essas manifestações clínicas, dependendo da localização onde essas manifestações eram registradas. No século XVIII, em 1756, o médico Alexander Russel observou o desenvolvimento de lesões na pele dos pacientes da população de Aleppo, Síria, com características clínicas também semelhantes à LC (“Febre de Aleppo”). No mesmo ano, médicos indianos diagnosticaram pacientes com sintomas semelhantes à LV ou calazar, na época conhecida como “Febre negra”. Em 1764, o médico Cosme Bueno relatou pela

primeira vez que os indígenas peruanos atribuíam a transmissão de uma doença chamada *uta* a pequenos insetos que causavam lesões semelhantes às conhecidas atualmente causadas pelos protozoários de *Leishmania*. No século seguinte, em 1832, William Twining publicou um livro que detalhava os sintomas do calazar em pacientes indianos que apresentavam baço aumentado, anemia e febre intermitente (Cook, 2001).

Embora a busca pelos agentes causadores das diferentes formas de leishmaniose tenha começado no final do século XIX, a descrição dos protozoários ocorreu somente no século XX. No entanto, em 1885, o médico escocês David Cunningham descreveu formas amastigotas em casos de calazar (nomeada *Delhi fever* ou *Delhi Boil*), também na Índia, porém não percebeu tratar-se de protozoários parasitos. Posteriormente, em 1898, o médico do exército russo Piotr Fokich Borovsky foi o primeiro a reconhecer que os corpos nucleoides presentes nas lesões de pacientes diagnosticados com “Botão do Oriente” ou “Febre de Aleppo” eram protozoários, através da identificação do cinetoplasto.

No início do século XX, em 1903, o patologista escocês William Leishman relatou corpos ovoides no baço de um soldado britânico que havia morrido em serviço, na Índia, e que apresentou sintomas como febre intermitente e esplenomegalia. Experimentalmente, observou que os corpos ovoides detectados no paciente eram idênticos em tamanho, forma e padrão de coloração aos corpos encontrados no sangue e órgãos de camundongos que manifestavam a doença. Leishman concluiu que se tratava de formas degeneradas de protozoários, caracterizando uma tripanossomíase (Leishman, 1903). No mesmo ano, o irlandês Charles Donovan relatou a presença de corpos semelhantes em amostras de baço de pacientes indianos diagnosticados com calazar (Donovan, 1903). Após os relatos dos médicos britânicos, Ronald Ross propôs a denominação de “corpos de Leishman-Donovan” para os corpos ovoides e de *Leishmania donovani* para o agente causador (Ross, 1903).

Por outro lado, ainda em 1903, na cidade de Boston, o médico norte-americano James Wright identificou a presença de um protozoário patogênico em uma lesão facial de uma criança imigrante da Armênia e a diagnosticou com “Febre de Aleppo” (Wright, 1903). Para os pesquisadores, as doenças observadas tanto na Índia quanto nos Estados Unidos eram consideradas completamente diferentes, ou seja, acreditavam que as mesmas não guardavam nenhum grau de identidade. Somente em 1906 o pesquisador alemão Max Luhe propôs renomear o patógeno causador da doença identificada por Wright como *Leishmania tropica*. Dois anos depois, o francês Charles Nicolle verificou

que as formas evolutivas de *L. tropica* eram muito semelhantes às formas de *L. donovani*, fortalecendo a ideia da criação de um grupo de doenças que, apesar das manifestações clínicas diferentes, eram causadas por protozoários parasitos morfológicamente iguais (Revisado por Grove, 2014).

Já no Novo Mundo, o médico brasileiro Adolpho Carlos Lindenberg e o médico italiano Antonio Carini descreveram parasitos em lesões de pele de pacientes diagnosticados com úlcera de Bauru, no estado de São Paulo. Inicialmente pensava-se que os parasitos do Novo Mundo eram idênticos a *L. tropica* (Carini, 1909). No entanto, em 1911, o brasileiro Gaspar de Oliveira Vianna, estudando amostras de leishmaniose obtidas de uma lesão cutânea de um paciente, concluiu que o parasito era diferente de *L. tropica*. Com base em observações sobre morfologia, Gaspar Vianna nomeou a nova espécie como *Leishmania braziliensis*. Vale ressaltar que devido a um erro gráfico, a espécie foi descrita como *L. brazilienses*, e somente no ano de 1916 o erro foi corrigido para *L. braziliensis* (Vianna 1916; da Matta, 1916).

Com exceção de *L. peruviana*, descrita em 1913, todas as espécies do Novo Mundo causadoras de LC e leishmaniose mucocutânea (LMC) foram identificadas e caracterizadas nas décadas seguintes. São elas: *L. mexicana* (Biagi, 1953), *L. guyanensis* (Floch, 1954), *L. amazonensis* (Lainson & Shaw, 1972), *L. panamensis* (Lainson & Shaw, 1972), *L. venezuelensis* (Bofante-Garrido, 1980), *L. lainsoni* (Silveira, 1987), *L. naiffi* (Lainson & Shaw, 1989), *L. shawi* (Lainson et al., 1989), *L. lindenbergi* (Silveira, 2002) e *L. waltoni* (Shaw et al, 2015) (Lainson, 2010; Stervending, 2017).

O surgimento de novas formas da leishmaniose está provavelmente relacionado à atividade humana nas regiões próximas ou dentro das florestas. Essa atividade aumenta não somente as chances de contato com flebotomíneos que normalmente se alimentam de animais silvestres, mas também o risco de que espécies de *Leishmania* não detectadas anteriormente possam ser transmitidas aos seres humanos (Stervending, 2017). Além disso, o desmatamento e a invasão humana descontrolada nas florestas podem desencadear adaptações dos flebotomíneos em questão de novos hábitos alimentares (sangue de seres humanos e seus animais domésticos) (Nozais, 2003).

Atualmente são descritas mais de 30 espécies de insetos vetores transmissores das leishmanioses. O gênero *Phlebotomus* é o principal responsável pela transmissão dos parasitos no Velho Mundo, enquanto a transmissão de protozoários parasitos no Novo Mundo ocorre principalmente por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (Claborn, 2010).

1.1.2 *Leishmania* spp.: o agente etiológico

Os protozoários causadores das leishmanioses habitam células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos. No caso do inseto vetor, os parasitos estão presentes principalmente no intestino desses organismos (Ashford *et al.*, 2000). Em um ciclo biológico heteroxênico, os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, como seres humanos, roedores e canídeos. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos hematófagos (fêmeas) conhecidos como flebotomíneos (Neuber, 2008).

Pertencentes ao Reino Protista, Classe Kinetoplastea e Ordem Trypanosomatida, os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* possuem minicírculos de DNA mitocondrial denominado cinetoplasto, formando mini e maxi arranjos localizados no interior da mitocôndria única desses organismos. (Revisado por Akhound *et al.*, 2016). Os insetos flebotomíneos são responsáveis pela transmissão de mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que apresenta dois grandes subgêneros patogênicos para a espécie humana: *Leishmania* e *Viannia* (Revisado por: Lainson, 2010).

A classificação do gênero *Leishmania* em subgêneros foi proposta por Lainson & Shaw (1987) de acordo com o local de desenvolvimento dos parasitos no trato digestivo do inseto vetor. As espécies que se desenvolvem no intestino posterior dos flebotomíneos estão classificadas no subgênero *Viannia*, enquanto que o não desenvolvimento dos parasitos no intestino posterior os agrupa no subgênero *Leishmania*.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são digenéticos e apresentam dois estágios evolutivos com diferenças morfológicas: as formas promastigota e amastigota (Fig.1). A estruturação básica celular de *Leishmania* spp. é conservada. No interior da célula são observadas organelas de cópia única, como a mitocôndria e o aparelho de Golgi. O cinetoplasto está localizado na porção anterior ao núcleo. A bolsa flagelar é formada na base do flagelo, a partir de uma invaginação da membrana celular. Essa estrutura fundamental permite o transporte de substâncias entre o meio intra e extracelular (endocitose e exocitose). Encontrada no hospedeiro invertebrado, as promastigotas apresentam motilidade alta e são capazes de formar agrupamentos celulares durante o processo de migração e colonização do hospedeiro invertebrado. Já as formas amastigotas são encontradas no hospedeiro vertebrado e apresentam formato elipsoide, com um flagelo rudimentar no interior da bolsa flagelar. Embora sejam capazes de se

locomover de acordo com o tropismo de cada espécie, as amastigotas não apresentam a mesma motilidade que as formas promastigotas. Ambas as formas evolutivas do parasito se multiplicam por divisão binária. (Teixeira *et al.*, 2013; Sunte & Gull, 2017).

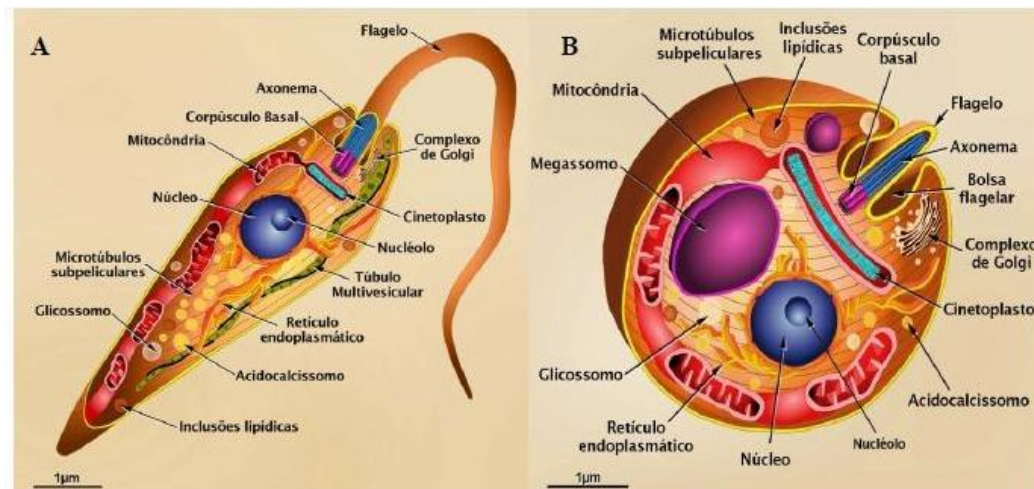


Figura 1 – Principais formas evolutivas de *Leishmania* spp.: promastigota (A) e amastigota (B).
(Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013).

A transmissão dos protozoários ao hospedeiro vertebrado é iniciada quando, durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor regurgita saliva contendo as formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele do hospedeiro. Essas promastigotas se transformam nas formas amastigotas ao serem internalizadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente os macrófagos, após a fusão de endossomos e lisossomos, formando o vacúolo parasitóforo (VP). No interior das células do hospedeiro, as amastigotas se multiplicam por divisão binária e ocorre o rompimento do macrófago após inúmeras etapas de divisão. A liberação dos parasitos para o meio extracelular permite que novas células do hospedeiro sejam infectadas pelas amastigotas.

A infecção do flebotomíneo ocorre durante a realização do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado com *Leishmania* spp, ingerindo as formas amastigotas presentes no interior das células fagocíticas. No trato digestivo do inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas, multiplicando-se de forma logarítmica no intestino anterior e médio do inseto. Após, as promastigotas sofrem um processo denominado metaciclogênese, um conjunto de modificações morfológicas e bioquímicas nas células parasitárias, que deixam de se dividir e se transformam em promastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado. Vale ressaltar que as formas multiplicativas não infectantes (promastigotas procíclicas) são

capazes de aderir à parede do intestino do vetor. No entanto, após a metaciclogênese, as promastigotas perdem a capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do flebotomíneo. Dessa forma, as promastigotas metacíclicas migram para a faringe e cavidade bucal do inseto, onde serão transmitidas ao hospedeiro vertebrado após um novo repasto sanguíneo, completando o ciclo e iniciando um novo processo de infecção no hospedeiro vertebrado (Fig.2) (Stuart *et al.*, 2008; Kaye & Scott, 2011).

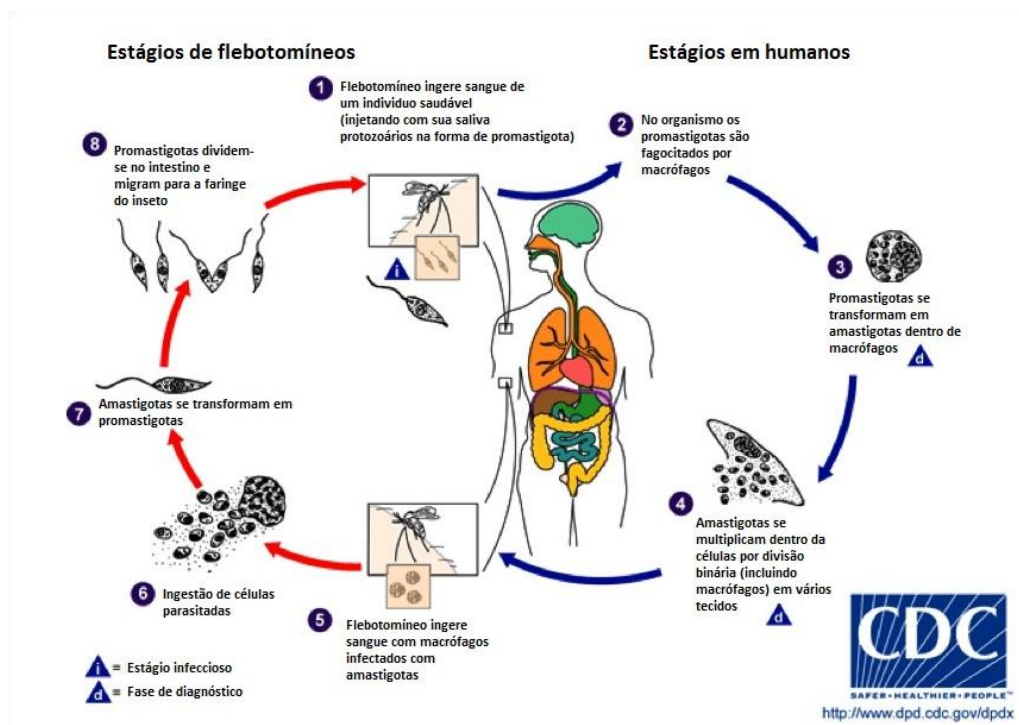


Figura 2 – Ciclo biológico de *Leishmania* spp. (Adaptado de CDC, 2018).

1.1.3 Aspectos Clínicos e Epidemiologia das Leishmanioses

A infecção por *Leishmania* spp. é determinada geralmente pelas características da espécie, pela biologia do vetor e pela resposta do hospedeiro. As manifestações clínicas causadas pelas diferentes espécies de *Leishmania* variam desde a autocura das lesões cutâneas ao risco de morte na forma visceral da doença. As leishmanioses possuem dois principais grupos: leishmaniose tegumentar (LT) e leishmaniose visceral (LV) (Ministério da Saúde, 2017).

No caso da LT, a mesma pode ser dividida em leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LMC). LC é a manifestação clínica mais comum das leishmanioses, caracterizadas pela formação de úlceras na face e membros (Blanco *et al.*, 2013). Essas lesões podem cicatrizar de forma espontânea no período entre 2-5 anos, dependendo do agente etiológico (espécie) e da resposta imunológica do hospedeiro

vertebrado. As principais espécies causadoras da LC são *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo (Fraga *et al.*, 2012).

A LCD também se inicia com um nódulo indolor que dissemina na superfície cutânea. Os parasitos causadores dessa manifestação clínica podem se instalar na face, orelhas e superfícies extensoras, como joelhos e cotovelos. As lesões de pele podem progredir ainda mais para difundir placas e machas pigmentadas (Revisado por: Scorza & Carvalho, 2017). A LCD é a forma mais rara da doença e é caracterizada pela ausência de uma resposta imunológica do hospedeiro (anergia).

A disseminação hematogênica ou linfática nas lesões cutâneas pode ocasionar a LMC. Caracterizada por lesões destrutivas do septo nasal, lábios e palato, a manifestação da LMC está relacionada a uma forte resposta imunopatológica. A *L. braziliensis* é a espécie responsável pela maioria das doenças mucocutâneas, embora outras espécies possam estar implicadas, como *L. guyanensis*. A mucosa oral e nasal é preferencialmente afetada, podendo levar a desfiguração permanente (Revisado por: Cincura *et al.*, 2017). A LMC precisa ser diagnosticada e tratada rapidamente, pois pode levar à morte em casos de infecção secundária (Goto & Lindoso, 2010; Fraga *et al.*, 2012; Andrade-Neto *et al.*, 2018)

A LD é definida pela presença de lesões localizadas em duas ou mais partes do corpo. Histologicamente, é possível observar poucos parasitos nas lesões devido à presença de uma resposta imunológica do hospedeiro (Revisado por Hashiguchi *et al.*, 2016). Já a leishmaniose recidiva está relacionada a casos de LC, onde novas lesões surgem ao redor da cicatriz antiga, podendo expandir. Essas lesões são infiltradas por uma grande quantidade de linfócitos (Revisado por: Burza *et al.*, 2018).

LV ou calazar é considerada a forma mais grave das leishmanioses, onde os protozoários atingem as vísceras do hospedeiro vertebrado como baço, fígado, medula óssea e nódulos linfáticos (Neuber *et al.*, 2008; Rey, 2008). *L. infantum* (*syn* de *L. chagasi* no Novo Mundo) e *L. donovani* são as principais espécies causadoras dessa manifestação clínica. Raros são os casos onde *L. tropica* e *L. amazonensis* são implicadas nessa forma de leishmaniose (Myler & Fasel, 2008; van Griensven & Diro, 2012). Os principais sintomas são febre alta, diarreia, esplenomegalia e hepatomegalia. Quando não tratada, a LV pode levar à morte dentro do período de dois anos como resultado da infecção ou anemia grave (Kaye & Scott, 2011).

A leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC) é uma complicação da leishmaniose visceral causada por protozoários da espécie *L. donovani*. A LDPC é caracterizada pela presença de pequenas úlceras geralmente nos braços e troncos. Apesar de ser considerada uma manifestação clínica pós-cura de LV, existem casos relatados de pacientes com LDPC sem histórico prévio de LV (Desjeux *et al.*, 2013).

Em relação à epidemiologia, as leishmanioses estão presentes em 98 países com aproximadamente 350 milhões de pessoas em risco. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), de 200 a 400 mil novos casos de LV ocorrem anualmente no mundo, e no caso da LC os novos casos anuais estão entre 0,7-1,2 milhão. As epidemias de leishmaniose podem estar diretamente relacionadas à migração, conflitos (guerras no Oriente Médio) e também desastres ecológicos. Os casos registrados de LC tiveram um aumento considerável nos últimos anos, e 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Arábia Saudita, Argélia, Brasil, Irã e Síria (Fig.3). Dos casos de LV, 90% ocorrem na Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Brasil, Sudão e Sudão do Sul (Fig.4) (Pavli & Malzetou, 2010; Georgiadou *et al.*, 2015; DNDi, 2017)

A LT é considerada pela OMS como uma das seis doenças infecciosas mais importantes, devido ao elevado número de indivíduos infectados e a capacidade de produzir deformidades (Ministério da Saúde, 2017). Enquanto a LC apresenta tendência de autocura, a LV é fatal quando não tratada, causando um efeito anual de mortalidade em torno de 59 mil indivíduos (35 mil homens e 24 mil mulheres) (Desjeux, 2004; den Boer *et al.*, 2011).

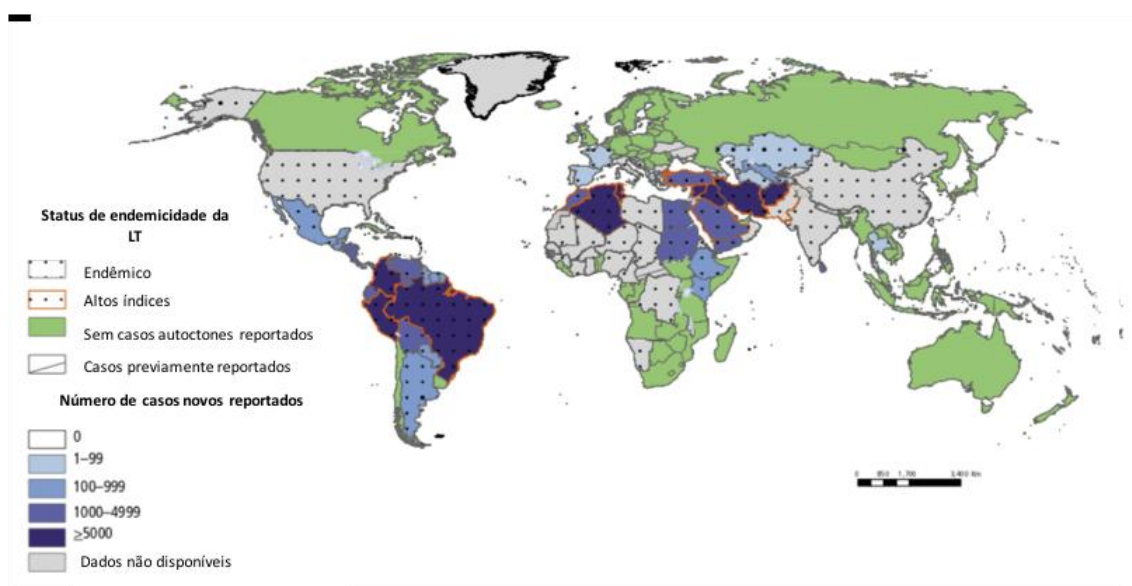


Figura 3 – Distribuição geográfica da LT no mundo. (Adaptado de WHO, 2017)

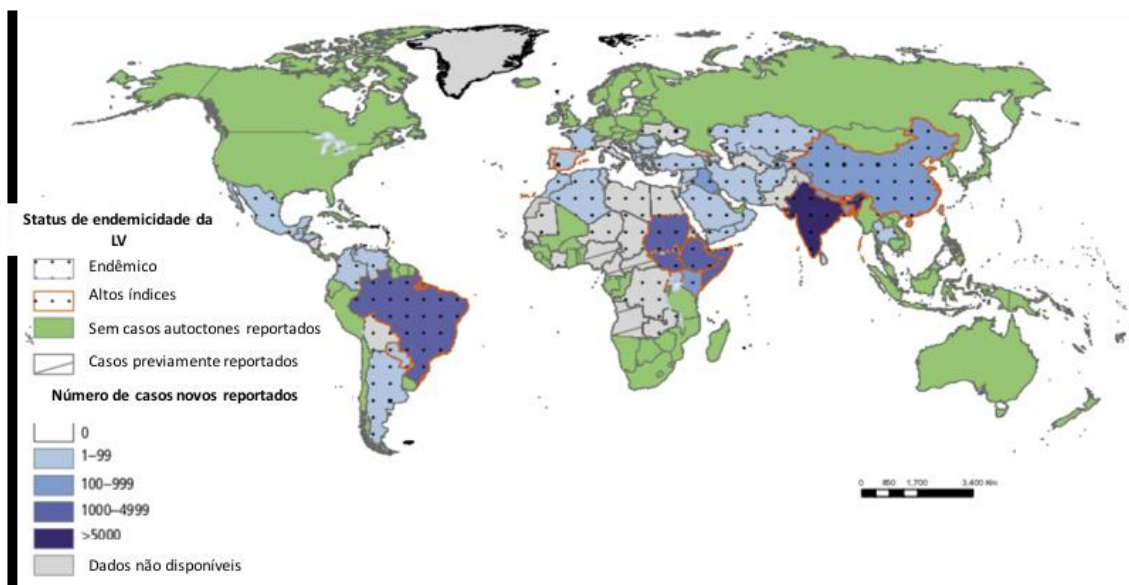


Figura 4 – Distribuição geográfica da LV no mundo. (Adaptado de WHO, 2017)

1.1.4 Tratamento das leishmanioses

Desde a década de 1940, os fármacos de referência utilizados para o tratamento das leishmanioses incluem os antimoniais pentavalentes, que substituíram os antimoniais trivalentes por apresentarem efeitos menos tóxicos, além de maior solubilidade e estabilidade (Ait-oudhia *et al.*, 2012). Vale ressaltar que os antimoniais trivalentes eram utilizados desde o início do século XX, quando tiveram sua eficácia descoberta por Gaspar Vianna, após utilizar tártaro emético (um antimonial trivalente) para o tratamento de LC. (Vianna, 1912).

Os antimoniais são responsáveis pela diminuição da geração de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) devido à inativação de enzimas da via glicolítica e da oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas dos protozoários (Singh & Sivakumar, 2004). Atualmente disponibilizam-se duas principais formulações com Sb^{+5} : antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato de meglumina) e o estibogluconato de sódio. O primeiro é disponibilizado no Brasil como Glucantime, enquanto o nome comercial do estibogluconato de sódio é Pentostam, que não é usado no Brasil. É sabido que os antimoniais pentavalentes são pró-fármacos que se reduzem e geram Sb^{+3} no interior do fagolisossomo da célula hospedeira (Ministério da Saúde, 2017).

Apesar da atividade contra *Leishmania* spp., esses compostos apresentam algumas desvantagens. São injetáveis, com administração diária por via intramuscular

ou endovenosa, havendo a necessidade de hospitalização do paciente em vários casos. Além disso, uma série de efeitos colaterais já foi relatada com o uso desses medicamentos. Náuseas, febre, vômitos, tontura, edema no local de aplicação, mialgia, artralgia, cefaleia e distúrbios gastrointestinais são alguns dos efeitos observados durante o tratamento com os antimoniais. Ainda, apresentam elevada cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, o que limita o uso desses medicamentos em pacientes cardiopatas, nefropatas, hepatopatas, imunodeprimidos, idosos e gestantes (Gasser *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2011; Lyra *et al.*, 2016). O aumento do número de casos de falha terapêutica e resistência dos parasitos também é um fator limitante ao uso dos antimoniais pentavalentes (Revisado por: Ponte-Sucre *et al.*, 2017).

Ao longo dos anos, novas alternativas terapêuticas têm sido utilizadas para contornar as desvantagens causadas pelo uso dos fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Em regiões de falha terapêutica e resistência dos parasitos aos antimoniais, a anfotericina B tem sido utilizada para o tratamento dessas doenças. No Brasil, esse composto é utilizado como fármaco de segunda escolha. Sua atividade leishmanicida foi demonstrada inicialmente em 1960 por Sampaio *et al.* A anfotericina B possui afinidade pelo ergosterol, um tipo de esterol presente na membrana plasmática de fungos e tripanossomatídeos, porém ausente em mamíferos, que possuem colesterol na membrana. A interação desse composto com o ergosterol leva à formação de poros na membrana plasmática do parasito, causando a perda de conteúdo celular e consequentemente a morte celular (Mishra *et al.*, 2007).

Apesar da afinidade ao ergosterol, Singh *et al.* (2014) relataram que a anfotericina B também é capaz de se ligar ao colesterol, causando prejuízos às próprias células do paciente. A necessidade de administração endovenosa e a elevada nefrotoxicidade requerem hospitalização do paciente. Náuseas, vômitos, febre, insuficiência renal, flebite, trombocitopenia, calafrios e dores nas articulações são alguns efeitos causados pelo uso da anfotericina B. (Mishra *et al.*, 2007).

Com atividade antibacteriana e antiparasitária, a paromomicina é um aminoglicosídeo cuja atividade leishmanicida foi inicialmente relatada no final da década de 1960 (Neal, 1968). Há relatos de seu uso para o tratamento da LV e de sua formulação tópica para a LC (Blum & Hatz, 2009). Seu mecanismo de ação não é totalmente conhecido, porém sabe-se que há uma interferência na síntese proteica do parasito devido à interação do fármaco com os ribossomos (Sundar & Chakravarty, 2008).

Outra alternativa para o tratamento de pacientes com LV que são resistentes aos antimoniais é a pentamidina, uma poliamina que em algumas regiões do Novo Mundo pode ser utilizada como fármaco de primeira escolha para o tratamento de LC e LV (David & Craft, 2009; Piscopo & Azzopardi, 2006). No entanto, a sua toxicidade tem limitado o uso deste medicamento. Hipoglicemia, síncope, dores de cabeça e hipotensão são alguns efeitos relatados em pacientes com leishmaniose e tratados com pentamidina (Ministério da Saúde, 2017).

O único fármaco de administração via oral licenciado para o tratamento das leishmanioses é a miltefosina, uma fosfocolina cujo mecanismo de ação envolve uma série de alterações metabólicas do parasito, como modulação de receptores de superfície, ativação de fosfolipases, proteína cinase C e que culminam com apoptose (Verma & Dey, 2004; Pandey et al, 2009) Os primeiros ensaios clínicos sobre a eficácia desse medicamento ocorreram no início da década de 2000 na Índia, onde atualmente é licenciada para o tratamento da LV. No entanto, casos de resistência do parasito e falhas terapêuticas têm sido observados no uso deste medicamento para o tratamento da LV (Rijal, 2013; Patra 2012). No Brasil, embora alguns testes experimentais tenham demonstrado eficácia no combate aos parasitos (Machado *et al.*, 2010), a miltefosina não é licenciada para uso humano. No entanto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento licenciou o Milteforan para o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC) (Ministério da Agricultura, 2016). Além de náuseas, vômitos, distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal, existem relatos de que a miltefosina possa apresentar capacidade teratogênica (Singh *et al.*, 2014).

Desde as primeiras descobertas de fármacos com atividade leishmanicida (Sb^{+3} em 1912) até o licenciamento da miltefosina no início do século XXI, o tratamento das leishmanioses tem se demonstrado bastante desafiador, visto que os fármacos disponíveis apresentam elevada toxicidade. Ainda, a falha terapêutica, recidiva e a resistência dos parasitos também são fatores que motivam a busca pela descoberta e/ou reposicionamento de fármacos que atuem em alvos específicos do parasito, sem trazer prejuízo ao hospedeiro vertebrado. Nessa direção, a via de biossíntese de esteróis tem sido estudada na busca por novos alvos seletivos (Urbina *et al.*, 1997; Magaraci *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2002). No entanto, pouco avanço tem sido observado a respeito da caracterização desses alvos seletivos, visto que a maioria das enzimas da via de biossíntese de esteróis é comum aos mamíferos e tripanossomatídeos.

1.2 Esteróis

Os esteróis são derivados esteroidais com 27 a 29 átomos de carbono contendo um grupamento hidroxila (-OH) no carbono 3 (C3). Sua estrutura tem origem a partir do ciclopentanoperidrofenantreno, também conhecido como “núcleo esteroidal” ou “núcleo central dos esteroides”, que possui quatro anéis hidrocarbonetos fundidos, sendo três deles com seis carbonos e um com cinco carbonos (Fig. 5) (Revisado por: Roberts et al., 2003).

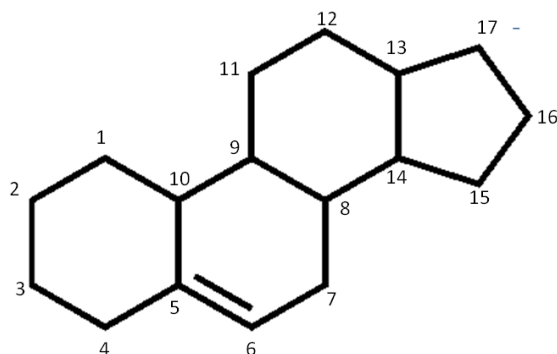


Figura 5 – Estrutura do ciclopentanoperidrofenantreno. (Adaptado de Roberts *et al.*, 2003).

Esses lipídeos estruturais são considerados ubíquos em todos os eucariotos. Eles servem tanto como componentes estruturais da membrana celular, bem como precursores de metabólitos. O colesterol é o esteroide mais importante das células de mamíferos, apresentando em sua estrutura um grupamento polar (-OH em C3) e um apolar formado por hidrocarbonetos no núcleo esteroidal e na cadeia lateral do C17 (Fig. 6a).

As principais funções deste grupo envolvem o crescimento e a viabilidade celular (Nelson, 2002), desempenhando um papel importante como elemento estrutural e funcional das membranas, atuando como modulador da fluidez. A membrana plasmática é rica em colesterol, enquanto que as membranas do complexo golgiense apresentam uma quantidade intermediária de esteróis. O colesterol também atua como precursor dos ácidos biliares e hormônios esteroides (aldosterona e hormônios sexuais) (Chang *et al.*, 2006).

Nos tripanossomatídeos, os esteróis participam no crescimento normal das células. Participam da manutenção da arquitetura da membrana, onde esteróis livres interagem com os fosfolipídeos, controlando a fluidez de membrana e permitindo a continuidade das funções celulares (Coombs *et al.*, 1991).

1.2.1 Esteróis como alvos farmacológicos

Uma vez que os esteróis desempenham papéis cruciais na organização, dinâmica e funcionalidade das membranas celulares, esses compostos têm sido amplamente estudados como alvo farmacológico. Na busca para o desenvolvimento racional de novos fármacos, a escolha de um alvo seletivo no parasito é essencial. Enquanto os mamíferos produzem colesterol (Fig. 6a), os tripanossomatídeos produzem esteróis com esqueleto ergostano, como o ergosterol (Fig. 6b). As duas moléculas apresentam semelhanças estruturais, como o núcleo esteroidal (ciclopentanoperidrofenantreno). No entanto, é possível observar que a principal diferença entre a estrutura desses esteróis se deve ao fato de que os esteróis com esqueleto ergostano apresentam uma metilação no carbono 24, diferente dos esteróis com esqueleto colestano (Revisado por: Souza & Rodrigues, 2009; Almeida-Amaral *et al.*, 2014).

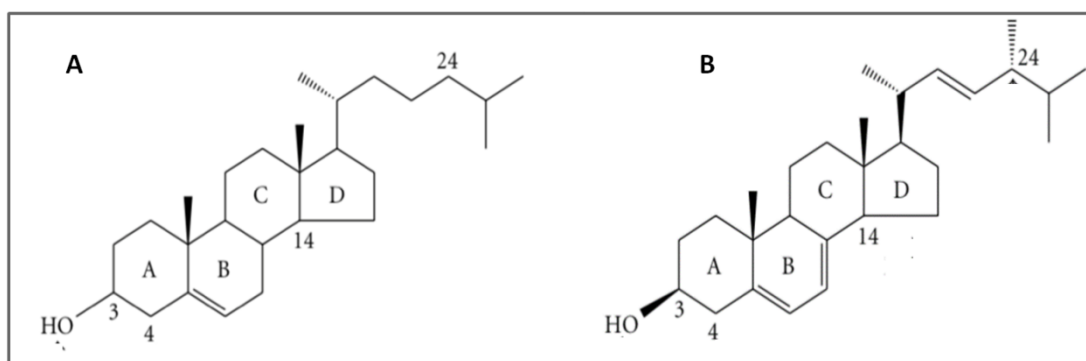


Figura 6 – Estrutura dos esteróis de mamíferos (A - colesterol) e tripanossomatídeos (B - ergosterol). (Adaptado de Souza & Rodrigues, 2009)

Dentro dessa perspectiva, é importante compreender o funcionamento da via de biossíntese de esteróis em tripanossomatídeos, de forma a buscar novos alvos que estejam envolvidos na formação do ergosterol, produto final da via dos esteróis presente em tripanossomatídeos e fungos e ausente em mamíferos.

1.2.2 Via de biossíntese de esteróis

Os estudos a respeito da via de biossíntese dos esteróis tiveram início na década de 80 e o conhecimento foi adquirido em parte devido aos estudos com fungos. A semelhança com *Leishmania* spp. foi primeiramente observada após a identificação de compostos da via, como o esqualeno, lanosterol (**1**) e dimetilzimosterol (**3**) (Fig. 7) (Goad *et al.*, 1984).

A primeira etapa da via envolve a formação do ácido mevalônico, após a condensação de duas moléculas de acetil-Coenzima A (acetil-CoA), formando acetoacetil-CoA. Essa se liga com uma terceira acetil-CoA, gerando a hidroximetilglutaril Coenzima A (HMG CoA). A HMG CoA sofre redução pela ação da enzima Hidroximetilglutaril Coenzima A redutase (HMG CoA redutase). A geração do esqualeno ocorre através de um mecanismo complexo com uma série de intermediários cíclicos com diversas migrações de ligações ou de grupos alquila. O 2,3-epóxido de esqualeno é gerado a partir da epoxidação do esqualeno nas posições 2 e 3. Essa molécula se apresenta como substrato para a geração do lanosterol (**1**) após reações de oxirredução dependentes de NADPH-citocromo P450 redutase. Em mamíferos e tripanossomatídeos ocorre a formação do lanosterol (**1**), enquanto em plantas o cicloartenol é gerado a partir do 2,3-epóxido de esqualeno. O lanosterol é considerado o primeiro esteroide da via, caracterizado pela presença do núcleo esteroidal. O zimosterol (**7**) é gerado a partir de reações de oxirredução catalisadas pela enzima esteroide C14 desmetilase (14DM), tendo o metilzimosterol (**5**) como substrato. Os principais esteróides dos tripanossomatídeos possuem esqueleto $\Delta^{5,7}$ C₂₈-ergostano com uma metila no C₂₄. Coombs et al., em 1991, relataram que a metilação no C₂₄ ocorre de forma tardia na via e que o zimosterol (**7**) atua como o principal substrato dessa reação. Então, a partir do zimosterol (**7**), a via de biossíntese de esteróides se modifica de acordo com o organismo. Os produtos finais da via são esteróides com esqueleto ergostano (ergosterol e seus derivados) em tripanossomatídeos, esteróides com esqueleto estigmastano em plantas (estigmasterol) e esteróides com esqueleto colestano (colesterol) em mamíferos (Roberts et al., 2003; Almeida-Amaral et al., 2014).

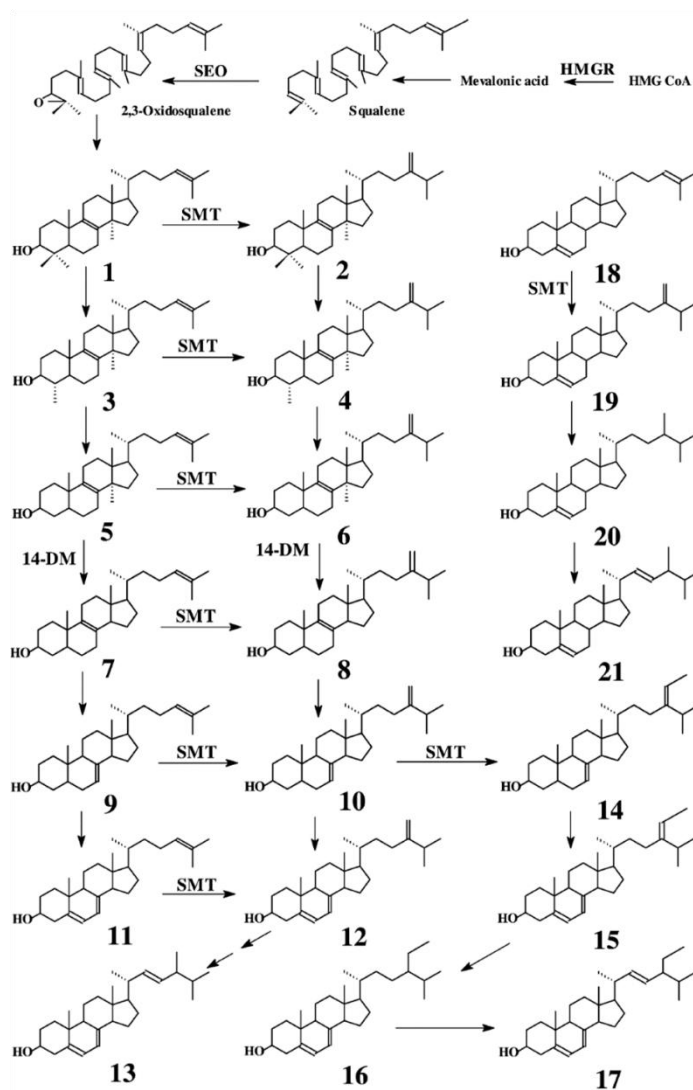


Figura 7 – Via de biossíntese dos esteróis em *Leishmania* spp.. **1:** Lanosterol (4,4,14 α - dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **2:** (24-metilenodesidrolanosterol); **3:** Dimetilzimosterol (4 α ,14 α - dimetilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **4:** obtusofoliol (4 α ,14 α -dimetilergosta-8,24 (241)-dieno-3 β -ol); **5:** metilzimosterol (14 α -metilcolesta-8,24-dieno-3 β -ol); **6:** 4-desmetilesterol (14 α -metilergosta-8,24 (241)- dieno-3 β -ol); **7:** zimosterol (colesta-8,24-dieno-3 β -ol); **8:** fecosterol (ergosta-8,24(241)-dieno-3 β -ol); **9:** colesta-7,24-dieno-3 β -ol; **10:** episterol (ergosta-7,24(241)-dieno-3 β -ol); **11:** colesta-5,7,24-dieno-3 β -ol; **12:** desidroepisterol (ergosta-5,7,24(241)-trieno-3 β -ol); **13:** Ergosterol (ergosta-5,7,22-trieno-3 β -ol); **14:** estigma-7,24(241)-dieno-3 β -ol ou ergota-7-eno-3 β -ol e 24-etilidinoolest-7-eno-3 β -ol; **15:** estigmasta-5,7,24(241)-trieno-3 β -ol; **16:** estigmasta-5,7-dieno-3 β -ol; **17:** 7-desidroporiferasterol (estigma-5,7,22-trieno-3 β -ol); **18:** desmosterol (colesta-5,24-dieno-3 β -ol); **19:** ergosta-5,24(241)-dieno-3 β -ol; **20:** ergosta-5-eno-3 β -ol; **21:** estigmasterol (ergosta-5,22-dieno-3 β -ol). **HMG CoA:** 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A; **HMGR:** 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase; **SEO:** esqualeno 2,3 epoxidase; **14DM:** C-14 desmetilase; **SMT:** Δ 24 esterol metiltransferase. (Andrade-Neto, 2013)

1.2.3 Esterol 24-C-metiltransferase (ERG6) - EC 2.1.1.43

ERG6 é uma proteína de 150 kilodaltons (kDa) associada à membrana plasmática em plantas, fungos e tripanossomatídeos, porém ausente em mamíferos. Estudos iniciais de fracionamento celular sugeriram que a ERG6 está localizada nos glicosomos e na mitocôndria (Urbina *et al.*, 2002). No entanto, análises de

imunofluorescência e microscopia eletrônica usando anticorpos específicos para a enzima demonstraram que a ERG6 está localizada no retículo endoplasmático e em vesículas da via endocítica (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2008).

A diferença estrutural anteriormente mencionada entre os produtos finais da biossíntese de esteróis entre mamíferos e tripanossomatídeos está diretamente relacionada à atividade enzimática da ERG6. Essa enzima catalisa a transferência de um grupamento metila do cofator S-adenosilmetionina (SAM) para o C24 de esteróis com esqueleto colestano, formando uma ramificação nessa posição não existente nos esteróis de mamíferos (Fig.8).

Envolvida em uma etapa tardia e única da biossíntese do ergosterol, evidências na literatura apontam a ERG6 como um alvo farmacológico em *Leishmania* spp. Por ser ausente em mamíferos e altamente conservada entre os protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, sua seletividade intensifica a busca de inibidores específicos dessa enzima (Azam *et al.*, 2014).

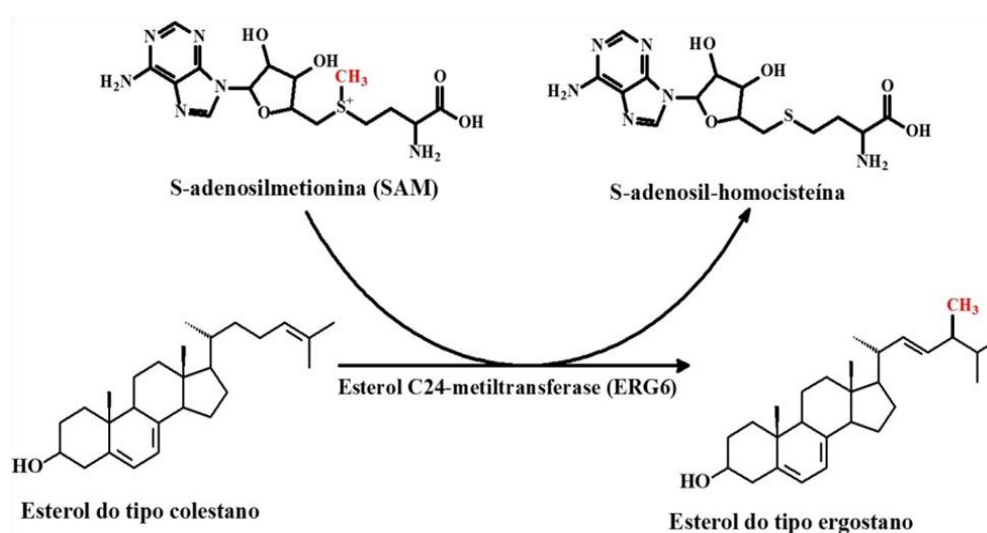


Figura 8 – Mecanismo de atuação da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6). A ERG6 transfere um grupamento metila (CH₃) do cofator S-adenosilmetionina (SAM) para esteróis com esqueleto colestano, formando esteróis do tipo ergostano.

1.2.4 Inibidores conhecidos da biossíntese de esteróis

A literatura descreve uma série de fármacos conhecidos que inibem a biossíntese do ergosterol e conseqüentemente apresentam interessante atividade leishmanicida e tripanossomicida. Esses compostos agem em diversas enzimas da via, como a HMG CoA redutase, a esqualeno epoxidase, a C14-desmetilase e a ERG6. Essas proteínas são inibidas respectivamente pela classe das estatinas, alilaminas, azóis e azasteróis (Rodrigues *et al.* 2002, Haughan *et al.* 1992, Beach *et al.* 1988, Berman *et al.* 1984,

Azofra *et al.* 2010; Urbina *et al.*, 1997). No entanto, HMG CoA redutase, esqualeno epoxidase e C14-desmetilase também atuam na biossíntese do colesterol em mamíferos e, por isso, não são considerados alvos seletivos em tripanossomatídeos.

Experimentos *in vitro* mostram que esses inibidores são capazes de perturbar a viabilidade celular e levar os parasitos à morte. A terbinafina é um potente inibidor da enzima esqualeno-2,3-epoxidase em *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi* (Vanniersantos *et al.*, 1995; Urbina *et al.*, 1997). Promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* foram tratadas com esse composto da classe das alilaminas e observou-se um acúmulo de esqualeno, além da diminuição do conteúdo de esteróis na estrutura das membranas celulares (Roberts *et al.*, 2003).

Outra classe descrita com importante atividade leishmanicida são os azóis. inibidores da enzima C14-desmetilase. Dados na literatura mostram que promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp. tratadas com fluconazol, cetoconazol e itraconazol, desenvolvidos inicialmente para o tratamento de infecções causadas por fungos, apresentaram acúmulo de esteróis metilados no C14. Esses compostos têm sido utilizados no tratamento da LC (Beach *et al.*, 1988; Singh *et al.*, 2004; Almeida-Amaral *et al.*, 2014).

Promastigotas de *Leishmania* spp. acumulam dimetilzimosterol (**3**) e obtusifoliol (**4**) quando tratadas com azóis, e a biossíntese dos esteróis majoritários da via é prejudicada, como por exemplo o 5-desidroepisterol (**12**), ergosterol (**13**) e episterol (**10**) (Fig. 7) (Berman *et al.*, 1986; Goad *et al.*, 1984). No entanto, foi observado que promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* quando tratadas com cetoconazol incorporam colesterol exógeno do meio de cultura em grande quantidade como alternativa à ausência do ergosterol inibido pelos azóis (Hart *et al.*, 1989).

Os azasteróis têm sido descritos como os principais inibidores da ERG6 (Urbina *et al.*, 1997; Magaraci *et al.*, 2003; Rodrigues *et al.*, 2002). A atividade desses compostos foi estudada em *Leishmania* spp. e em *T. cruzi* (Gros *et al.*, 2006; Haughan *et al.* 1995; Jimenez-Jimenez *et al.* 2008, Lorente *et al.* 2004), onde observou-se um declínio de esteróis metilados no C24 e acúmulo de esteróis com esqueleto colestano, como o colesterol, o colest-5,7,24-trieno-3 β -ol (**11**) e colest-7,24-dieno-3 β -ol (**9**) (Fig. 7).

É sabido que a inibição de enzimas de etapas iniciais e intermediárias da via de biossíntese (HMG CoA redutase, esqualeno epoxidase e C14-desmetilase) leva os parasitos à morte. Porém, todas essas etapas são comuns ao hospedeiro humano e,

embora existam fármacos baseados nesse mecanismo de ação usados para o tratamento de doenças causadas por fungos, nenhum deles mostrou-se eficaz o suficiente para ser licenciado para a leishmaniose (Revisado por Galvão *et al.*, 2017).

No caso da ERG6, que possui participação tardia na via de biossíntese, os azasteróis são descritos como seus principais inibidores. Azasterois são derivados esteroídicos contendo nitrogênio como heteroátomo. Rodrigues *et al.* em 2002 demonstraram a atividade leishmanicida do 22,26-azasterol contra *L. amazonensis*, porém com um mecanismo de ação diferente da inibição da ERG6. Esse dado reforça a importância da busca de novos candidatos a fármacos que sejam de fato inibidores específicos da ERG6.

1.3 Azapterocarpanos

Substâncias previamente caracterizadas e descritas com determinada atividade biológica são mais atraentes na busca de candidatos a fármacos (Kappe & Dallinger, 2006). Derivados de produtos naturais, os isoflavonoides (Fig. 9a) são compostos conhecidos pela atividade preventiva do câncer, da osteoporose e doenças cardíacas. Um dos principais isoflavonoides são os pterocarpanos (Fig. 9b), substâncias produzidas pelos vegetais envolvidas na defesa contra ataques externos de predadores. Esses compostos atuam como fitoalexinas, apresentando atividade antimicrobiana (Andersen & Markham, 2005). Os pterocarpanos possuem um núcleo tetracíclico (benzo-pirano-furano-benzeno) derivado das isoflavonas e dados na literatura mostram que essas substâncias apresentam atividade contra bactérias e fungos, além de função antitumoral e inseticida (Bandara *et al.*, 1989; Militão *et al.*, 2006; Morimoto *et al.*, 2006; Jiménez-Gonzales *et al.*, 2008).

Pterocarpanos quando possuem pelo menos um átomo de nitrogênio em seu núcleo tetracíclico são chamados de azapterocarpanos (Fig. 9C). Em dados não publicados pelo nosso grupo de pesquisa, esses derivados nitrogenados foram capazes causar a morte de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Ainda, trabalhos na literatura demonstraram ação antineoplásica de alguns pterocarpanos em células mamárias, sanguíneas e pulmonares, além de atividade antileishmania e antimalária contra *L. amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, respectivamente (da Silva *et al.*, 2002; da Silva *et al.*, 2009; Netto *et al.*, 2010).

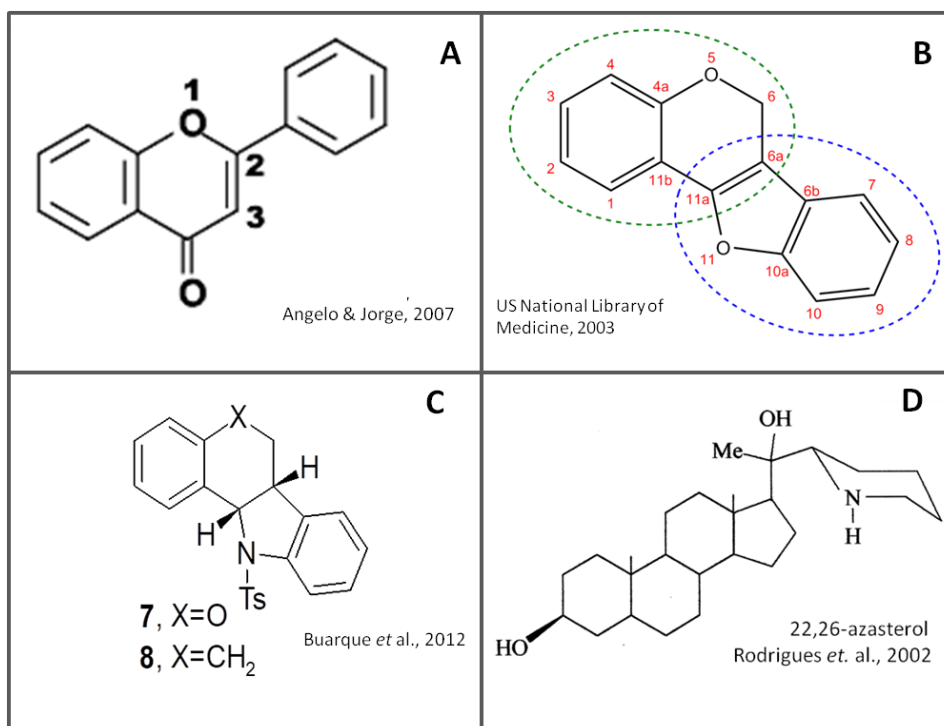


Figura 9 – Estrutura química dos isoflavonóides (A), pterocarpanos (B), azapterocarpanos (C) e azasteróis (D). O círculo verde pontilhado do pterocarpano representa o complexo benzeno-pirano ou “benzo-pirano”, enquanto o círculo pontilhado azul representa o complexo furano-benzene.

Devido à semelhança estrutural desses compostos com os inibidores conhecidos da ERG6, os azasteróis (Fig. 9d), uma das propostas desse trabalho foi avaliar o mecanismo de ação de uma série de derivados azapterocarpanos como possíveis inibidores dessa enzima.

1.4 Azasteroides

Azasteróis que possuem nitrogênio em sua estrutura, mas não apresentam uma hidroxila no C3 de seu núcleo esteroidal são chamados de azasteroides. Os esteroides são uma das classes mais importantes de compostos naturais e sintéticos com diversas atividades biológicas, o que leva não somente a importantes descobertas, mas também ao desenvolvimento de novas moléculas na química medicinal. Devido à sua capacidade de atravessar membranas com facilidade e realizar várias atividades nos sistemas biológicos, diversas modificações na estrutura dos esteroides têm sido realizadas a fim de obter derivados esteroidais que apresentem determinada atividade biológica e menos ou poucos efeitos colaterais indesejáveis.

Esses análogos esteroidais podem ser formados pela condensação de diferentes grupos químicos ou do núcleo esteroidal, modificando suas atividades biológicas. A

maioria dos azasteroides possuem origem sintética devido à presença do nitrogênio em sua estrutura e que não modifica o arranjo espacial da molécula esteroidal.

Durante as últimas décadas, os azasteroides foram sintetizados e relatados como potenciais inibidores competitivos, não competitivos ou irreversíveis da enzima 5 α -redutase de humanos. A finasterida (Fig. 10a), conhecida inibidora da enzima 5 α -redutase, foi inicialmente desenvolvida para o tratamento de hiperplasia prostática benigna e reposicionada posteriormente para tratamento da calvície masculina (Kaufman & Dawber, 2000). A partir de modificações no núcleo esteroidal desses derivados, novos compostos vem sendo sintetizados como possíveis inibidores dessa enzima. São exemplos desses derivados o 11-azasteroide (Huang *et al.*, 2014) e o 4-azasteroide (Fig. 10b) (Liang *et al.*, 1984), sendo o último apresentando elevada atividade análoga a da finasterida (Fig. 10a).

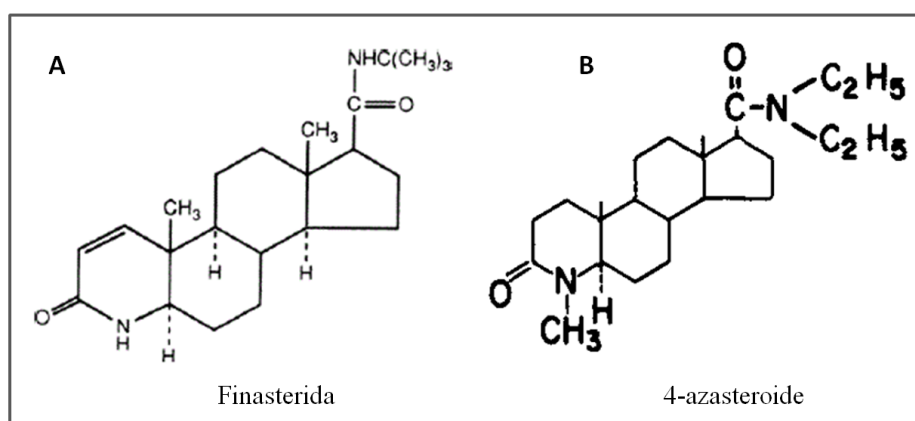


Figura 10 – Estrutura química da finasterida (A) e do 4-azasteroide (B). (Adaptado de Richa *et al.*, 2018; adaptado de Liang *et al.*, 1984)

Embora não exista evidência experimental na literatura comprovando a atividade inibitória de azasteroides que não sejam azasteróis sobre a ERG6 de *Leishmania* spp., a semelhança estrutural com o núcleo esteroidal do ergosterol (Fig. 6b) pode ser um indicativo da atividade de outros azasteroides sobre a via de biossíntese de esteróis, principalmente sobre a enzima ERG6.

Neste estudo, investigamos o mecanismo de ação de uma série de candidatos a fármacos da classe dos azapterocarpanos, azasteroides e da imipramina, inibidora conhecida de metiltransferases (Fisar, 2005; Zimmermann *et al.*, 2012), como possíveis inibidores da ERG6 de *L. amazonensis* e *L. infantum* através da superexpressão do alvo estudado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer uma estratégia direcionada à ERG6 de *Leishmania* spp. para a prospecção de candidatos a fármacos para a leishmaniose.

2.2 Objetivos específicos

- 1- Clonar e subclonar a ERG6 de *L. amazonensis* e *L. infantum*.
- 2- Obter *L. amazonensis* e *L. infantum* superexpressando a ERG6.
- 3- Validar a superexpressão da ERG6 quanto ao nível de expressão e crescimento parasitário.
- 4- Avaliar a toxicidade dos azasteroides sobre células de mamíferos e estabelecer a seletividade dos fármacos sobre as espécies testadas.
- 5- Verificar o mecanismo de ação dos derivados azapterocarpanos, azasteroides e da impramina como inibidores da ERG6.

3 METODOLOGIA

3.1 Desenvolvimento dos protótipos

3.1.1 Azapterocarpanos e azasteroides

Os candidatos a fármacos utilizados neste trabalho foram planejados e sintetizados através de técnicas de química medicinal pelos respectivos grupos de pesquisa abaixo:

Azapterocarpanos – Representados pelo código LQB, os compostos foram planejados e sintetizados pelo grupo do Dr. Ayres Guimarães Dias e Dr. Paulo Roberto Ribeiro da Costa, do Departamento de Química Orgânica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) e do Laboratório de Química Bioorgânica (LQB) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IPPN-UFRJ), respectivamente.

Azasteroides – Representados pelo código ND, os compostos foram planejados e sintetizados pelo grupo da Dra. Neelima Dhingra Passi, do Departamento de Química Farmacêutica do Instituto Universitário de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Panjab, Índia.

3.1.2 Imipramina

A imipramina, um antidepressivo com atividade inibitória contra metiltransferases, foi obtida comercialmente (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA).

3.2 Considerações éticas

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Oswaldo Cruz (CEUA/IOC) aprovou a utilização de animais neste estudo sob a licença L-026/2015.

3.3 Parasitos

Neste estudo, tanto a cepa *wild type* (WT) quanto os organismos transfectados das espécies de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) foram cultivadas no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos (LBqT) e mantidas a 26°C em meio RPMI (Sigma-Aldrich) suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina, 5 mg/mL de hemina, 0,5 mg/mL de ácido fólico, 0,2 mg/mL de D-biotina, 4mg/mL de adenina. No caso dos parasitos transfectados com o gene de interesse no vetor episomal, o antibiótico de seleção paromomicina (Sigma-Aldrich)

foi usado nas duas primeiras passagens (800µg/mL na primeira passagem e 1600 µg/mL na segunda passagem) após a eletroporação. Posteriormente, Geneticina (G418) (200µg/mL) (Sigma-Aldrich) foi utilizado como agente selecionador das cepas recombinantes.

3.4 Clonagem, transfecção e superexpressão

Para o estudo e avaliação do mecanismo de ação de uma série de candidatos a fármacos, o gene que codifica a ERG6 foi clonado e subclonado em plasmídeos e promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram transfectadas com o vetor episomal recombinante visando a superexpressão da ERG6.

O DNA de promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foi obtido através do kit de extração de DNA genômico (*Wizard Genomic DNA Purification*- Promega). Em seguida, o gene da ERG6 (GenBank:GQ451910.1) foi amplificado a partir de uma reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos baseados no N-terminal e C-terminal da sequência gênica de interesse. Para a ERG6 de *L. amazonensis* foi usado o *primer* senso 5'-*ggatcc*ATGTCCGCCGGTGGCCGTGAGACC-3' e o anti-senso 5'-*aagctt*CTAAGCCTGCTTGGACGGCTTGCG-3' contendo sítios de restrição no início da sequência para as enzimas *Bam*HI (*ggatcc*) e *Hind*III (*aagctt*). Para a ERG6 de *L. infantum* foi usado o *primer* senso 5' *ggatcc*ATGTCCGCCGGTGGCCGTGAGACC-3' e o anti-senso 5' *aagctt*CTAAGCCTGCTTGGACGGCTTGCG-3' contendo sítios de restrição no início da sequência para as enzimas *Bam*HI (*ggatcc*) e *Hind*III (*aagctt*) e desenhados a partir da sequência depositada no TriTrypDB (LinJ. 36. 2520).

Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados após a eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos de PCR através do kit *Wizard SV Gel PCR* (Promega) e inseridos no vetor pGEM®-T EASY através da estratégia de *TA cloning*. Bactérias da espécie *Escherichia coli* cepa DH5α foram transformadas e receberam o vetor recombinante por choque térmico. As colônias positivas (coloração branca) foram identificadas pela utilização de IPTG e X-Gal (BIORAD). A partir das colônias positivas de *E. coli*, as amostras de DNA plasmidial foram isoladas e purificadas com o kit *Plasmid Miniprep Purification* (Sigma-Aldrich, EUA) e a clonagem foi confirmada após digestão dos produtos de purificação plasmidial com a enzima de restrição *Eco*RI.

Para a subclonagem, o vetor de expressão pSP72αNEOα foi digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, assim como o vetor recombinante contendo o gene de

interesse (pGEM®-T + ERG6). Após eletroforese em gel de agarose (1%), os fragmentos de DNA de interesse (ERG6 e pSP72αNEOα) foram purificados utilizando o kit *PureLink® Quick Gel Extraction* e o gene inserido no vetor de expressão através de uma reação de ligação com a enzima T4 DNA Ligase (Invitrogen, EUA), gerando o vetor de expressão recombinante pSP72αNEOα + ERG6.

Por eletroporação, as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram transfectadas com o 10µg de DNA recombinante (pSP72αNEOα + ERG6) ou somente o vetor de expressão (pSP72αNEOα) em uma cubeta de eletroporação de 4mm contendo tampão HEPES-NaCl. A eletroporação foi realizada utilizando o programa V-033 do eletroporador Amaxa nucleofactor (Lonza, US), originando as cepas recombinantes *Laerg6^{high}* (promastigotas recombinantes de *L. amazonensis* com pSP72αNEOα + ERG6), *Li^{erg6^{high}}* (promastigotas recombinantes de *L. infantum* com pSP72αNEOα + ERG6), *La* + pSP72αNEOα (promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas somente com o plasmídeo) e *Li* + pSP72αNEOα (promastigotas de *L. infantum* transfectadas somente com o plasmídeo). Vinte e quatro horas após a transfecção, a pré-seleção dos parasitos recombinantes foi realizada com 800µg/mL de paromomicina na primeira passagem e com 1600µg/mL na segunda passagem. Após 20 dias, a seleção dos parasitos foi mantida com o antibiótico de seleção G418 (100-200 µg/mL) (Perez-Victoria *et al.*, 2003).

3.5 Sequenciamento

O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado para confirmar a clonagem do gene da ERG6 no vetor plasmidial pGEM®-T, verificando tanto o sucesso da reação de ligação do inserto ao plasmídeo quanto a inserção do gene na posição correta. A confirmação da identidade dos genes clonados (ERG6 de *L. amazonensis* e *L. infantum*) foi realizada na plataforma de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ (RPT01A/FIOCRUZ). Após o sequenciamento, os resultados obtidos foram comparados (BLAST) com as sequências depositadas no *GenBank* para identificar homologia entre elas.

3.6 Avaliação da expressão gênica da ERG6 por PCR quantitativo (qPCR)

Para avaliar o aumento da expressão gênica da ERG6, foram utilizadas as cepas de *L. amazonensis* e *L. infantum* selvagens cultivadas até a quarta passagem (*La*-4P e *Li*-4P) e com o número de passagens indefinidas dentro do período de um ano (*La*-WT

e Li-WT), as cepas recombinantes *Laerg6^{high}* e *Lierg6^{high}* e o grupo controle representado por parasitos de *L. amazonensis* e *L. infantum* transfectados somente com o vetor de expressão pSP72 α NEO α (La + pSP72 α NEO α ; Li + pSP72 α NEO α). As cepas La-WT, Li-WT e as cepas transfectadas foram mantidas em cultura durante o período de um ano com sucessivas passagens a cada três dias. Dois desenhos experimentais foram realizados para análise da superexpressão do alvo estudado: 72h antes da extração do RNA, todas as cepas transfectadas foram mantidas tanto com pressão de G418 (100 μ g/mL) quanto sem a presença do antibiótico de seleção. Além disso, 144h (72h+72h) antes da extração do RNA, a pressão seletiva foi retirada, ou seja, os parasitos avaliados foram mantidos durante seis dias sem G418. Em nenhum momento as promastigotas selvagens (La-4P, Li-4P, La-WT e Li-WT), foram incubadas com quaisquer concentrações do antibiótico de seleção.

O RNA mensageiro (RNAm) foi extraído de aproximadamente 1×10^7 promastigotas em fase logarítmica de crescimento utilizando o kit *SV total RNA isolation System* (Promega). Para a extração, as células foram lavadas no dia anterior através de duas etapas de centrifugação durante 10 minutos, 3.500 rotações por minuto (rpm) e ressuspensas em 500 μ L de Trizol. Os parasitos incubados com Trizol foram armazenados a -20°C *overnight*. O produto final da extração foi ressuspendido com 50 μ L de água livre de nucleases. Após, o RNA foi dosado usando o equipamento NanoDrop Lite (Thermo Scientific) e a síntese de DNA complementar (cDNA) ocorreu em um termociclador usando o kit *GoScriptTM Reverse Transcriptase* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para cada síntese, foram utilizados 5 μ g de RNA. Em seguida, o cDNA foi dosado utilizando o kit *Qubit® ssDNA Assay* (Molecular Probes) contendo *Qubit® ssDNA reagent* e *Qubit® ssDNA buffer*. A dosagem das amostras ocorreu em tubos *Qubit® Q32856* (Thermo Fisher).

O qPCR foi realizado com *SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad, EUA) e quantidades iguais de cDNA (5ng/ μ L) foram incubadas em triplicata e amplificadas em 25 μ L de reação contendo 12,5 μ L de *SYBR® Green Supermix 2x*, 1 μ L do *primer* senso (10mM), 1 μ L do *primer* anti-senso (10mM), 2 μ L de cDNA e 8,5 μ L de água livre de nuclease. A amplificação e quantificação ocorreram em um termociclador com as seguintes condições de reação: 95°C por 5 minutos e então 30 ciclos de 95°C, 60°C e 72°C por 15 segundos. A quantidade relativa dos produtos de PCR gerados foi baseada no valor de *threshold cycle* (Ct), calculado usando o método de $\Delta\Delta CT = \Delta Ct$ amostra – ΔCt de referência. Os níveis de expressão gênica foram normalizados através da análise

da expressão constitutiva do RNAm dos genes da gliceraldeído-3fosfato desidrogenase (GAPDH) e da actina. As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5 com o *teste t student*.

3.7 Caracterização fenotípica: curva de crescimento

Incubados em garrafas de cultura em um volume final de 10mL, 1×10^6 parasitos/mL foram mantidos em meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% SFB, 1% de adenina, 1% de D-biotina, 1% de ácido fólico, hemina e pH 6.5 em estufa de 26°C. Durante 8 dias consecutivos, uma alíquota de 10µl de cada garrafa de cultura foi diluída em formalina (1:10) e colocada em câmara de Neubauer para contagem. A curva de crescimento foi realizada com as cepas selvagens até a quarta passagem e parasitos com o número de passagens indefinidas dentro do período de um ano, as cepas recombinantes *Laerg6^{high}* e *Lierg6^{high}*, e o grupo controle representado por parasitos de *L. amazonensis* e *L. infantum* transfectados somente com o vetor de expressão pSP72αNEOα (La + pSP72αNEOα; Li + pSP72αNEOα). Os gráficos foram feitos pelo programa software GraphPad Prism 5.

3.8 Avaliação da atividade leishmanicida

3.8.1 Atividade antipromastigota

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* cepas selvagem (WT), La + pSP72αNEOα, Li + pSP72αNEOα, *Laerg6^{high}* e *Lierg6^{high}* cultivadas em meio RPMI sem vermelho de fenol suplementado com 10% SFB, 1% de adenina, 1% de D-biotina, 1% de ácido fólico, hemina e pH 6,5, foram incubadas com concentrações crescentes (1,56µM-100µM) das substâncias testadas (azapterocarpanos, imipramina, azasteroides e miltefosina) em placas de 96 poços por 72h. Antes da incubação, as células foram lavadas duas vezes com solução tamponada com fosfato (PBS) em etapas de centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm. Ao final das 72h, a viabilidade celular foi determinada adicionando-se 50µM de resazurina por poço e após 3h de incubação a fluorescência foi quantificada em 560nm e 590nm, excitação e emissão, respectivamente, em um espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices). Utilizando o programa GraphPad Prism 5, a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) para cada curva foi determinada por regressão linear logarítmica.

3.8.2 Atividade antiamastigota intracelular

Macrófagos peritoneais murinos foram coletados em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de glutamina e 1% piruvato, e plaqueados a $1,0 \times 10^6$ /mL em placa de 24 poços com lamínulas e incubados a 37 °C sob uma atmosfera de CO₂ a 5% durante 1h. As células não aderentes foram removidas por lavagem com meio completo pré-aquecido a 37°C. Promastigotas de La + pSP72αNEOα, Li + pSP72αNEOα, *Laerg6^{high}* e *Lierg6^{high}* foram incubadas com os macrófagos na proporção 3:1 no caso de *L. amazonensis* ou 5:1 no caso de promastigotas recombinantes de *L. infantum* por 3h. As monocamadas de células foram lavadas três vezes com RPMI suplementado pré-aquecido no caso de infecção com as promastigotas recombinantes de *L. amazonensis* e cinco vezes nas cepas Li + pSP72αNEOα e *Lierg6^{high}* com a finalidade de remover as formas promastigotas livres. Após, as substâncias foram incubadas em diferentes concentrações durante 72h. A atividade antiamastigota foi avaliada após o período de incubação microscopicamente, corando as lamínulas com InstantProv (Newprov) e contando pelo menos 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), através da seguinte fórmula: IF = % de células infectadas X número de amastigotas/número total de macrófagos. Os valores de IC₅₀ foram determinados utilizando o GraphPad Prism 5 software por análise de regressão não-linear logarítmica.

3.9 Avaliação da toxicidade

Foram plaqueados 2×10^6 macrófagos peritoneais murinos/mL em meio RPMI suplementado com 10% soro fetal bovino, 1% de glutamina e 1% piruvato em placas de 96 poços e incubadas a 37°C sob uma atmosfera de CO₂ a 5 % durante 1h. Após remoção por lavagem das células não aderentes, os macrófagos foram incubados com os azasteróides em diferentes concentrações (1μM-200μM) por 72h. Ao final desse período, a viabilidade celular foi determinada adicionando-se 50μM de resazurina por poço e após 3h de incubação a fluorescência foi quantificada em 560nm e 590nm, excitação e emissão, respectivamente, em um espectrofluorímetro *Spectra Max GEMINI XPS* (Molecular Devices). Utilizando o programa GraphPad Prism 5, o valor correspondente a metade da concentração citotóxica máxima (CC₅₀) foi determinado por regressão não linear logarítmica, e o índice de seletividade (IS) para os azasteroides foi calculado a partir da razão entre o CC₅₀ para macrófagos e IC₅₀ para amastigotas intracelulares.

4 RESULTADOS

4.1 Superexpressão do gene ERG6 em *Leishmania* spp.

4.1.1 Amplificação do gene ERG6

Visando a superexpressão do alvo estudado, o gene da ERG6 foi amplificado utilizando *primers* específicos. Os produtos amplificados gerados estão demonstrados na Figura 11 no caso da ERG6 de *L. amazonensis* e na Figura 12 para a ERG6 de *L. infantum*. Os fragmentos de DNA de interesse possuem em sua sequência nucleotídica 1062 pares de base (pb) em ambas as espécies de *Leishmania* abordadas neste estudo.

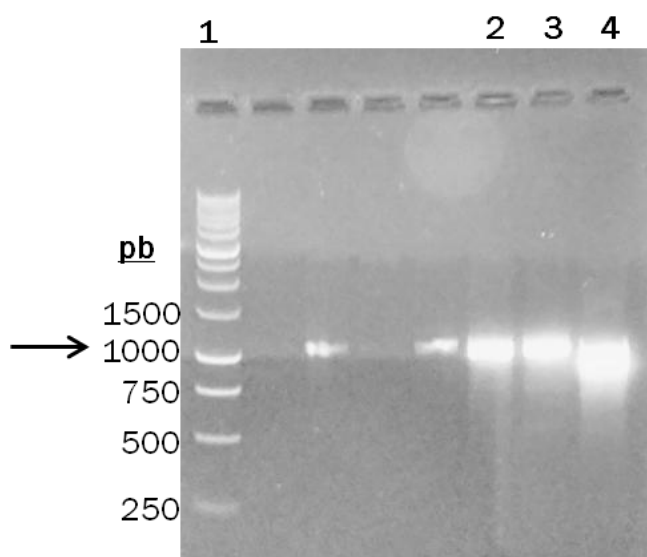


Figura 11 – Eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose (1%) corados com GelRed®. O DNA genômico de *L. amazonensis* foi extraído e o gene alvo amplificado por PCR utilizando primers específicos. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2 – DNA de *L. amazonensis* diluído em água livre de nuclease (1:1) (22,8ng/μL); 3 – DNA de *L. amazonensis* diluído em água livre de nuclease (1:10) (17,8ng/μL); 4 – DNA de *L. amazonensis* total (31,7ng/μL). A seta preta representa o tamanho do fragmento de DNA amplificado (ERG6) esperado (1062pb). pb = pares de bases.

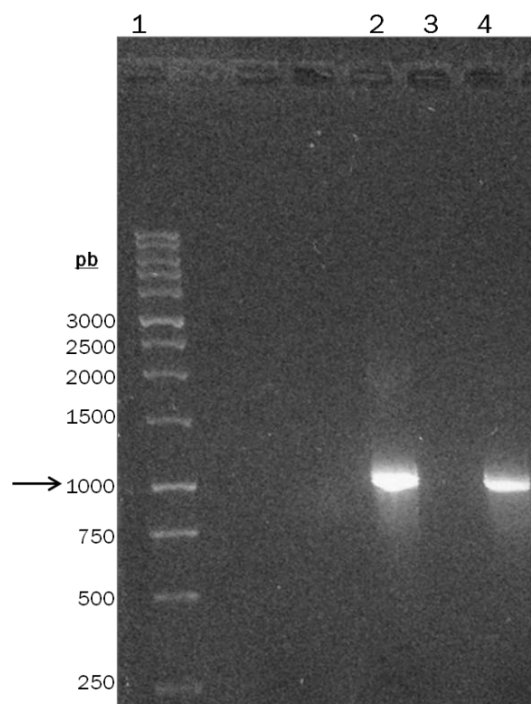


Figura 12 – Eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose (1%) corados com GelRed®. O DNA genômico de *L. infantum* foi extraído e o gene alvo amplificado por PCR utilizando primers específicos. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2 – DNA amplificado total de *Leishmania infantum*; 3 – Controle negativo (sem DNA); 4 – DNA amplificado de *L. infantum* diluído em água livre de nuclease (1:10). A seta preta representa o tamanho do fragmento de DNA amplificado (ERG6) esperado (1062pb). pb = pares de bases.

Uma vez que a amplificação do gene de interesse foi realizada, os fragmentos de DNA foram purificados utilizando um kit comercial (QI Aquick) de extração de DNA a partir do gel de agarose e posteriormente clonados no vetor pGEM-T pela estratégia de *TA cloning*.

4.1.2 Clonagem do gene ERG6

A confirmação da inserção do gene (ERG6) no vetor (pGEM-T) ocorreu após purificação plasmideal através da digestão com enzimas de restrição do plasmídeo recombinante contendo o gene de interesse. Observamos a presença de dois fragmentos de DNA por faixa no gel de agarose, referentes ao vetor (pGEM-T) e ao inserto (ERG6), com tamanhos de 3015pb e 1062pb, respectivamente, confirmando o sucesso da etapa.

A Figura 13 representa os produtos de digestão enzimática do vetor recombinante pGEM-T + ERG6 de *L. amazonensis*, e a Figura 14 representa a digestão do vetor recombinante pGEM-T + ERG6 de *L. infantum*. É possível observar a presença de dois fragmentos de DNA por faixa em todos os clones de ambas as figuras, indicando que ocorreu a inserção do gene da ERG6 no plasmídeo.

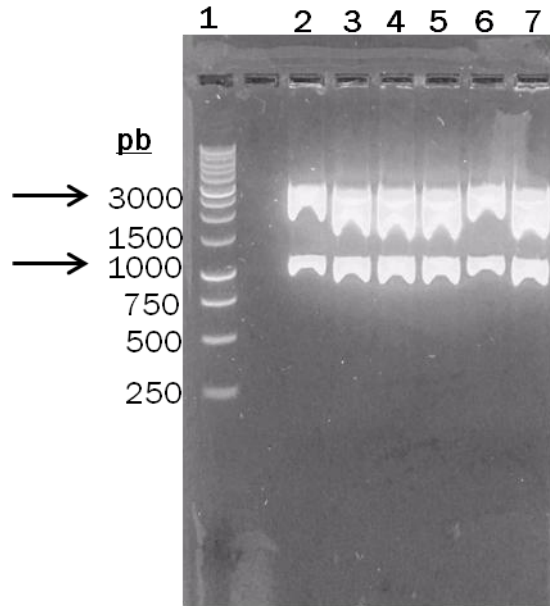


Figura 13 – Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de *L. amazonensis*) após digestão com *EcoRI*. Bactérias eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas e receberam o vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de *L. amazonensis*) por choque térmico. As colônias foram selecionadas e o DNA plasmideal foi extraído e purificado por Miniprep. Os produtos da digestão enzimática estão representados na figura. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2, 3, 4, 5, 6 e 7 – produto de purificação plasmideal a partir de bactérias competentes *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor recombinante (pGEM[®]-T + ERG6 de *L. amazonensis*). As setas pretas representam os tamanhos dos fragmentos de DNA esperados, tanto para o inserto (1062pb) quanto para o vetor (3015pb).

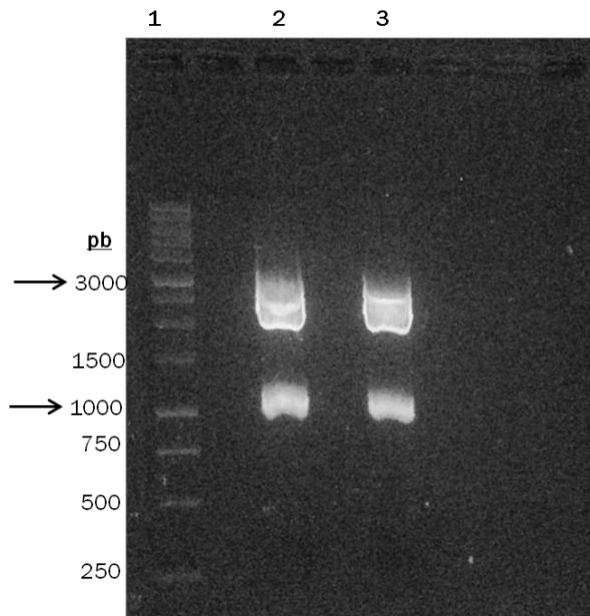


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de *L. infantum*) após digestão com *EcoRI*. Bactérias eletrocompetentes de *E. coli* DH5 α foram transformadas e receberam o vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de *L. infantum*) por choque térmico. As colônias foram selecionadas e o DNA plasmideal foi extraído e purificado por Miniprep. Os produtos da digestão enzimática estão representados na figura. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2 e 3 – produto de purificação plasmideal a partir de bactérias competentes *E. coli* DH5 α transformadas com o vetor recombinante (pGEM-T + ERG6 de *L. infantum*). As setas pretas representam os tamanhos dos fragmentos de DNA esperados, tanto para o inserto (1062pb) quanto para o vetor (3015pb).

4.1.2.1 Sequenciamento

Outra técnica importante utilizada para a confirmação da clonagem de genes de interesse é a análise da sequência nucleotídica por sequenciamento. Através do método de Sanger, além da inserção do gene no vetor na posição correta, é possível confirmar o tamanho esperado do fragmento de DNA clonado. O gene da ERG6 apresenta 1062 nucleotídeos na molécula de DNA.

Utilizando *primers* específicos, a confirmação da clonagem ocorreu a partir do alinhamento dos nucleotídeos encontrados após o sequenciamento com a sequência do gene que codifica para enzima esteroil 24-C-metiltransferase depositada no banco de dados. O alinhamento das bases nitrogenadas foi realizado tanto para a ERG6 de *L. amazonensis* quanto para a ERG6 de *L. infantum*, representados nas Figuras 15 e 16, respectivamente. Após análise, encontrou-se 100% de similaridade entre as sequências amplificadas/clonadas no banco de dados, demonstrando que o processo de clonagem do gene foi eficiente.

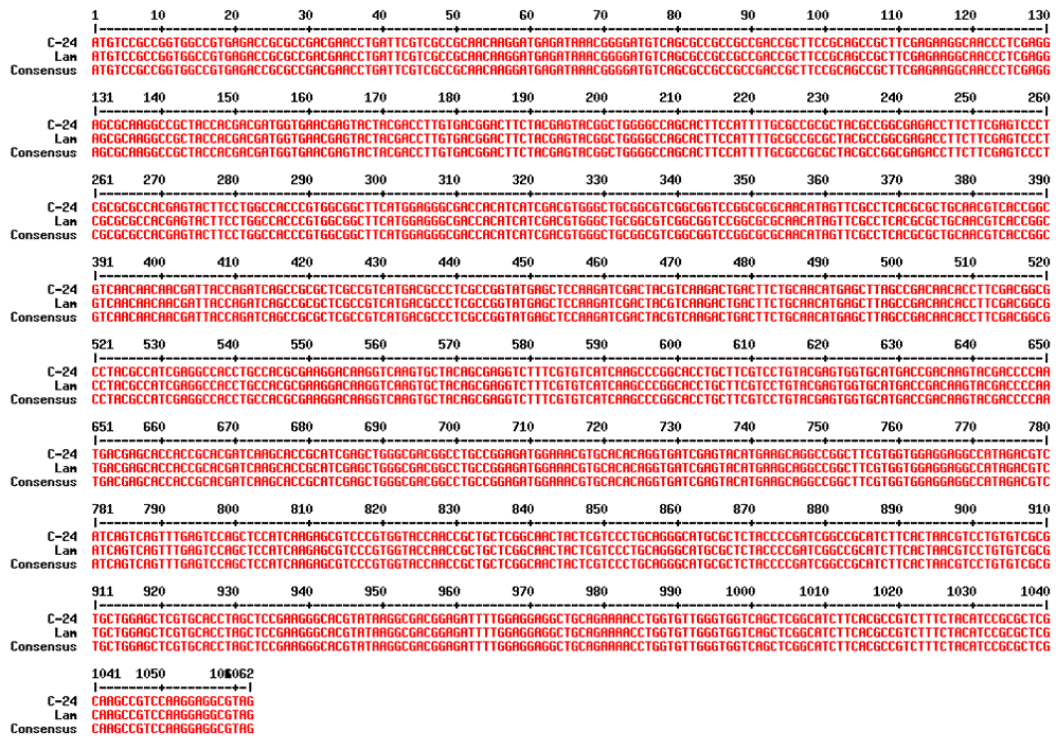


Figura 15 – Sequenciamento da ERG6 de *L. amazonensis*. *Lam*: sequência depositada da ERG6 de *L. amazonensis* no Gene bank Database (NCBI); C24: sequência da ERG6 amplificada e clonada de *L. amazonensis*.

```

1      10     20     30     40     50     60     70     80     90     100    110    120    130
L.infantumNCBI ATGTCGCGCGGTGGCCGTGAGACCGCCGACGACCTGATTCGTGCGCCACACAGGATGAGATTAACGGGATGTACGCGCGCCGCGACCGCTTCCGACGCGCTTCAGAGGACGACCTCGAGG
L.infantumClonada ATGTCGCGCGGTGGCCGTGAGACCGCCGACGACCTGATTCGTGCGCCACACAGGATGAGATTAACGGGATGTACGCGCGCCGCGACCGCTTCCGACGCGCTTCAGAGGACGACCTCGAGG
Consensus ATGTCGCGCGGTGGCCGTGAGACCGCCGACGACCTGATTCGTGCGCCACACAGGATGAGATTAACGGGATGTACGCGCGCCGCGACCGCTTCCGACGCGCTTCAGAGGACGACCTCGAGG

131  140  150  160  170  180  190  200  210  220  230  240  250  260
L.infantumNCBI AGCGCAGGGCCGCTACACGACGATGGTGAACGAGTACTACGACCTTGTGACGACCTTCTACGATACGGCTGGGGCCAGCACCTCCATTTTGGCCGCGCTACGCGCGGACGACCTTCTCGAGTCCCT
L.infantumClonada AGCGCAGGGCCGCTACACGACGATGGTGAACGAGTACTACGACCTTGTGACGACCTTCTACGATACGGCTGGGGCCAGCACCTCCATTTTGGCCGCGCTACGCGCGGACGACCTTCTCGAGTCCCT
Consensus AGCGCAGGGCCGCTACACGACGATGGTGAACGAGTACTACGACCTTGTGACGACCTTCTACGATACGGCTGGGGCCAGCACCTCCATTTTGGCCGCGCTACGCGCGGACGACCTTCTCGAGTCCCT

261  270  280  290  300  310  320  330  340  350  360  370  380  390
L.infantumNCBI CGCGGCCACGAGTACTTCTGGCCACCCGTGGCGGCTTCATGGAGGGGACACACATCATCGACGTGGGCTGGCGGCTCGCGGCGCCGACACATAGTTCCGCTCACGCGCTGCACGCTCACCGG
L.infantumClonada CGCGGCCACGAGTACTTCTGGCCACCCGTGGCGGCTTCATGGAGGGGACACACATCATCGACGTGGGCTGGCGGCTCGCGGCGCCGACACATAGTTCCGCTCACGCGCTGCACGCTCACCGG
Consensus CGCGGCCACGAGTACTTCTGGCCACCCGTGGCGGCTTCATGGAGGGGACACACATCATCGACGTGGGCTGGCGGCTCGCGGCGCCGACACATAGTTCCGCTCACGCGCTGCACGCTCACCGG

391  400  410  420  430  440  450  460  470  480  490  500  510  520
L.infantumNCBI GTCACACACAGCAGTACCAGATCAGCCGCGCTCAGCGCTATGACGACCTCGCCGCGATGAGTCCAGATCGACATCGCTCAGAGCTGACCTTCGACACATGAGCTTACGCGACACACCTTCGACGGGG
L.infantumClonada GTCACACACAGCAGTACCAGATCAGCCGCGCTCAGCGCTATGACGACCTCGCCGCGATGAGTCCAGATCGACATCGCTCAGAGCTGACCTTCGACACATGAGCTTACGCGACACACCTTCGACGGGG
Consensus GTCACACACAGCAGTACCAGATCAGCCGCGCTCAGCGCTATGACGACCTCGCCGCGATGAGTCCAGATCGACATCGCTCAGAGCTGACCTTCGACACATGAGCTTACGCGACACACCTTCGACGGGG

521  530  540  550  560  570  580  590  600  610  620  630  640  650
L.infantumNCBI CCTACGCCATCGAGGCCACTTGCACGCGAGAGACAGGTCAGGTGCTACAGCGAGGCTTTCGTGTCATCAGCCCGGACCTGCTTCGCTGTCACAGTGGTGCATGACCGACAGTACGACCCCAA
L.infantumClonada CCTACGCCATCGAGGCCACTTGCACGCGAGAGACAGGTCAGGTGCTACAGCGAGGCTTTCGTGTCATCAGCCCGGACCTGCTTCGCTGTCACAGTGGTGCATGACCGACAGTACGACCCCAA
Consensus CCTACGCCATCGAGGCCACTTGCACGCGAGAGACAGGTCAGGTGCTACAGCGAGGCTTTCGTGTCATCAGCCCGGACCTGCTTCGCTGTCACAGTGGTGCATGACCGACAGTACGACCCCAA

651  660  670  680  690  700  710  720  730  740  750  760  770  780
L.infantumNCBI TGACGAGCACCACCGACGATCAGCACCAGCTCAGGCTGGGCGACGGCTGCCGAGATGGAAAGTGCACACAGGTGATCGAGTACATGAGCAGGCGGCTTCGTTGGGAGGAGCCATAGACGTC
L.infantumClonada TGACGAGCACCACCGACGATCAGCACCAGCTCAGGCTGGGCGACGGCTGCCGAGATGGAAAGTGCACACAGGTGATCGAGTACATGAGCAGGCGGCTTCGTTGGGAGGAGCCATAGACGTC
Consensus TGACGAGCACCACCGACGATCAGCACCAGCTCAGGCTGGGCGACGGCTGCCGAGATGGAAAGTGCACACAGGTGATCGAGTACATGAGCAGGCGGCTTCGTTGGGAGGAGCCATAGACGTC

781  790  800  810  820  830  840  850  860  870  880  890  900  910
L.infantumNCBI ATCAGTCAGTTTGAATCCAGCTCCATCAGAGGCGTCCCGTGGTACACACCGCTGCTCGGACACTCTGTCCTCCGAGGGCATGCGCTCACCCGATCGCCGATCTTCACTACGCTCTGTGCGGG
L.infantumClonada ATCAGTCAGTTTGAATCCAGCTCCATCAGAGGCGTCCCGTGGTACACACCGCTGCTCGGACACTCTGTCCTCCGAGGGCATGCGCTCACCCGATCGCCGATCTTCACTACGCTCTGTGCGGG
Consensus ATCAGTCAGTTTGAATCCAGCTCCATCAGAGGCGTCCCGTGGTACACACCGCTGCTCGGACACTCTGTCCTCCGAGGGCATGCGCTCACCCGATCGCCGATCTTCACTACGCTCTGTGCGGG

911  920  930  940  950  960  970  980  990  1000  1010  1020  1030  1040
L.infantumNCBI TGCCTGAGCTCGTGACCTAGCTCCGAGGGGACGATATAGGGCAGCGAGATTTTGAGGGAGGCTGCAGAAACCTGGTGTGGGTGGTTCAGCTCGGATCTTCACGCGCTCTTCTACATCCGCGCTG
L.infantumClonada TGCCTGAGCTCGTGACCTAGCTCCGAGGGGACGATATAGGGCAGCGAGATTTTGAGGGAGGCTGCAGAAACCTGGTGTGGGTGGTTCAGCTCGGATCTTCACGCGCTCTTCTACATCCGCGCTG
Consensus TGCCTGAGCTCGTGACCTAGCTCCGAGGGGACGATATAGGGCAGCGAGATTTTGAGGGAGGCTGCAGAAACCTGGTGTGGGTGGTTCAGCTCGGATCTTCACGCGCTCTTCTACATCCGCGCTG

1041 1050 10602
L.infantumNCBI CAGCCGCTCAGGAGGCGTAG
L.infantumClonada CAGCCGCTCAGGAGGCGTAG
Consensus CAGCCGCTCAGGAGGCGTAG

```

Figura 16 – Sequenciamento da ERG6 de *L. infantum*. *L. infantum* NCBI: sequência depositada da ERG6 de *L. infantum* no Gene bank Database (NCBI); *L. infantum* clonada: sequência da ERG6 amplificada e clonada de *L. infantum*.

4.1.3 Subclonagem do gene ERG6

Após a confirmação da clonagem, gene da ERG6 foi subclonado em um vetor de expressão, o pSP72αNEOα. Para isso, uma nova reação de ligação ocorreu após as digestões do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6) e do vetor de expressão pSP72αNEOα (Figura 17). Nesta etapa, todas as digestões foram realizadas com o uso das enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III, como demonstram as Figuras 17 e 18. O sucesso desta etapa está relacionado a duas observações no gel de agarose (1%): a presença de dois fragmentos de DNA na faixa do vetor recombinante (pGEM-T + ERG6) nos tamanhos 3015pb para o plasmídeo e 1062pb para o inserto, assim como a presença de um fragmento de DNA na faixa do vetor de expressão pSP72αNEOα (5021pb) (Fig. 17); na Figura 18 é possível observar que a reação de ligação do gene da ERG6 ao novo plasmídeo (pSP72αNEOα) ocorreu devido à presença de dois fragmentos de DNA por faixa nos tamanhos esperados (1062pb para ERG6 e 5021pb para pSP72αNEOα).

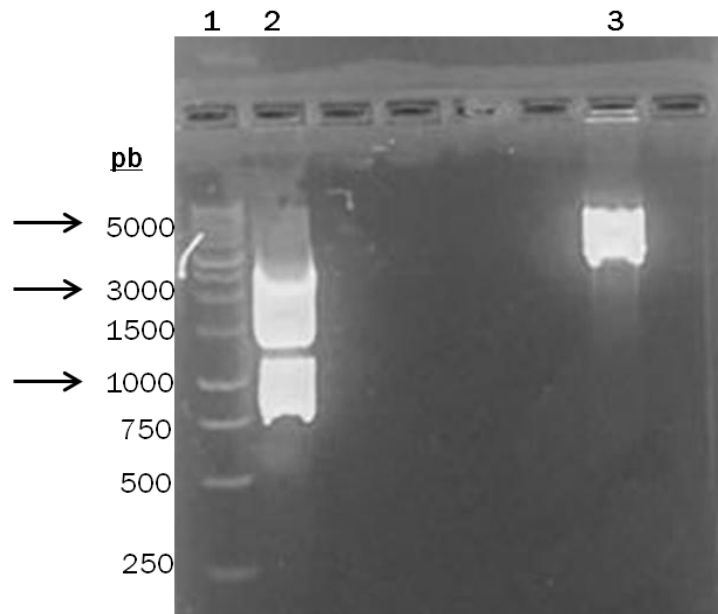


Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor recombinante (pGEM[®]-T + ERG6) e vetor de expressão (pSP72αNEOα) após digestão com *Bam*HI e *Hind*III. Após purificação plasmidial, o vetor recombinante (pGEM[®]-T + ERG6) e o vetor de expressão (pSP72αNEOα) foram digeridos e os fragmentos de DNA de interesse purificados a partir do gel de agarose. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2 – pGEM[®]-T + ERG6; 3 - pSP72αNEOα. As setas pretas representam os tamanhos dos fragmentos de DNA esperados, tanto para o inserto (1062pb) quanto para os plasmídeos (3015pb para pGEM[®]-T e 5021pb para pSP72αNEOα).

Em seguida à reação de ligação com a enzima DNA T4 Ligase, a confirmação da inserção do gene da ERG6 no pSP72αNEOα ocorreu após uma nova digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III (Figura 18).

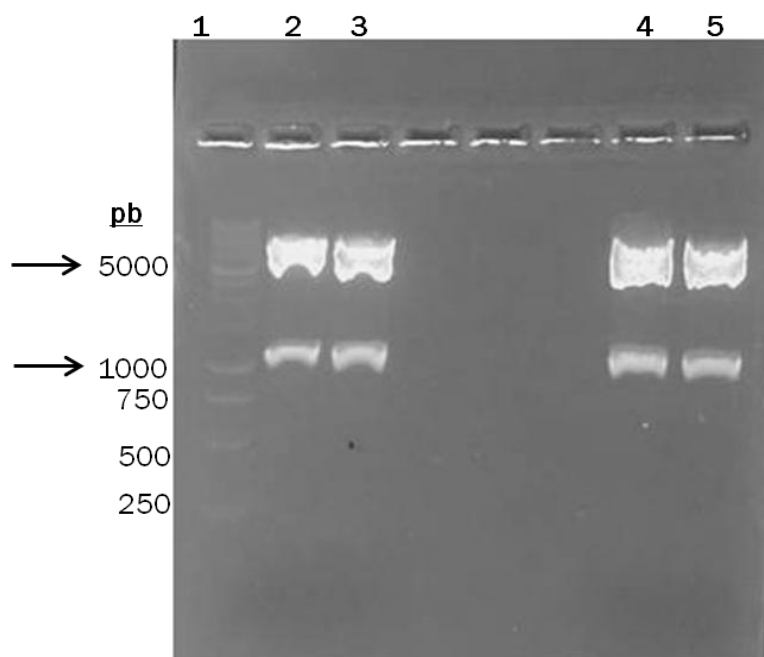


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose (1%) dos produtos do vetor de expressão recombinante (pSP72αNEOα + ERG6) após digestão com *Bam*HI e *Hind*III. 1 – Marcador de peso molecular (1kb); 2, 3, 4 e 5 – pSP72αNEOα + ERG6. As setas pretas representam os tamanhos dos fragmentos de DNA esperados, tanto para o inserto (1062pb) quanto para o vetor (5021pb).

Uma vez que a subclonagem foi confirmada, promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foram transfectadas por eletroporação, recebendo o DNA recombinante (pSP72αNEOα + ERG6) ou somente o vetor de expressão (pSP72αNEOα), utilizado como controle.

4.2 Avaliação da expressão gênica

A análise da expressão gênica dos parasitos transfectados foi realizada por qPCR visando a confirmação da maior produção de RNAm dos genes de interesse (ERG6 de *L. amazonensis* e ERG6 de *L. infantum*).

As Figuras 19 e 20 representam o primeiro desenho experimental da análise da superexpressão do alvo em promastigotas de *L. amazonensis* (Fig.19) e *L. infantum* (Fig. 20). Nesse caso, 72h antes da extração do RNA, as cepas transfectadas foram mantidas tanto com pressão de G418 [*Laerg6^{high}*(G418), *Lierg6^{high}*(G418), La + pSP72αNEOα (G418) e Li + pSP72αNEOα (G418)] quanto sem a presença do antibiótico de seleção [*Laerg6^{high}*, *Lierg6^{high}*, La + pSP72αNEOα e Li + pSP72αNEOα]. O RNA das cepas selvagens de *L. amazonensis* e *L. infantum* também foi extraído em duas condições de crescimento distintas: promastigotas da cepa selvagem (WT) cultivadas até a quarta passagem (La-4P e Li-4P) e promastigotas da

cepa selvagem (WT) com o mesmo número de passagens das cepas transfectadas (La-WT e Li-WT). As promastigotas selvagens (La-4P, Li-4P, La-WT e Li-WT) em nenhum momento foram incubadas com quaisquer concentrações do antibiótico de seleção.

No caso das promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas, é possível observar um aumento da expressão relativa de aproximadamente 17 vezes comparando *Laerg6^{high}* (G418) com La-4P e de aproximadamente 20 vezes comparando *Laerg6^{high}* com La-4P (Fig. 19). Não foi observada diferença significativa comparando os grupos: La-4P e La-WT; La-4P e La + pSP72 α NEO α (G418); La-4P e La + pSP72 α NEO α ; La-WT e pSP72 α NEO α (G418); La-WT e pSP72 α NEO α .

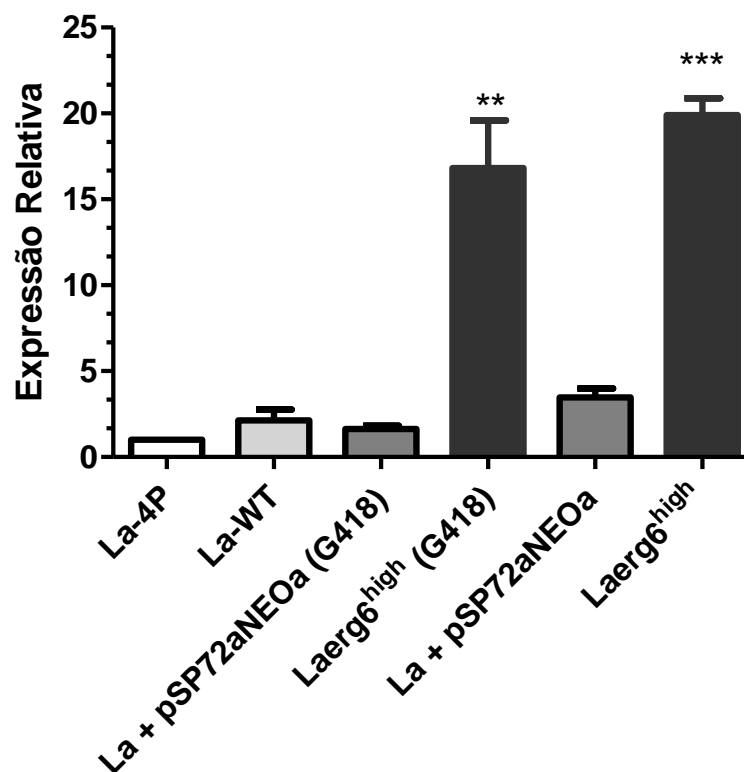


Figura 19 – Análise da expressão gênica de ERG6 em promastigotas transfectadas e seus controles de *L. amazonensis* mantidas com ou sem G418 72h antes da extração de RNA. La-4P: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a quarta passagem; **La-WT:** promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas com o número de passagens indefinidas no período de um ano; **La + pSP72αNEOα (G418):** promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas somente com o vetor de expressão e selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA; **Laerg6^{high}(G418):** promastigotas recombinantes de *L. amazonensis* transfectadas com pSP72αNEOα + ERG6 e selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA; **La + pSP72αNEOα:** promastigotas de *L. amazonensis* não selecionadas com G418 72h antes da extração do RNA e transfectadas somente com o vetor de expressão; **Laerg6^{high}:** recombinantes de *L. amazonensis* não selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA e transfectadas com pSP72αNEOα + ERG6. A análise estatística foi realizada através do teste *t student*. **: Laerg6^{high}(G418) x La-4P; Laerg6^{high}(G418) x La-WT; Laerg6^{high}(G418) x La + pSP72αNEOα (G418); Laerg6^{high}(G418) x La + pSP72αNEOα. ***: Laerg6^{high} x La-4P; Laerg6^{high} x La-WT; Laerg6^{high} x La + pSP72αNEOα (G418); Laerg6^{high} x La + pSP72αNEOα. **: p<0,005; ***: p<0,0001.

Na análise da expressão gênica de promastigotas de *L. infantum* transfectadas é possível observar um aumento da expressão relativa de aproximadamente 45 vezes comparando Laerg6^{high} (G418) com La-4P e de aproximadamente 13 vezes comparando Laerg6^{high} com La-4P (Fig. 20). Não foi observada diferença significativa comparando os grupos: Li-4P e Li-WT; Li-4P e Li + pSP72αNEOα (G418); Li-4P e Li + pSP72αNEOα; Li-WT e Li + pSP72αNEOα (G418); Li-WT e Li + pSP72αNEOα.

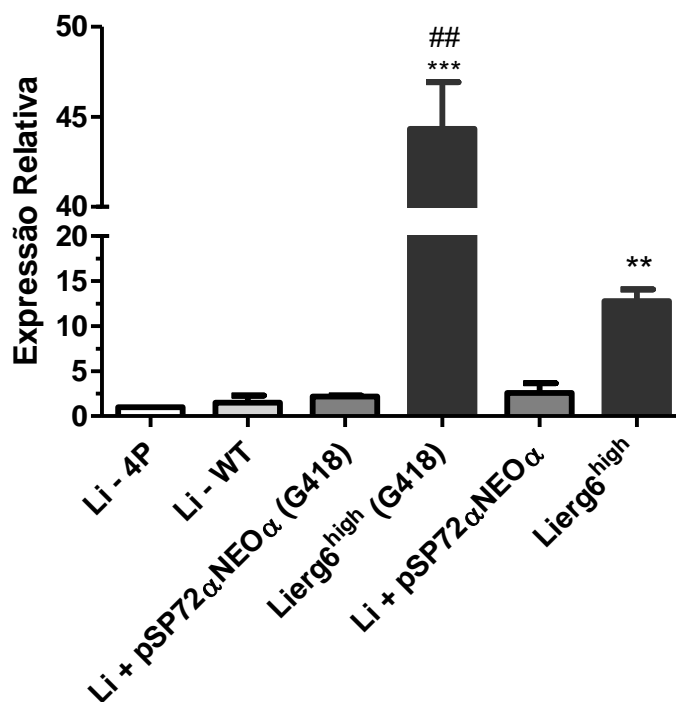


Figura 20 – Análise da expressão gênica de ERG6 em promastigotas transfectadas e seus controles de *L. infantum* mantidas com ou sem G418 72h antes da extração de RNA. Li-4P: promastigotas de *L. infantum* cultivadas até a quarta passagem; Li-WT: promastigotas de *L. infantum* cultivadas o número de passagens indefinidas no período de um ano; Li + pSP72αNEOα (G418): promastigotas de *L. infantum* transfectadas somente com o vetor de expressão e selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA; Lierg6^{high}(G418): promastigotas recombinantes de *L. infantum* transfectadas com pSP72αNEOα + ERG6 e selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA; Li + pSP72αNEOα: promastigotas de *L. infantum* não selecionadas com G418 72h antes da extração do RNA e transfectadas somente com o vetor de expressão; Lierg6^{high}: recombinantes de *L. infantum* não selecionadas com G418 72h antes da extração de RNA e transfectadas com pSP72αNEOα + ERG6. A análise estatística foi realizada através do teste *t student*. ***: Lierg6^{high}(G418) x Li-4P; Lierg6^{high}(G418) x Li-WT; Lierg6^{high}(G418) x Li + pSP72αNEOα (G418); Lierg6^{high}(G418) x Li + pSP72αNEOα. **: Lierg6^{high} x Li-4P; Lierg6^{high}(G418) x Li-WT; Lierg6^{high} x Li + pSP72αNEOα (G418); Lierg6^{high} x Li + pSP72αNEOα. ##: Lierg6^{high}(G418) x Lierg6^{high}. ##: p<0,005; **:p<0,005; ***: p<0,0001.

No segundo desenho experimental para análise da superexpressão da ERG6, os parasitos transfectados (Laerg6^{high} e La + pSP72αNEOα) ou não (La-4P e La-WT) foram mantidos 144h (seis dias) sem a pressão de G418 antes da extração de RNA. É possível observar um aumento da expressão relativa de aproximadamente 100 vezes comparando Laerg6^{high} com La-4P (Fig. 21). Não foi observada diferença significativa comparando os grupos: La-4P e La-WT; La-4P e La + pSP72αNEOα; La-WT e pSP72αNEOα.

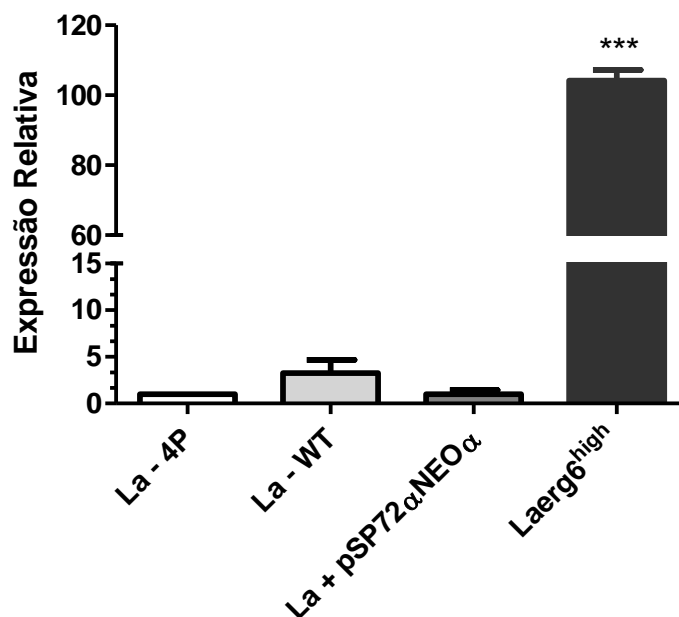


Figura 21 – Análise da expressão gênica das promastigotas transfectadas e seus controles de *L. amazonensis* mantidas sem G418 por 144h (seis dias) antes da extração de RNA. **La-4P**: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a quarta passagem; **La-WT**: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas com o número de passagens indefinidas no período de um ano; **La + pSP72αNEOα**: promastigotas de *L. amazonensis* mantidas 144h sem G418 antes da extração do RNA e transfectadas somente com o vetor de expressão; **Laerg6^{high}**: promastigotas recombinantes de *L. amazonensis* mantidas 144h sem G418 antes da extração de RNA e transfectadas com pSP72αNEOα + ERG6. A análise estatística foi realizada através do teste *t student*. ***: Laerg6^{high} x La-4P; Laerg6^{high} x La-WT; Laerg6^{high} x La + pSP72αNEOα. ***: p<0,0001.

4.3 Caracterização fenotípica: curva de crescimento

Uma vez que a superexpressão da ERG6 em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* foi confirmada por qPCR, a curva de crescimento dos parasitos foi realizada como etapa de caracterização fenotípica das cepas geradas.

Na avaliação do crescimento parasitário das cepas de *L. amazonensis* (Fig. 22) é possível observar que os parasitos não transfectados apresentaram padrões de crescimentos semelhantes entre eles (La-WT e La-4p), assim como as cepas que receberam somente o plasmídeo (La + pSP72αNEOα) ou o plasmídeo + gene de interesse (Laerg6^{high}). No entanto, apesar da não diferença significativa entre as quatro cepas, é possível observar uma diferença no perfil de crescimento comparando as cepas transfectadas com as não transfectadas.

Na curva de crescimento parasitário das cepas de *L. infantum* (Fig. 23) observa-se que o padrão de crescimento das quatro cepas avaliadas apresentou semelhança entre

elas, não havendo diferença significativa entre as promastigotas que superexpressam o gene e os controles experimentais (Li-WT; Li-4p; Li + pSP72αNEOα).

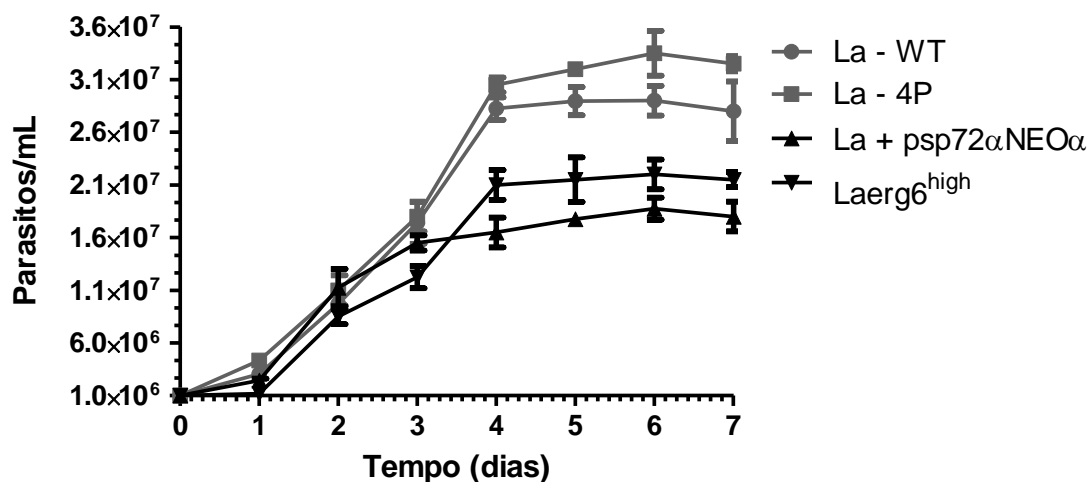


Figura 22 – Curva de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* transfetadas ou não. Uma alíquota de 10µL foi removida da cultura de cada cepa e a contagem dos parasitos realizada em câmara de Newbauer por sete dias consecutivos, a partir de um inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL. **La-WT**: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas com o número de passagens indefinidas no período de um ano; **La-4P**: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a quarta passagem; **La + pSP72αNEOα**: promastigotas de *L. amazonensis* transfetadas somente com o vetor de expressão; **Laerg6^{high}**: promastigotas recombinantes de *L. amazonensis* transfetadas com pSP72αNEOα + ERG6. Não foi observada diferença significativa através do teste *t student*, comparando sempre dois grupos experimentais.

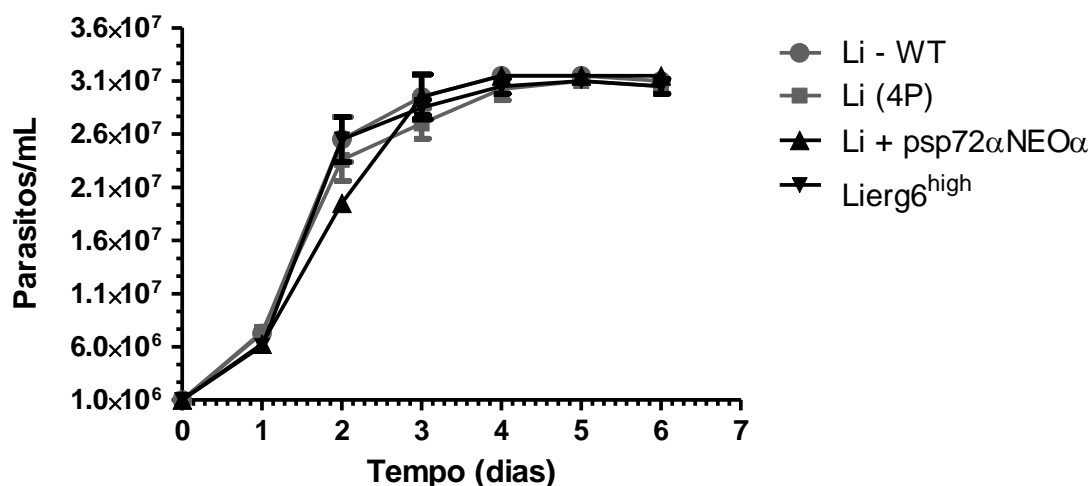


Figura 23 – Curva de crescimento de promastigotas de *L. infantum* transfetadas ou não. Uma alíquota de 10µL foi removida da cultura de cada cepa e a contagem dos parasitos realizada em câmara de newbauer por sete dias consecutivos, a partir de um inóculo inicial de 1×10^6 parasitos/mL. **Li-WT**: promastigotas de *L. infantum* cultivadas com o número de passagens indefinidas no período de um ano; **Li-4P**: promastigotas de *L. infantum* cultivadas até a quarta passagem; **Li + pSP72αNEOα**: promastigotas de *L. infantum* transfetadas somente com o vetor de expressão; **Liarg6^{high}**: promastigotas recombinantes de *L. infantum* transfetadas com pSP72αNEOα + ERG6. Não foi observada diferença significativa através do teste *t student*, comparando sempre dois grupos experimentais.

4.4 Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos

4.4.1 Estrutura

Nesse trabalho, foram avaliados nove compostos químicos que apresentam um átomo de nitrogênio no núcleo tetracíclico (benzo-pirano-furano-benzeno) de sua estrutura (Fig. 24).

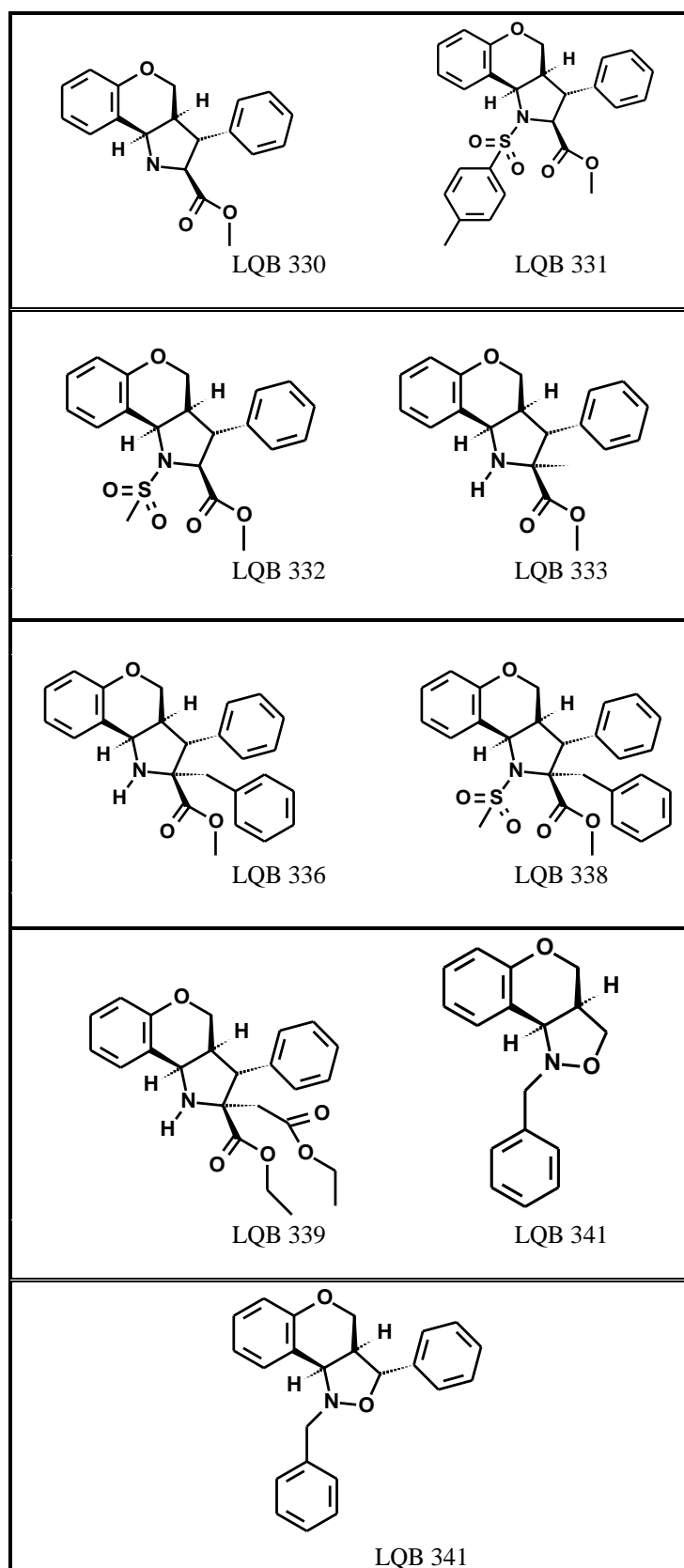


Figura 24 - Azapterocarpanos da série LQB. As substâncias foram planejadas pelos Drs. Ayres Guimarães Dias e Paulo Roberto Ribeiro da Costa

4.4.2 Atividade antipromastigota dos azapterocarpanos

Promastigotas das cepas recombinantes (La + pSP72αNEOα, *Laerg6^{high}*, Li + pSP72αNEOα e *Lierg6^{high}*) foram incubadas com os azapterocarpanos, imipramina e miltefosina em diferentes concentrações (0,8-100μM) e a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) foi determinada. Os parasitos transfectados somente com o vetor pSP72αNEOα foram utilizados como controle (La + pSP72αNEOα e Li + pSP72αNEOα) e a miltefosina como fármaco de referência.

Tabela 1 – Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos, imipramina e miltefosina contra *L. amazonensis* (La + pSP72αNEOα e *Laerg6^{high}*).

Azapterocarpanos	<i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotas)	
	La + pSP72αNEOα (μM)	<i>Laerg6^{high}</i> (μM)
LQB 330	>100	>100
LQB 331	>100	>100
LQB 332	>100	>100
LQB 338	>100	>100
LQB 341	>100	>100
LQB 333	45,33 ± 4,4	80,83 ± 1,2 *
LQB 336	9,1 ± 0,43	20,05 ± 2,4 *
LQB 339	30,30 ± 0,21	48,96 ± 2,7 *
LQB 343	17,45 ± 0,18	21,87 ± 1,2
Imipramina	6,97 ± 1,14	10,95 ± 1,85
Miltefosina	5,17 ± 0,7	6,8 ± 1,02

Valores de IC₅₀ correspondem à média de três experimentos independentes conduzidos em triplicata ± erro padrão. La + pSP72αNEOα: promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas somente com o vetor de expressão; *Laerg6^{high}*: promastigotas de *L. amazonensis* que superexpressam a ERG6. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando *Laerg6^{high}* x La + pSP72αNEOα. *: p<0,0001.

Os resultados demonstrados na Tabela 1 mostram valores de IC₅₀ maiores quando as promastigotas *Laerg6^{high}* foram tratadas com LQB 333, LQB 336, LQB 339 e LQB 343 em comparação com o grupo controle La + pSP72αNEOα, apresentando diferença significativa entre os grupos tratados com LQB 333, LQB 336 e LQB 339. Ou seja, os parasitos de *L. amazonensis* que superexpressam o gene da ERG6 se tornaram menos sensíveis aos compostos acima destacados. Os valores de IC₅₀ aumentaram aproximadamente 2,2 vezes e 1,8 vezes no tratamento de *Laerg6^{high}* com LQB336 e LQB333, respectivamente, comparando com La + pSP72αNEOα. Promastigotas de *Laerg6^{high}* também tiveram sua sensibilidade reduzida à substância LQB 339, porém com aumento do IC₅₀ menor que duas vezes em comparação com o grupo controle. A imipramina, descrita como inibidora de metiltransferases, não

apresentou diferença significativa em sua atividade comparando as duas cepas recombinantes. Como esperado, a miltefosina não apresentou diferença de atividade entre La + pSP72αNEOα e *Li*erg6^{high}.

Tabela 2 – Atividade leishmanicida dos azapterocarpanos, imipramina e miltefosina contra *L. infantum* (Li + pSP72αNEOα e *Li*erg6^{high}).

<i>Leishmania infantum</i> (promastigotas)		
Azapterocarpanos	Li + pSP72αNEOα (μM)	<i>Li</i> erg6 ^{high} (μM)
LQB 330	>100	>100
LQB 331	>100	>100
LQB 332	>100	>100
LQB 333	>100	>100
LQB 338	>100	>100
LQB 336	17,52 ± 0,75	20,88 ± 2,6
LQB 339	35,56 ± 0,08	45,52 ± 1,2 *
LQB 341	24,76 ± 0,21	51,71 ± 2,7 *
LQB 343	25,02 ± 1,03	33,06 ± 1,56 *
Imipramina	7,95 ± 1,87	6,92 ± 0,88
Miltefosina	13,25 ± 3,71	12,21 ± 1,06

Valores de IC₅₀ correspondem à média de três experimentos independentes conduzidos em triplicata ± erro padrão. Li + pSP72αNEOα: promastigotas de *L. infantum* transfectadas somente com o vetor de expressão; *Li*erg6^{high}: promastigotas de *L. infantum* que superexpressam a ERG6. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando *Li*erg6^{high} x Li + pSP72αNEOα. *: p<0,0001.

Na Tabela 2 é possível observar que promastigotas de *Li*erg6^{high} se tornaram discretamente menos sensíveis aos compostos LQB 336, LQB 339, LQB 341 e LQB 343, com destaque para LQB341 que apresentou IC₅₀ aproximadamente duas vezes maior comparando o tratamento dos parasitos de *L. infantum* transfectados somente com o plasmídeo pSP72αNEOα. Em relação à LQB 339, essa diferença foi aproximadamente de 1,2x para os valores de IC₅₀. Comparando os dois grupos, foi observada diferença significativa entre eles quando tratados com LQB 339, LQB 341 e LQB 343. Os parasitos que superexpressam a ERG6 (*Li*erg6^{high}) não apresentaram alteração na sensibilidade à imipramina em relação ao grupo controle. Como esperado, a miltefosina não apresentou diferença significativa de atividade entre as cepas estudadas.

4.5 Avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade dos azasteroides

4.5.1 Estrutura

Nesse trabalho, foram avaliados cinco compostos químicos que apresentam um átomo de nitrogênio no núcleo esteroidal (ciclopentanoperidrofenantreno) de sua estrutura (Fig. 25).

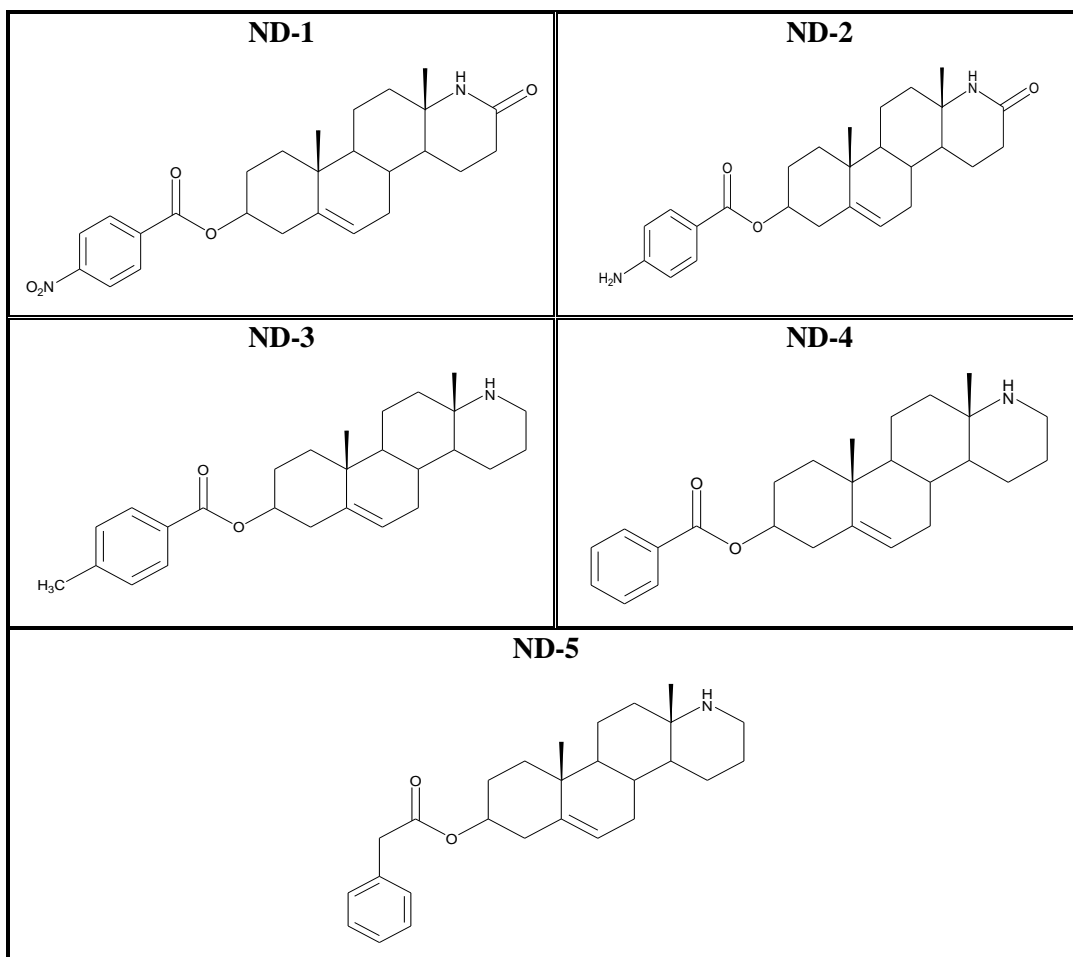


Figura 25 – Azasteroides da série ND. Os cinco compostos foram planejados e sintetizados pelo grupo da Dra. Neelima Dhingra Passi.

4.5.2 Atividade antipromastigota dos azasteroides

Promastigotas das cepas selvagens (La – 4P, La – WT, Li – 4P e Li - WT) e recombinantes (La + pSP72 α NEO α , Laerg6^{high}, Li + pSP72 α NEO α e Lierg6^{high}) foram incubadas com os derivados em diferentes concentrações (0,8-100 μ M) e a metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀) foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism 5.

Os resultados demonstrados na Tabela 3 indicam que os cinco compostos avaliados apresentaram atividade leishmanicida contra as quatro cepas de promastigotas de *L. amazonensis* estudadas (La – 4P, La – WT, La + pSP72 α NEO α e Laerg6^{high}),

sendo os derivados ND-3 e ND-4 os mais potentes entre os analisados. Em relação ao mecanismo de ação desses compostos, é possível observar que os parasitos que superexpressam a ERG6 (*Laerg6^{high}*) não tiveram sua sensibilidade alterada a nenhum dos cinco azasteroides estudados, pois os valores de IC₅₀ contra *Laerg6^{high}* foram semelhantes em relação aos outros grupos. Não foi observada diferença significativa entre as cepas transfectadas tratadas com os azasteroides da série ND.

Tabela 3 – Atividade antipromastigota dos azasteróides contra *L. amazonensis* (La – 4P, La – WT, La + pSP72αNEOα e *Laerg6^{high}*).

Azasteróides	<i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotas)			
	La – 4P (μM)	La - WT (μM)	La + pSP72αNEOα (μM)	<i>Laerg6^{high}</i> (μM)
ND-1	15,39 ± 0,49	10,12 ± 1,5	21,7 ± 1,1	22,3 ± 0,98
ND-2	13,37 ± 1,3	7,06 ± 0,22	16,39 ± 0,96	12,99 ± 0,84
ND-3	2,18 ± 0,4	1,64 ± 0,47	3,8 ± 0,32	4,1 ± 1,02
ND-4	0,48 ± 0,003	0,3 ± 1,1	1,12 ± 0,17	1,39 ± 0,17
ND-5	7,19 ± 0,25	8,61 ± 0,40	17,1 ± 0,39	17,11 ± 1,12

Valores de IC₅₀ correspondem à média de três experimentos independentes conduzidos em triplicata ± erro padrão. La – 4P: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas até a quarta passagem; La – WT: promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas com o mesmo número de passagens das cepas transfectadas; La + pSP72αNEOα: promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas somente com o vetor de expressão; *Laerg6^{high}*: promastigotas de *L. amazonensis* que superexpressam a ERG6. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando *Laerg6^{high}* x La + pSP72αNEOα.

O estudo da atividade antileishmania dos azasteroides sobre promastigotas de *L. infantum* (Tabela 4) também demonstrou que os cinco derivados são potentes contra as quatro cepas analisadas (Li – 4P, Li – WT, Li + pSP72αNEOα e *Lierg6^{high}*). Assim como no tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 3), os compostos ND-3 e ND-4 foram os mais potentes, com menor valor de IC₅₀ nos quatros grupos. Sobre a investigação do mecanismo de ação desses compostos sobre a ERG6, os resultados da Tabela 4 mostram que as promastigotas de *L. infantum* superexpressando a enzima alvo (*Lierg6^{high}*) se tornaram menos sensíveis aos compostos ND-1, ND-2 e ND-5. É possível observar diferenças significativas de aproximadamente 4x, 3x e 4x nos valores de IC₅₀ comparando o tratamento dos grupos *Lierg6^{high}* e Li + pSP72αNEOα com ND-1, ND-2 e ND-5, respectivamente.

Tabela 4 – Atividade antipromastigota dos azasteroides contra *L. infantum* (Li – 4P, Li – WT, Li + pSP72αNEOα e Li^{erg6^{high}}).

Azasteroides	<i>Leishmania infantum</i> (promastigotas)			
	Li – 4P (μM)	Li - WT (μM)	Li + pSP72αNEOα (μM)	Li ^{erg6^{high}} (μM)
ND-1	13,61 ± 0,47	18,95 ± 1,80	10,54 ± 2,9	44,07 ± 1,2 *
ND-2	10,12 ± 3,6	13,96 ± 0,16	13,52 ± 0,29	40,09 ± 0,15 *
ND-3	3,16 ± 0,64	2 ± 0,77	1,72 ± 0,26	2,32 ± 0,22
ND-4	1 ± 0,29	0,78 ± 0,88	0,39 ± 0,11	1,11 ± 0,20
ND-5	9,12 ± 0,93	6,70 ± 0,30	4,78 ± 0,80	18,63 ± 0,33 *

Valores de IC₅₀ correspondem à média de três experimentos independentes conduzidos em triplicata ± erro padrão. Li – 4P: promastigotas de *L. infantum* cultivadas até a quarta passagem; Li – WT: promastigotas de *L. infantum* cultivadas com o mesmo número de passagens das cepas transfectadas; Li + pSP72αNEOα: promastigotas de *L. infantum* transfectadas somente com o vetor de expressão; Li^{erg6^{high}}: promastigotas de *L. infantum* que superexpressam a ERG6. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando Li^{erg6^{high}} x Li + pSP72αNEOα. *: p<0,0001.

4.5.3 Atividade antiamastigota intracelular e citotoxicidade dos azasteroides

Visto que os cinco derivados estudados apresentaram atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* superexpressando ou não o gene de interesse, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram incubados em diferentes concentrações dos azasteroides (1μM-200μM) durante 72h. Os valores de CC₅₀, que correspondem à metade da concentração citotóxica máxima, foram determinados e estão representados na Tabela 5. A miltefosina foi utilizada como fármaco de referência.

Tabela 5 – Citotoxicidade (CC₅₀), atividade antiamastigota (IC₅₀) e índice de seletividade dos azasteroides contra *L. amazonensis*.

	Citotoxicidade CC ₅₀ (μM)	Amastigotas intracelulares IC ₅₀ (μM)			Índice de seletividade (SI)		
		<i>Leishmania amazonensis</i>			La – 4P	La + pSP72αNEOα	La ^{erg6^{high}}
		La – 4P	La + pSP72αNEOα	La ^{erg6^{high}}			
ND-1	>100	5,47	5,32	10,31 *	>10	>10	>9,7
ND-2	54,95 ± 0,89	4,36	6,58	11,41 *	12,6	8,3	4,8
ND-3	8,55 ± 0,48	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ND-4	4,74 ± 0,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ND-5	>100	N.D.	9,55	18,68 *	N.D.	>10	>5,3
Miltefosina	96,52 ± 3,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. – não determinado. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando La^{erg6^{high}} x La + pSP72αNEOα. *: p<0,0001.

Os valores de CC₅₀ apresentados na Tabela 5 indicam que os compostos ND-1 e ND-5 não foram tóxicos aos macrófagos murinos (CC₅₀ > 100μM) e o derivado ND-2

apresentou menor toxicidade quando comparado com ND-3 e ND-4, com valores de CC₅₀ de 54,95µM, 8,55µM e 4,74µM, respectivamente. Dessa forma, avaliando a toxicidade dos cinco compostos, uma triagem foi realizada e a atividade de ND-1, ND-2 e ND-5 contra amastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 5) e *L. infantum* (Tabela 6) foi avaliada e os valores de IC₅₀ determinados.

Analisando os valores de IC₅₀ dos três compostos é possível observar que as amastigotas de *L. amazonensis* que superexpressam a enzima esterol 24-C-metiltransferase (*Laerg6^{high}*) se tornaram menos sensíveis aos derivados comparando o tratamento dos parasitos transfectados somente com o vetor de expressão (La + pSP72αNEOα). Houve diferença significativa entre os grupos *Laerg6^{high}* e La + pSP72αNEOα tratados com os derivados ND-1, ND-2 e ND-5. O IC₅₀ de ND-1 para o tratamento de *Laerg6^{high}* foi aproximadamente 2x maior do que o IC₅₀ no tratamento de La + pSP72αNEOα. A mesma diferença foi observada nos valores de IC₅₀ de ND-5. Para ND-2, o IC₅₀ aumentou 1,7x comparando *Laerg6^{high}* e La + pSP72αNEOα.

O índice de seletividade (SI) para os azasteroides contra *L. amazonensis* e *L. infantum* está representado nas Tabelas 5 e 6 e foi calculado a partir da razão entre o CC₅₀ para macrófagos e IC₅₀ para amastigotas intracelulares. Fármacos com SI > 10 podem ser considerados seletivos contra os parasitos. Os resultados da Tabela 5 demonstram valores de SI > 10 e SI = 12,6 para os fármacos ND-1 e ND-2, respectivamente, comparando os valores de CC₅₀ com o IC₅₀ contra amastigotas de Li-4P. Na Tabela 6 é possível observar que o composto ND-1 também foi seletivo contra amastigotas de Li-4P, com SI > 10.

Tabela 6 – Atividade anti-amastigota (IC₅₀) e índice de seletividade dos azasteroides contra *L. infantum*.

	Citotoxicidade CC ₅₀ (µM) Macrófagos murinos	Amastigotas intracelulares IC ₅₀ (µM)			Índice de seletividade (SI)		
		<i>Leishmania infantum</i>			Li – 4P	Li + pSP72αNEOα	<i>Lierg6^{high}</i>
		Li – 4P	Li + pSP72αNEOα	<i>Lierg6^{high}</i>			
ND-1	>100	9,22	11,90	31,73 *	>10	>8,4	>3,1
ND-2	54,95 ± 0,89	8,25	4,42	26,67 *	6,6	12,43	2,1
ND-3	8,55 ± 0,48	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ND-4	4,74 ± 0,1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ND-5	>100	N.D.	2,44	13,54 *	N.D.	>10	>7,3
Miltefosina	96,52 ± 3,4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

N.D. – não determinado. Análise estatística foi realizada através do teste *t student*, comparando *Lierg6^{high}* x Li + pSP72αNEOα. *: p<0,0001.

Assim como na avaliação da atividade antipromastigota, as amastigotas de *L. infantum* que superexpressam a ERG6 (*Lierg6^{high}*) também se tornaram menos sensíveis aos azasteroides comparando o tratamento dos parasitos transfectados somente com o vetor de expressão (Li + pSP72 α NEO α), com diferença significativa entre os grupos. A análise da Tabela 6 permite observar que os valores de IC₅₀ aumentaram aproximadamente 3x quando amastigotas de *Lierg6^{high}* foram tratadas com ND-1 em relação aos valores do tratamento de Li + pSP72 α NEO α com esse composto. Para ND-2 e ND-5, esses valores aumentaram aproximadamente 6x comparando os dois grupos. É possível observar que ND-1 e ND-2 apresentaram atividade leishmanicida contra amastigotas da cepa selvagem de *L. infantum* cultivada até a quarta passagem (Li-4P), com IC₅₀ = 9,22 e 8,25 μ M, respectivamente.

5 DISCUSSÃO

A atividade dos inibidores da biossíntese do ergosterol em *Leishmania* spp. tem sido amplamente estudada por diversos autores (Berman et al. 1984; Goad et al. 1984; Berman et al. 1986; Beach et al. 1988; Hart et al. 1989; Vannier-Santos et al. 1999, Roberts et al. 2003; Medina et al. 2012), mostrando-se como um excelente alvo para a quimioterapia das leishmanioses. Alguns desses trabalhos mostram a inibição da C14-desmetilase, enzima da via de biossíntese de esteróis, com azóis (cetoconazol, itraconazol e fluconazol), levando ao desaparecimento dos esteróis endógenos desmetilados no carbono 14 e aumento de colesterol exógeno captado do meio (Andrade-Neto et al., 2012). No entanto, assim como os tripanossomatídeos, os mamíferos também expressam a C14-desmetilase em seu metabolismo de esteróis.

Uma das principais diferenças na composição da membrana plasmática entre organismos de diferentes grupos taxonômicos envolve a presença e o tipo de esteróis de membrana. Embora o colesterol e ergosterol apresentem estruturas químicas similares, seus efeitos nas membranas lipídicas são diferentes, modulando diferentes propriedades como a fluidez, e conseqüentemente diferentes mecanismos e respostas às interações com fármacos que agem sobre a membrana (Cournia et al., 2007). Um exemplo de fármaco cuja atividade é dependente de esterol é a anfotericina B que, em concentrações terapêuticamente relevantes, afeta a estrutura de membranas celulares contendo esterol de células eucarióticas, ao mesmo tempo em que é inativo contra membranas bacterianas isenta de esteróis. Comparando mamíferos com fungos e protozoários, o dano induzido pela anfotericina B é ligeiramente maior em membranas celulares com ergosterol do que nas membranas celulares de mamíferos ricas em colesterol (Neumann et al., 2016). Devido à sua alta eficácia, a anfotericina B tem sido usada por mais de 50 anos no tratamento da leishmaniose visceral, porém a seletividade desse composto para membranas ricas em ergosterol é limitada, causando uma série de efeitos colaterais, como a nefrotoxicidade, restringido o uso da anfotericina B em situações de risco de morte (Laniado-Laborín et al., 2009).

A busca por um alvo seletivo no parasito é essencial. Nesse trabalho buscamos inibidores específicos da enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6), visto que não existe enzima comparável na biossíntese do colesterol em mamíferos, logo sua inibição deve ser seletiva para a biossíntese do ergosterol e, portanto, para os parasitos do gênero *Leishmania*.

Uma das estratégias mais utilizadas para demonstrar o mecanismo de ação de um fármaco é a superexpressão do alvo putativo no organismo que está sendo estudado. Se o fármaco de fato atuar nesse alvo, espera-se que o organismo geneticamente modificado se torne resistente, comprovando o mecanismo.

Superexpressamos a ERG6 em *L. amazonensis* e *L. infantum* com o objetivo de investigar uma série de candidatos a fármacos que sejam inibidores dessa enzima e levem os parasitos à morte. Alguns estudos demonstram a superexpressão da esterol 24-C-metiltransferase em plantas (Neelakandan et al., 2009; Guan et al., 2017; Luo et al., 2008), no entanto a superexpressão dessa enzima em tripanossomatídeos é pouco abordada. A ERG6 de *L. donovani* foi clonada e leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* receberam o gene do parasito (Pourshafie et al., 2004). Goto et al. (2007) demonstraram a expressão da ERG6 de *L. infantum*, porém em um sistema heterólogo bacteriano.

A maioria dos trabalhos envolvendo clonagem e superexpressão da ERG6 não utiliza os protozoários como plataforma de expressão da enzima, sugerindo a dificuldade de obtenção de parasitos recombinantes. No entanto, Jiménez-Jiménez et al. em 2008 demonstraram a superexpressão da esterol 24-C-metiltransferase em *L. major*, fornecendo evidências que essa enzima está localizada no retículo endoplasmático em vesículas endocíticas. Em relação aos níveis de expressão da enzima comparando a cepa recombinante com a cepa selvagem, a quantificação demonstrou um aumento de 6x do nível de expressão em promastigotas de *L. major* transfectadas com o vetor recombinante pXSMT (pX63NEO + gene da esterol 24-C-metiltransferase) em relação às células não transfectadas.

No presente trabalho, técnicas de biologia molecular foram desenvolvidas, como clonagem e subclonagem da ERG6 nos vetores pGEM-T EASY e pSP72 α NEO α , respectivamente, visando a superexpressão da enzima em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foram utilizadas duas espécies distintas como plataformas de expressão visto que são causadoras de manifestações clínicas diferentes da leishmaniose. Enquanto *L. amazonensis* causa LC, infecção com *L. infantum* está relacionada à LV.

A superexpressão da ERG6 em *L. amazonensis* e *L. infantum* foi confirmada por qPCR comparando as cepas transfectadas com o plasmídeo recombinante (Laerg6^{high} e Lierg6^{high}) e outras três cepas: promastigotas cultivadas até a quarta passagem (La-4P e Li-4P), promastigotas cultivadas com o mesmo número de passagens das células

transfectadas (La-WT e Li-WT) e promastigotas transfectadas somente com o vetor de expressão (La + pSP72αNEOα e Li + pSP72αNEOα). Comparamos também a diferença dos níveis de expressão de *Laerg6^{high}* e *Liarg6^{high}* na presença ou ausência do antibiótico de seleção G418.

Observamos um aumento de 17x e 20x da expressão do gene da ERG6 em *Laerg6^{high}* incubadas com G418 e *Laerg6^{high}* sem G418 por 72h, respectivamente, sem diferença significativa entre os grupos. Quando as promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas 144h sem a pressão de G418, notamos um aumento da expressão relativa da ERG6 de aproximadamente 100x comparando *Laerg6^{high}* com La-4P. Esses dados indicam a possibilidade da não utilização do antibiótico de seleção em todas as passagens, além de demonstrar que o plasmídeo recombinante é mantido no interior da célula parasitária mesmo sem a seleção.

Em relação aos níveis de expressão de ERG6 quando promastigotas de *Liarg6^{high}* foram incubadas com G418 ou sem G418 por 72h, observamos um aumento de 45x e 13x da expressão do gene, respectivamente, com diferença significativa entre os grupos, reforçando a importância da presença do antibiótico de seleção para manutenção da expressão nessa cepa.

Os resultados indicam que, 72h após a retirada de G418, os parasitos *Laerg6^{high}* e *Liarg6^{high}* continuam superexpressando a enzima. Essa estratégia de confirmação da expressão após a retirada do antibiótico foi realizada porque nos testes de atividade antipromastigota os parasitos são incubados 72h antes do experimento sem G418. Além disso, promastigotas de *Laerg6^{high}* continuam expressando a enzima mesmo quando mantidas 144h sem G418. Esse dado significa que, no momento da análise da viabilidade celular por resazurina (72h após o tratamento), a enzima ainda está superexpressa nos parasitos.

Neste trabalho, os parasitos recombinantes foram selecionados com concentrações graduais de G418 (5, 10, 50 e 100µg/mL) e mantidos sob pressão seletiva na maior concentração (100µg/mL). Dados na literatura mostram que promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas com GFP (*Green Fluorescent Protein*) apresentaram baixos níveis de fluorescência quando cultivadas por 7, 4, 32, 41 e 56 dias sem G418, enquanto que os parasitos selecionados com 1mg/mL de G418 apresentaram elevados níveis de fluorescência proporcionais ao número de parasitos por cultura (Costa *et al.*, 2011).

Por outro lado, há relatos na literatura com *L. major* superexpressando a 24-C-metiltransferase, onde os parasitos foram mantidos com 32, 48 e 480 µg/mL permanentemente até o momento da realização dos experimentos (Jiménez-jiménez *et al.*, 2008). Dessa forma, novos estudos precisam ser realizados para confirmar a necessidade da incubação regular de G418 em culturas de células transfectadas.

A caracterização fenotípica das cepas geradas foi realizada através da avaliação do perfil de crescimento dos parasitos durante oito dias. Não houve quaisquer diferenças significativas entre as cepas, inclusive comparando as cepas selvagens (La-4P, La-WT, Li-4P e Li-WT) com os controles (La + pSP72αNEOα e Li + pSP72αNEOα) e com os parasitos que superexpressam a ERG6 (*Laerg6^{high}* e *Li^{erg6^{high}}*).

Os padrões de crescimento semelhantes entre as cepas se tornam importantes para demonstrar que a superexpressão da enzima e a presença de um DNA exógeno (plasmídeo) não influenciam negativamente o crescimento parasitário. Além disso, a utilização dos parasitos transfectados somente com o vetor de expressão como controles experimentais é importante, uma vez que ao inserir um plasmídeo no parasito devemos demonstrar que as alterações observadas não ocorrem em função do vetor (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, o reposicionamento de fármacos foi responsável por 30% dos novos medicamentos e vacinas aprovadas pelo FDA (Food and Drug Administration) (Jin & Wong, 2014). Atualmente, existem diversos estudos sobre reposicionamento de fármacos aprovados pelo FDA para a leishmaniose cutânea e visceral, como os antifúngicos, anticâncer, antiparasitários, anti-hipertensivos e antidepressivos (Revisado por Andrade-Neto *et al.*, 2018).

A imipramina, um antidepressivo amplamente utilizado na clínica, possui mecanismo de ação no sistema nervoso central, inibindo a serotonina e a recaptação de noradrenalina (Obonaga *et al.*, 2014). A atividade leishmanicida da imipramina foi primeiro demonstrada em promastigotas e amastigotas de *L. major* e *L. donovani*, com redução da carga parasitária em hamsters com LV (Zilberstein *et al.*, 1984). O efeito desse composto na biossíntese de esteróis de *L. amazonensis* foi relatado, assim como um aumento da sua atividade leishmanicida quando combinada ao miconazol, um conhecido inibidor desta via (Andrade-Neto *et al.*, 2016).

Outra característica importante da imipramina é o seu efeito em metiltransferases, já descrita como inibidora da atividade da catecol-O-metiltransferase e da DNA metiltransferase (Fisar *et al.*, 2005; Zimmerman *et al.*, 2012). Dessa forma,

avaliamos a atividade leishmanicida da imipramina em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* que superexpressam a ERG6.

Parasitas que superexpressam o alvo estudado e se tornam resistentes a determinadas substâncias indicam a possibilidade de atuação do fármaco no alvo, comprovando o mecanismo de ação. No entanto, em relação à imipramina, não foram observadas diferenças significativas nos valores de IC₅₀ (Tabela 1 e Tabela 2) entre os parasitos de *L. amazonensis* e *L. infantum* transfectados com a ERG6 (*Laerg6^{high}* e *Lierg6^{high}*) e os grupos controles (La + pSP72αNEOα e Li + pSP72αNEOα). Ou seja, os parasitos recombinantes que superexpressam a ERG6 não se tornaram resistentes a essa substância, indicando que a imipramina provavelmente não apresenta atividade inibitória específica sobre esse grupo de metiltransferases.

Derivados dos isoflavonoides, os pterocarpanos e seus análogos sintéticos são uma fonte importante de produtos antineoplásicos e alguns desses compostos têm sido usados na clínica com atividade contra células cancerígenas e parasitárias (Chen *et al.*, 2009; Wolkenberg *et al.*, 2002).

Em relação às leishmanioses, um derivado dos pterocarpanos se demonstrou eficiente no tratamento da leishmaniose cutânea via oral (da Cunha-Júnior *et al.*, 2011). Esse mesmo composto foi capaz de induzir apoptose em *L. braziliensis* e controlar lesões em hamsters infectados (Costa *et al.*, 2014). Recentemente, análises toxicológicas *in vivo* do pterocarpano da série LQB (LQB118) não demonstraram mudanças nos parâmetros clínicos, bioquímicos e hematológicos do hospedeiro. Histologicamente, não houve alteração nos órgãos, com exceção do fígado que apresentou pontos de necrose com infiltração leucocítica (da Cunha-Júnior *et al.*, 2016). Esses dados mostram que substâncias derivadas dos pterocarpanos se comportam como promissores candidatos a fármacos voltados para o tratamento oral da leishmaniose.

Pterocarpanos quando possuem pelo menos um átomo de nitrogênio em seu núcleo tetracíclico são chamados de azapterocarpanos. A atividade leishmanicida desses compostos foi descrita inicialmente por Buarque *et al.*, 2011 contra amastigotas de *L. amazonensis*. No entanto, não existem relatos na literatura acerca do mecanismo de ação dessas substâncias. Neste trabalho, avaliamos a atividade antipromastigota de uma série de derivados azapterocarpanos da série LQB buscando comprovar o mecanismo de ação dessas substâncias sobre um alvo seletivo nos parasitos de *Leishmania* spp.

Os resultados de atividade antipromastigota dos azapterocarpanos (Tabela 1 e Tabela 2) demonstraram que os parasitos que superexpressam a ERG6 se tornaram

menos sensíveis a alguns compostos quando comparados com os grupos controles. Promastigotas de *Laerg6^{high}* se tornaram menos sensíveis à LQB 333, 336, 339 e 343 em comparação com o grupo controle, com destaque para LQB 333 e LQB 336. Em relação às promastigotas de *L. infantum* superexpressando o alvo estudado (*Lierg6^{high}*), essa cepa teve sua sensibilidade reduzida quando tratada com LQB 339, 341 e 343. Esses dados indicam a possibilidade de atividade inibitória destes derivados contra a ERG6.

Como perspectiva para esse trabalho, os lipídeos serão extraídos e o conteúdo de esteróis avaliado por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (GC/MS). A existência de uma atividade específica dessas substâncias sobre a via de biossíntese dos esteróis será comprovada pelo acúmulo de esteróis intermediários da via com esqueleto colestano em sua estrutura.

Os azasteróis têm sido estudados como os principais inibidores da ERG6 e foi visto que a depleção completa de esteróis com estrutura ergostano leva não somente a uma redução do crescimento parasitário, mas também a perda de viabilidade celular e a efeitos ultraestruturais, como alterações na membrana mitocondrial interna, na matriz mitocondrial e na bolsa flagelar (Magaraci *et al.*, 2003).

Os efeitos antiproliferativos dos azasteróis causados pelo 22,26-azasterol foram relatados sobre promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* quando incubadas com 100 nM da substância estudada, causando lise celular após 72h (promastigotas) e 120h (amastigotas). Além disso, a incubação dos parasitos com esse azasterol levou à depleção completa dos esteróis endógenos dos protozoários (episterol) e a substituição por esteróis de esqueleto colestano em sua estrutura. Quando os parasitos foram incubados com o 22,26-azasterol e cetoconazol, um conhecido inibidor da enzima esterol C14 desmetilase, houve acúmulo de zimosterol, indicando a possível atividade inibitória específica do azasterol sobre a enzima esterol 24-C-metiltransferase (Rodrigues *et al.*, 2002).

No entanto, posteriormente foi relatado que promastigotas de *L. major* superexpressando a ERG6 não se tornaram resistentes ao 22,26-azasterol, sugerindo a existência de um mecanismo de ação adicional dessa classe de inibidores que não seja a atividade específica contra a ERG6 (Jiménez-Jiménez, 2008). Dentro dessa perspectiva, estudos adicionais precisam ser realizados para a compreensão acerca da atividade e seletividade dos azasteróis, reforçando a necessidade da busca por um inibidor seletivo para o alvo estudado.

Azasteróis que possuem nitrogênio em sua estrutura, mas não apresentam uma hidroxila no C-3 de seu núcleo esteroidal são chamados de azasteroides. Alguns derivados desse grupo foram sintetizados e relatados como potenciais inibidores competitivos, não competitivos ou irreversíveis da enzima 5 α -redutase de humanos, como os 6-azasteroides e 11-azasteroides. (Richa *et al.*, 2018; Wilson, 1989; Ibrahim-Ouali & Rocheblave, 2008).

Não há relatos na literatura a respeito da atividade leishmanicida dos azasteroides. No entanto, esses compostos apresentam similaridade estrutural com o núcleo esteroidal do ergosterol. Assim, avaliamos neste trabalho a possível atividade inibitória específica de um conjunto de derivados de azasteroides já sintetizados (Richa *et al.*, 2018) sobre a ERG6.

A atividade leishmanicida antipromastigota e antiamastigota de derivados de azasteroides da série ND foi avaliada sobre cepas transfectadas ou não com o gene da ERG6. As substâncias ND-3 e ND-4 foram as mais potentes contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, porém apresentaram valores muito baixos de citotoxicidade contra macrófagos murinos, e por isso suas atividades antiamastigota, forma encontrada no hospedeiro vertebrado, não foi avaliada.

Os cinco derivados analisados apresentaram atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e *L. infantum*. Tanto as formas promastigotas de *Laerg6^{high}* quanto as amastigotas quando incubadas com ND-1 e ND-2 apresentaram valores de IC₅₀ maiores comparando com os grupos controles. Esses resultados indicam uma possível atividade específica dessas substâncias sobre a enzima alvo deste estudo, e ensaios de análise do perfil de esteróis precisam ser realizados para elucidar essas questões sobre a seletividade dos azasteroides. Quando incubados com os fármacos testados, espera-se que haja um acúmulo de intermediários da via de biossíntese de esteróis com esqueleto colestano em sua estrutura, comprovando o mecanismo de ação destas substâncias sobre a ERG6.

Apesar das formas promastigotas de *Laerg6^{high}* não se tornarem menos sensíveis às substâncias estudadas, houve uma diferença nos valores de IC₅₀ entre a atividade amastigota contra *Laerg6^{high}* e o grupo controle, ou seja, as formas amastigotas que superexpressam a enzima tiveram sua sensibilidade reduzida ao ND-1 e ND-2, sugerindo a existência de diferenças do conteúdo esteroidal e do papel de cada esteroide entre as duas formas evolutivas de *Leishmania* spp.. Esses dados são interessantes visto que as amastigotas são a forma infectante do hospedeiro vertebrado.

Dados na literatura relacionados à análise dos lipídeos envolvidos no processo de transformação de promastigota para amastigota em *L. donovani* mostram que, após a purificação de amastigotas extraídas de macrófagos em uma infecção *in vitro*, houve um aumento de esteróis com esqueleto colestano (colesterol) e diminuição dos níveis de ergosterol durante a transição das formas evolutivas (Messaoud *et al.*, 2017). Assim, é importante investigar a interação parasito-hospedeiro, a fim de elucidar as questões sobre o colesterol da célula hospedeira e o ergosterol dos parasitos, além do papel do colesterol tanto no processo de transformação promastigota-amastigota quanto no metabolismo de esteróis de *Leishmania* spp.

Neste trabalho, foi realizada uma pequena triagem de possíveis candidatos a inibidores da ERG6. Assim, os dados apresentados apontam os azasteroides ND-1 e ND-2 como derivados esteroidais com possível atividade específica sobre uma enzima exclusiva da via de biossíntese de esteróis de *Leishmania* spp., além de estabelecer os azasteroides como um novo grupo de promissores candidatos a fármacos voltados para o tratamento das leishmanioses. Essas observações sugerem a necessidade de ensaios de atividade antiparasitária *in vivo* assim como a investigação do conteúdo de esteróis dos parasitos por GC-MS, visando à confirmação dos azasteroides como potentes agentes antileishmaniais e de seu mecanismo de ação sobre a enzima esterol 24-C-metiltransferase (ERG6).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os azapterocarpanos da série LQB e os azasteroides da série ND mostraram ser possíveis inibidores específicos da enzima ERG6 de *Leishmania* spp. e promissores candidatos a fármacos para o tratamento da leishmaniose. Os parasitos *Lierg6^{high}* e *Laerg6^{high}* se mostraram boas ferramentas para a prospecção de candidatos a fármacos leishmanicidas, bem como para o estudo do mecanismo de ação. Em adição, nossos dados indicam uma diferença entre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em relação à susceptibilidade à inibição da ERG6, sugerindo que os esteróis desempenhem papéis diferentes em cada forma evolutiva do parasito.

Em conjunto, esses achados ajudam a entender um pouco mais a biologia do parasito e a função da ERG6 em diferentes formas evolutivas abrindo, assim, novas oportunidades para a quimioterapia da leishmaniose.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIT-LOUDHIA, K et al. In vitro susceptibility to antimonials and amphotericin B of *Leishmania infantum* strains isolated from dogs in a region lacking drug selection pressure. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 187, p. 386-393, 2012.

AKHOUNDI, M et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1–40, 2016.

ALMEIDA-AMARAL, E et al. Lipídeos. In: *Leishmanioses do continente americano*. Editora Fiocruz, p. 83-98, 2014.

ALTMAN, P. Blood and other body fluids. **Fed Amer Soc**, p. 540, 1961.

ANDERSEN, M; MARKHAM, K. Flavonoids. **Chemistry, Biochemistry and Applications**, 2005.

ANDRADE-NETO, V et al. Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2018.

ANDRADE-NETO, V et al. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania Amazonensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 416–419, 2012.

ASHFORD, R. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1269–1281, 2000.

AZAM, S et al. Structure and dynamics studies of sterol 24-C-methyltransferase with mechanism based inactivators for the disruption of ergosterol biosynthesis. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 7, p. 4279–4293, 2014.

AZOFRA, M et al. Use of intralesional voriconazole for the treatment of cutaneous *scedosporium apiospermum* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. 255-257, 2010.

BANDARA, B et al. An antifungal constituent from the stem bark of *Butea monosperma*. **J Ethnopharmacol**, v. 25, p. 73-75, 1989.

BEACH, D; GOAD, L; HOLZ, G. Effects of antimycotic azoles on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 149–162, 1988.

BERMAN, J D et al. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by *Leishmania-Mexicana Mexicana* Amastigotes in Murine Macrophage Tumor-Cells. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 20, n. 1, p. 85–92, 1986.

BERMAN, J D.; HOLZ, G.; BEACH, D. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 12, n. 1, p. 1–13, 1984.

BLANCO, V et al. Clinical and Epidemiologic Profile of Cutaneous Leishmaniasis in Colombian Children: Considerations for Local Treatment. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, n. 2, p. 359–364, 2013.

BLUM, J et al. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers 2009. **Journal of Travel Medicine**, 2009.

BOER, M et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1471–1477, 2011.

BUARQUE, C et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry Pterocarpanquinones , aza-pterocarpanquinone and derivatives: Synthesis , antineoplastic activity on human malignant cell lines and antileishmanial activity on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6885–6891, 2011.

BURZA, S; CROFT, S; BOELAERT, M. Seminar Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 6736, n. figure 2, p. 1–20, 2018.

CARINI, A; PARANHOS, Ulisses. Identificação das úlceras de Bauru ao Botão do Oriente. **Revista Médica de São Paulo**, n.6, p.111- 116, 1909b.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Parasito-Leishmania-Biologia. Disponível <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>> Acessado em 10 de julho de 2019.

CHANG, T *et al.* Cholesterol sensing, trafficking, and esterification. **Annual Review of Cell and Development Biology**, v. 22, p. 129-157, 2006.

CHEN, Y; HU, L. Design of Anticancer Prodrugs for Reductive Activation. v. 29, n. 1, p. 29–64, 2009.

CINCURÁ, C *et al.* Mucosal leishmaniasis: A retrospective study of 327 cases from an endemic área of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 97(3), p. 761-766, 2017.

CLABORN, D. The Biology and Control of Leishmaniasis Vectors. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, 2010.

COOMBS, G. Lipid biochemistry of trypanosomatids. **Biochemical Protozoology**, p. 312-328, 1991.

COSTA, L et al. Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

- COSTA, S et al. Use of In Vivo and In Vitro Systems to Select *Leishmania amazonensis* Expressing Green Fluorescent Protein. **Korean jJ Parasitol**, v. 49, n. 4, p. 357–364, 2011.
- COURNIA, Z; ULLMANN, G; SMITH, J. Differential effects of cholesterol, ergosterol and lanosterol on a dipalmitoyl phosphatidylcholine membrane: A molecular dynamics simulation study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 7, p. 1786–1801, 2007.
- CUNHA-JUNIOR, E et al. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. April, p. 1555–1559, 2011.
- CUNHA-JÚNIOR, E et al. Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3794–3801, 2016.
- CUNNINGHAM, D. On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi Boil. **Sci Mem Med Offic Army India**, v. 1, p. 21-32, 1885.
- DA MATTA, A. Tableau synoptique de la classification des leishmanioses. **Bulletin de la Société de Pathologie Exotique**, v.9, n.10, p.761-762, 1916.
- DA SILVA, A et al. Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives. **J Braz Chem Soc**, v. 20, n. 1, p. 176–182, 2009.
- DA SILVA, A et al. Synthesis and Preliminary Pharmacological Evaluation of New 1, 4-Naphthoquinones Structurally Related to Lapachol. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2731–2738, 2002.
- DAVID, C; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, v. 22, p. 491–502, 2009.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, p. 305–318, 2004.
- DESJEUX, Philippe et al. Report of the Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis (PKDL) consortium meeting, New Delhi, India, 27 – 29 June 2012. **Parasites and Vectors**, p. 1–21, 2013.
- DNDi. Doenças e projetos – Leishmanioses. Disponível em <<https://www.dndial.org/doencas/leishmanioses/>> Acessado em 10 de julho de 2019.
- DONOVAN, C. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Natural Medical Journal India**, v.7, n.196, p.201-202, 1903.
- FISAR, Z. Interactions between tricyclic antidepressants and phospholipid bilayer membranes. **General physiology and biophysics**, v. 24, p. 161–180, 2005.

- FRAGA, J et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 2, p. 142–150, 2012.
- GALVÃO, E *et al.* Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **Plos One**, 2017.
- GASSER, R et al. Pancreatitis Induced by Pentavalent Antimonial Agents During Treatment of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, p. 83–90, 1994.
- GEORGIADOU, S; MAKARITSIS, K; DALEKOS, G. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **Journal of Translational Internal Medicine**, v. 3, n. 2, 2015.
- GOAD, L; HOLZ, G; BEACH, D. Sterols of *Leishmania* species. Implications for biosynthesis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 10, p. 161–170, 1984.
- GOTO, H; ANGELO, J. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert-reviews**, p. 419–433, 2010.
- GOTO, Y et al. Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. **Vaccine**, v. 25, n. 42, p. 7450–7458, 2007.
- GRIENSVEN, J; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of NA**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.
- GROS, L et al. Evaluation of Azasterols as Anti-Parasitics. **J Med Chem**, p. 6094–6103, 2006.
- GROVE, D. Tapeworms, lice, and prions: a compendium of unpleasant infections. Oxford: **Oxford University Press**. 2014.
- GUAN, H et al. Molecular cloning and functional identification of sterol C24-methyltransferase gene from *Tripterygium wilfordii*. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 5, p. 603–609, 2017.
- HART, D et al. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana mexicana* infected macrophages. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 123–134, 1989.
- HASHIGUCHI, Y et al. Diffuse and disseminated leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Trop Med Health**, v. 2, n. 44, 2016.
- HAUGHAN, P; CHANCE, M; GOAD, L. Synergism *in vitro* of lovastatin and miconazole as anti-leishmanial agents. **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 11, p. 2199–2206, 1992.

- HAUGHAN, P; CHANCET, M; GOAD, L. biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochem J**, v. 38, p. 31–38, 1995.
- IBRAHIM-OUALI, M; ROCHEBLAVE, L. Recent advances in azasteroids chemistry. **Steroids**, v. 73, n. 4, p. 375–407, 2008.
- JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, C et al. Δ^{24} (25)-sterol methenyltransferase: Intracellular localization and azasterol sensitivity in *Leishmania major* promastigotes overexpressing the enzyme. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 160, n. 1, p. 52–59, 2008.
- JIN, G; WONG, S. Toward better drug repositioning: Prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 5, p. 637–644, 2014.
- KAPPE, C; DALLINGER, D. The impact of microwave synthesis on drug discovery. **Nature Reviews**, v. 5, n. January, p. 51–64, 2006.
- KAUFMAN, K; DAWBER, R. Finasteride, a Type 2 5 alfa-reductase inhibitor, in the treatment of men with androgenetic alopecia. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 8, n. 4, p. 403–415, 2000.
- KAYE, P; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- LAINSON, R; SHAW, J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R. **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: **Academic Press**, p. 12-120, 1987.
- LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Seção de Parasitologia, Instituto Evandro Chagas/SVS/MS**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.
- LANIADO-LABORÍN, R; CABRALES-VARGAS, M. Amphotericin B: side effects and toxicity. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 26, n. 4, p. 223–227, 2009.
- LEISHMAN, W. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. **Br Med Journal**, v.1, n. 2213, p. 1252, 1903.
- LIANG, T et al. 4-Azasteroidal5 α -Reductase Inhibitors without Affinity for the Androgen Receptor *. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 734–739, 1984.
- LORENTE, S et al. Novel Azasterols as Potential Agents for Treatment of Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 2937–2950, 2004.
- LUO, M et al. Cloning and expression of two sterol C-24 methyltransferase genes from upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Journal of Genetics and Genomics**, v. 35, n. 6, p. 357–363, 2008.

LYRA, M et al. Pancreatic toxicity as an adverse effect induced by meglumine antimoniate therapy in a clinical trial for cutaneous leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, p.1-6, 2016.

MACHADO, P et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **Plos Negl Trop Dis**, v.4, p. 912, 2010.

MAGARACI, F. et al. Azasterols as Inhibitors of Sterol 24-Methyltransferase in *Leishmania* Species and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 22, p. 4714–4727, 2003.

MEDINA, J et al. Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1253–1265, 2012.

MESSAOUD, B et al. Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of *Leishmania donovani* Complex Promastigotes into Changes in Lipid and Fatty Acid Composition During Intramacrophagic Transformation of *Leishmania donovani* Complex Promasti. **Lipids**, 2017.

MILITAO, C et al. Induction of apoptosis by pterocarpan from *Platymiscium floribundum* in HL-60 human leukemia cells. **Life Sci**, v. 78, p. 2409-2417, 2006.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Nota técnica e relatório de atividades, 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar, 2017.

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

MORIMOTO, M et al. Insect antifeedants, pterocarpan and pterocarpol, in heartwood of *Pterocarpus macrocarpus*. **Biosci Biotech Biochem**, v. 70, p. 1864-1864, 2006.

MYLER, P; FASEL, N: *Leishmania – After the Genome*. **Caister Academic Press**, p.306, 2007.

NEAL, R. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 4983, 1968.

NEELAKANDAN, A. et al. Cloning, functional expression and phylogenetic analysis of plant sterol 24C-methyltransferases involved in sitosterol biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 17–18, p. 1982–1998, 2009.

NELSON, D. Biossíntese de colesterol. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*, p.314-367, 2002.

- NETTO, C et al. Bioorganic & Medicinal Chemistry New pterocarpanquinones : Synthesis , antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- a modulation in human PBMC cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1610–1616, 2010.
- NEUBER, Hubertus. **Journal der deutschen dermatologischen gesellschaft**, v. 2008, n. Band 6, p. 754–765, 2008.
- NEUMANN, A et al. Membrane Sterols Modulate the Binding Mode of Amphotericin B without Affecting Its Affinity for a Lipid Bilayer. **Langmuir**, v. 32, n. 14, p. 3452–3461, 2016.
- NOZAIS, JP. The Origin and Dispersion of Human Parasitic Diseases in the Old World (Africa , Europe and Madagascar). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 13–19, 2003.
- OLIVEIRA, Luiz F et al. Acta Tropica Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- PAGET, E. Twining (1790-1835): **Journal of Medical Biography**, p. 125–131, 2001.
- PANDEY, K et al. Pharmacotherapeutic Options for Visceral Leishmaniasis — Current Scenario. **Clinical Medicine: Pathology**, p. 1–4, 2009.
- PATRA, P et al. Efficacy of oral miltefosine in visceral leish- maniasis in rural West Bengal, India. **Indian J Pharmacol**, v. 44, p. 500–503, 2012.
- PAVLI, A; MALTEZOU, H. International Journal of Infectious Diseases Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1032–1039, 2010.
- PISCOPO, T; AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Post Grad Med Journal**, p. 649–657, 2006.
- POINAR, G. Parasites & Vectors Trypanosomatidae in Dominican amber. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 1–8, 2008.
- POINAR, G; POINAR, R. Research Paper. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 4, n. 4, p. 281–285, 2004.
- PONTE-SUCRE, A et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis : A 21st century challenge. **Neglected Tropical Diseases**, p. 1–24, 2017.
- POURSHAFIE, M et al. Cloning of S-adenosyl-L-methionine:C-24- Δ -sterol-methyltransferase (ERG6) from *Leishmania donovani* and characterization of mRNAs in wild-type and amphotericin B-resistant promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 7, p. 2409–2414, 2004.
- REY, L. Parasitologia. 4ª edição. **Guanabara Koogan**, 2008.

RICHA et al. Characterization and Predictive QSAR Analysis of Azasteroids as Five Alpha Reductase Inhibitors. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 2–22, 2018.

RIJAL, S et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin Infect Dis**, v. 56, p.1530–1538, 2013.

ROBERTS, C et al. Fatty acid and sterol metabolism: Potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 129–142, 2003.

RODRIGUES, J et al. Ultrastructural and Biochemical Alterations Induced by Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46(2), p. 487–499, 2002.

RODRIGUES, J; RODRIGUEZ, C; URBINA, J. Ultrastructural and Biochemical Alterations Induced by Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 487–499, 2002.

ROSS, R. Further notes on leishman's bodies. **Br Med Journal**, v.2, n. 2239, p. 1401, 1903.

SAMPAIO, S et al. The treatment of american mucocutaneous leishmaniasis with amphotericin B. **Arch Dermatol**, v.82, n.4, p.627-635, 1960.

SCORZA, B; CARVALHO, E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **Int J Mol Sci**, v. 18(6), n. 1296, 2017.

SINGH, O et al. Asymptomatic *Leishmania* Infection: A New Challenge for *Leishmania* Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, p. 1424–1429, 2014.

SOUZA, W; RODRIGUES, L. Sterol Biosynthesis pathway as target for anti-trypanosomatid drugs. **Inter Perspect on inf disease**, 2009.

STEVERDING, D. Parasites & Vectors The history of African trypanosomiasis. **Parasites and Vectors**, v. 8, p. 1–8, 2008.

STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, p. 1–10, 2017.

STUART, K et al. Review series Kinetoplastids : related protozoan pathogens , different diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, p. 787–794, 2008.

SUNTER, J; GULL, K , form , function and *Leishmania* pathogenicity : from textbook descriptions to biological understanding. **The Royal Society**, v. 2, 2017.

TEIXEIRA, D et al. The Cell Biology of Leishmania : How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013.

TELFORD, S. The kinetoplastid hemoflagellates of reptiles. **Parasitic Protozoa**, 2^a edição, v. 10, p. 161-223, 1995.

URBINA, J et al. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 125, p. 35–45, 2002.

URBINA, J. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. 1-9, 1997.

VANNIER-SANTOS, M et al. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **J Eukaryot Microbiol**, v. 42, p. 337–346, 1995.

VANNIER-SANTOS, M et al. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania acidocalcisomes*. **Microbiology**, v. 145, n. 11, p. 3213–3220, 1999.

VERMA, N; DEY, C. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani* †. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de leishmaniose. **Brazil Médico**, ano 25, n.41, p.411, 1916.

WILSON, J. Sexual differentiation of the gonads and internal reproductive tracts. **Biol Neonate**, v. 55, p. 322–330, 1989.

WOLKENBERG, S; BOGER, D. Mechanisms of in Situ Activation for DNA-Targeting Antitumor Agents. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 7, 2002.

WRIGHT, J. Protozoa in a case of tropical ulcer (Delhi Sore). **J Med Res**, v. 10, n.3, p.472-482, 1903.

ZILBERSTEIN, D; DWYER, D. Antidepressants cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite *Leishmania*. **Science**, v. 226, n. 4677, p. 977–9, 1984.

ZIMMERMANN, N et al. Antidepressants inhibit DNA methyltransferase 1 through reducing G9a levels. **Biochem J.**, v. 448, n. 1, p. 93–102, 2012.