



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE  
E BIOTECNOLOGIA DA REDE BIONORTE



**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A CROTAMINA DE  
*Crotalus durissus terrificus* E FÁRMACOS CLÁSSICOS NO TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

**JOÃO RAFAEL VALENTIM SILVA**

**Porto Velho, RO  
Março de 2018**

**JOÃO RAFAEL VALENTIM SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A CROTAMINA DE  
*Crotalus durissus terrificus* E FÁRMACOS CLÁSSICOS NO TRATAMENTO DA  
LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Roberto Nicolete

**Porto Velho  
Março de 2018**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

V155a Valentim Silva, João Rafael  
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A  
CROTAMINA DE *Crotalus durissus terrificus* E FÁRMACOS  
CLÁSSICOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
EXPERIMENTAL / João Rafael Valentim Silva. 2017  
106 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Roberto Nicolete  
Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede  
Bionorte) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Crotamina. 3. Fármacos  
Antileishmania. 4. Biotecnologia. 5. Terapia experimental. I.  
Nicolete, Roberto II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**JOÃO RAFAEL VALENTIM SILVA**

**AValiação DOS EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO ENTRE A CROTAMINA DE *Crotalus durissus*  
*terrificus* E FÁRMACOS CLÁSSICOS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
EXPERIMENTAL. Rondônia, 2017.**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Fundação Oswaldo Cruz-RO, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Conservação **ou** Biotecnologia.

Orientador Prof. Dr. Roberto Nicolete

**Banca examinadora**

---

Prof. Dr. Roberto Nicolete

Orientador- Presidente da banca

---

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Examinador 2 – interno

---

Prof. Dr. Rudson de Jesus Holanda

Examinador 3 – interno

---

Prof. Dra. Leidiane Amorin Soares

Examinador 4 – externo

---

Prof. Dra. Viviane Krominski Graça de Souza

Examinador 5 – externo

**Porto Velho, RO**

**MARÇO DE 2018**

## **DEDICATÓRIA**

Esse trabalho é dedicado à muitas pessoas que participaram dessa jornada em vários momentos. Minha maravilhosa mãe Sonia Maria que muito me apoiou e ajudou em muitos sentidos, meu filho Matheus Ferreira que foi privado de muitos momentos ao lado do pai desde o nascimento, minha esposa Cauane Schaostefane que também foi privada de muitas horas de convivência e a muitos diferentes amigos e pessoas que fizeram parte da minha vida durante a condução desse trabalho vivenciando parte dessa luta.

## **AGRADECIMENTOS**

Um Enorme agradecimento ao meu orientador que tanto teve paciência, mas, principalmente, por dar crédito aos meus sonhos, devaneios e ambições. Especial agradecimento aos meus amigos e companheiros de laboratório Neuza Biguinati, Amália Ferreira, Sharon Rose e João Gabriel, que tanto me ajudaram com experimentos, treinamento e contribuíram para o meu desenvolvimento, evolução e solução de inúmeros desafios que se apresentaram no decorrer do desenvolvimento desse trabalho. Grandes pessoas também fazem parte dessa história e merecem lembrança e agradecimento como o meu amigo Aderbal Cavalcante, Alexandre Almeida, Christian Collins por toda a amizade e ajuda técnica em vários momentos. Ao Laboratório de Entomologia da FIOCRUZ-RO aqui representado pelo Professor Jansen Medeiros pelo suporte técnico e generosidade com o seu tempo dedicado. Finalmente, deve ficar registrado o agradecimento ao Laboratório Central do Município de Porto Velho representado aqui pelo servidor Eduardo Henrique Xavier e ao Laboratório Estadual de Patologia Clínica, aqui representado pelo servidor Paulo José Giroldi que deram suporte técnico e científico para o desenvolvimento e realização de boa parte dos experimentos dessa tese.

VALENTIM-SILVA, J.R. **Avaliação dos efeitos da associação entre a crotamina de *Crotalus durissus terrificus* e fármacos clássicos no tratamento da leishmaniose cutânea experimental.** 2018, 97f. Tese (doutorado em Biotecnologia) PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E BIOTECNOLOGIA (PPGBIONORTE.)

## RESUMO

As leishmanioses são um sério problema de saúde pública que afetam áreas de clima temperado e tropical. Atualmente, há 1,3 milhões de casos e aproximadamente 20 mil mortes por ano, parte em razão dos tratamentos que apresentam diversas inadequações, sérios efeitos colaterais e falha terapêutica de até 65% sugerindo urgência na descoberta de terapias alternativas para o combate dessa doença. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia e efeitos toxicológicos da associação entre a Crotamina (CTA) de *Crotalus durissus terrificus* e fármacos clássicos empregados na terapia da leishmaniose. Estudo preliminar realizado identificou a melhor combinação entre a CTA e Glucantime® (GLU) ou Pentamidina (PEN) contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Doravante, as formulações com GLU avaliadas foram denominadas de G1 (GLU 300 µg µg/mL + CTA 100 µg/mL) e G2 (GLU 300 µg µg/mL + CTA 3,125 µg µg/mL) e com PEN denominadas de P1 (PEN 0,05 µg µg/mL + CTA 100 µg µg/mL) e P2 (PEN 0,05 µg µg/mL + CTA 3,125 µg µg/mL). *In vitro*, os tratamentos foram avaliados sobre a inibição do crescimento de promastigotas, amastigotas, produção de Óxido Nítrico, citocinas e citotoxicidade dos tratamentos sobre células de linhagem. Foram analisadas também a afinidade molecular e a caracterização molecular da CTA e GLU ou PEN. *In vivo*, os grupos experimentais foram denominados G5 (GLU 300 mg.kg<sup>-1</sup> + CTA 5 mg.kg<sup>-1</sup>) e G6 (PEN 4 mg.kg<sup>-1</sup> + CTA 5 mg.kg<sup>-1</sup>) e os tratamentos foram realizados por oito dias alternados. Após 48h do fim do tratamento os animais foram mortos e as patas foram retiradas na primeira articulação acima da lesão para pesagem. Em seguida, foi realizada a retirada de sangue, tecido da pata, linfonodo, rins, fígado e baço para posteriores experimentos. O sangue de cada animal foi centrifugado e o soro separado para análise bioquímica e imunológica. As combinações G1, G2, P1 e P2 se mostraram mais eficazes contra promastigotas, ou igualmente eficientes contra amastigotas e menos citotóxicas que os fármacos sozinhos. As formulações G1, G2, P1 e P2 não alteraram as respostas celulares de NO, contudo, G1 e G2 estimularam TNF-α, enquanto P1 e P2 estimularam IL-12. O Docking, a DM e SPR demonstraram afinidade molecular entre CTA ao GLU e à PEN com um perfil concentração dependente. *In vivo*, os tratamentos experimentais (grupos G5 e G6) mostraram-se mais eficazes que as fármacos sozinhos (grupos G3 e G4) na diminuição da carga parasitária da pata e linfonodo, contudo, não houve diminuição do tamanho da lesão. Os animais não perderam massa corporal e, em conjunto com os dados das análises bioquímicas, demonstra baixa toxicidade e adequada tolerabilidade ao tratamento. Os grupos G5 e G6 exibiram prioritariamente um perfil Th1 com forte aumento da produção de IFN-γ, TNF-α e IL-17a enquanto, em contrapartida, inibiram IL-10. A combinação de CTA aumentou a eficácia do tratamento e diminuição da citotoxicidade *in vitro* do GLU e da PEN contra *L. amazonensis*, modulou a resposta imune celular. A de CTA com ambos os fármacos mostrou ser mais eficaz que os fármacos sozinhos na diminuição da carga parasitária sem demonstrar toxicidade sistêmica. Essa abordagem de combinação farmacológica demonstrou ser promissora para o tratamento experimental da leishmaniose cutânea. Como perspectivas futuras, far-se-á necessário explicar os mecanismos envolvidos na inibição do parasito e diminuição da citotoxicidade proporcionada pelos tratamentos experimentais.

**Palavras Chave:** Leishmaniose Cutânea. Crotamina. Fármacos antileishmania. Biotecnologia. Terapia experimental.

VALENTIM-SILVA, J.R. **Evaluation of the effects of the association between *Crotalus crotalus durissus terrificus* and classical drugs in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis.** 2018, 97f. Thesis (doctorate in Biotechnology) POST-GRADUATION PROGRAM IN BIODIVERSITY AND BIOTECHNOLOGY (PPGBIONORTE.)

### ABSTRACT

Leishmaniasis is a serious public health problem affecting areas of temperate and tropical climate. Currently, there are 1.3 million cases and approximately 20 thousand deaths per year, partly due to the treatments that present several inadequacies, serious side effects and therapeutic failure of up to 65% suggesting urgency in the discovery of alternative therapies to combat this disease. The objective of this study was to evaluate the efficacy and toxicological effects of the association between crotalin (CTA) of *Crotalus durissus terrificus* and classical drugs used in the therapy of leishmaniasis. Preliminary study identified the best combination between CTA and Glucantime® (GLU) or Pentamidine (PEN) against the promastigotes of *L. amazonensis*. In the present study, the GLU formulations were characterized as G1 (GLU 300 µg / mL + CTA 100 µg / mL) and G2 (GLU 300 µg / mL + CTA 3.125 µg / mL) and PEN 0.05 µg / mL + CTA 100 µg / mL) and P2 (PEN 0.05 µg / mL + CTA 3.125 µg / mL). In vitro, the treatments were evaluated on inhibition of growth of promastigotes, amastigotes, production of nitric oxide, cytokines and cytotoxicity of treatments on lineage cells. Molecular affinity and molecular characterization of CTA and GLU or PEN were also analyzed. In vivo, the experimental groups were named G5 (GLU 300 mg.kg<sup>-1</sup> + CTA 5 mg.kg<sup>-1</sup>) and G6 (PEN 4 mg.kg<sup>-1</sup> + CTA 5 mg.kg<sup>-1</sup>) and treatments were performed for eight alternate days. After 48h of the end of treatment the animals were killed, and the paws were removed in the first joint above the lesion for weighing. Blood, paw, lymph node, kidneys, liver and spleen were then removed for further experiments. The blood from each animal was centrifuged and the serum separated for biochemical and immunological analysis. Combinations G1, G2, P1 and P2 have been shown to be more effective against promastigotes, or equally efficient against amastigotes and less cytotoxic than drugs alone. Formulations G1, G2, P1 and P2 did not alter the cellular responses of NO, however, G1 and G2 stimulated TNF-α, while P1 and P2 stimulated IL-12. Docking, DM and SPR demonstrated molecular affinity between CTA to GLU and PEN with a concentration-dependent profile. In vivo, experimental treatments (G5 and G6 groups) were shown to be more effective than the drugs alone (G3 and G4 groups) in reducing the parasitic load of the paw and lymph node, however, there was no decrease in lesion size. The animals did not lose body mass and, together with the biochemical analysis data, showed low toxicity and adequate treatment tolerability. Groups G5 and G6 primarily exhibited a Th1 profile with a marked increase in the production of IFN-γ, TNF-α and IL-17α while, on the other hand, they inhibited IL-10. The combination of CTA increased the efficacy of treatment and decreased in vitro cytotoxicity of GLU and PEN against *L. amazonensis*, modulated the cellular immune response. A of CTA with both drugs was shown to be more effective than the drugs alone in reducing the parasite burden without showing systemic toxicity. This pharmacological combination approach has been shown to be promising for the experimental treatment of cutaneous leishmaniasis. As future prospects, it will be necessary to explain the mechanisms involved in inhibiting the parasite and reducing the cytotoxicity provided by the experimental treatments.

**Keywords:** Cutaneous Leishmaniasis. Crotamine. Antileishmania drugs. Biotechnology. Experimental therapy.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Crianças com Leishmaniose Visceral.....	19
<b>Figura 2.</b> Leishmaniose Tegumentar Americana.....	22
<b>Figura 3.</b> Classificação das <i>Leishmania ssp</i> .....	24
<b>Figura 4.</b> Formas amastigotas de <i>Leishmania ssp</i> .....	25
<b>Figura 5.</b> Formas Promastigotas de <i>Leishmania ssp</i> .....	25
<b>Figura 6.</b> Ciclo de vida do parasito do gênero <i>Leishmania</i> .....	27
<b>Figura 7.</b> Fórmula dos Antimoniais Pentavalentes.....	35
<b>Figura 8.</b> Fórmula da Pentamidina.....	38
<b>Figura 9.</b> Estrutura cristalizada da pentamidina ligada ao sítio AATT do DNA.....	39
<b>Figura 10.</b> Estrutura da crotamina de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	44
<b>Figura 10.</b> Mecanismo de penetração celular da Crotamina.....	47
<b>Figura 11.</b> Interação da Crotamina com cromossomos.....	48
<b>Figura 12.</b> Ensaio piloto de inibição de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> para determinação das concentrações de trabalho.....	52/53
<b>Figura 13.</b> Ensaio de inibição de promastigotas e tratamento de macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	63/64
<b>Figura 14.</b> Ensaio de Citotoxicidade.....	65/66
<b>Figura 15.</b> Ensaios de quantificação de IL-12, TNF- $\alpha$ e NO <i>in vitro</i> .....	67/68
<b>Figura 16.</b> Espectro de massa da CTA, GLU, PEN e solução contendo CTA e GLU e CTA e PEN.....	68
<b>Figura 17.</b> Simulação de interação molecular por Docking, Dinâmica molecular e Ressonância Plasmônica de superfície.....	70
<b>Figura 18.</b> Tratamento <i>in vivo</i> da leishmaniose experimental.....	71/72
<b>Figura 19.</b> Resposta imunológica <i>in vivo</i> aos tratamentos.....	73/74
<b>Figura 20.</b> Avaliação toxicológica dos tratamentos.....	73/74

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Descrição das concentrações e combinações entre os fármacos antileishmaniais e a crotamina.....	51/52
<b>Tabela 2.</b> informações foram obtidas no Chemspider e NCBI, conforme Tabela 2.....	59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1. A doença.....	17
2.1.1. Leishmaniose Visceral (LV).....	18
2.1.2. Leishmaniose Pós-kala-zar (PKDL).....	19
2.1.3. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD).....	21
2.1.3. Leishmaniose Cutânea (LC).....	21
2.1.4. O parasito.....	22
2.1.5. Ciclo biológico do parasito.....	26
2.2. A leishmaniose e o sistema imune do hospedeiro.....	27
2.3. Tratamento da leishmaniose.....	32
2.3.1. Antimoniais Pentavalentes.....	34
2.3.1.1. Características químicas.....	35
2.3.1.2. Mecanismos de ação.....	36
<b>2.3.1.1. Protocolos de tratamento com antimoniais pentavalentes para leishmaniose....</b>	<b>36</b>
2.3.1.4. Reações adversas.....	36
2.3.2. Pentamidina.....	38
2.3.2.1. Mecanismos de ação.....	39
2.3.2.2. Protocolo de tratamento.....	40
2.3.2.3. Reações adversas.....	40
2.4 Pesquisa de novos fármacos antiparasitárias.....	41
2.5. Potencial farmacológico de peçonhas de serpentes.....	42
2.5.1. Crotamina (CTA) de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	43
2.5.1.1. Propriedades farmacológicas da CTA de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	44
2.6. JUSTIFICATIVA.....	48
2.7. OBJETIVOS.....	49
2.7.1. Objetivo Geral.....	49
2.7.2. Objetivos Específicos.....	49
3. METODOLOGIA.....	50
3.1. Expeimentos <i>in vitro</i> .....	50
3.1.1. Cepas de <i>Leishmanis amazonensis</i> .....	50
3.1.2. Obtenção da Crotamina de <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	50
3.1.3. Fármacos antileishmania.....	50

3.1.4. Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos.....	51
3.1.5. Ensaio de inibição do crescimento de promastigotas de <i>L. Amazonenses</i> .....	51
3.1.6. Infecção, tratamento de macrófagos peritoneais e inibição de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	53
3.1.7. Determinação do IC50.....	54
3.1.8. Ensaio de citotoxicidade.....	54
3.1.9. Determinação da produção de nitrito.....	55
3.1.10. Determinação da produção de citocinas.....	56
3.2. Ensaio <i>in silico</i> .....	55
3.2.1. Simulação de interação molecular por Bioinformática (Docking e Dinâmica Molecular).....	57
..	
3.2.2. Ensaio de interação molecular por Ressonância Plasmônica de Superfície.....	58
3.2.3. Caracterização molecular por Espectrometria de Massas (EM).....	60
3.3. Experimentos <i>in vivo</i> .....	60
3.3.1. Infecção dos animais.....	60
3.3.2. Protocolo de tratamento dos animais.....	61
3.3.3. Massa dos animais.....	61
3.3.4. Monitoramento do tamanho da lesão da pata dos animais.....	61
3.3.5. Recuperação da amastigotas de tecidos da pata e linfonodo de camundongos infectados.....	61
3.3.6. Quantificação de marcadores bioquímicos.....	62
3.4. Análise estatística.....	62
4. RESULTADOS.....	63
4.1 Ensaio <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> .....	63
4.1.1. A associação do GLU ou PEN com CTA inibe o crescimento das formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	63
4.1.2. As formulações G1 e G2 não apresentaram maior citotoxicidade <i>in vitro</i> do que GLU, porém, P1 e P2 foram menos citotóxicos que PEN.....	64
4.1.3. As formulações G1, G2, P1 e P2 são capazes de modular a produção de IL-12, TNF- $\alpha$ e NO de Macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> .....	67
4.1.4. Caracterização Molecular da CTA, GLU e PEN por Espectrometria de Massa....	68
4.1.5. O Docking, a dinâmica molecular e a Ressonância Plasmônica de Superfície demonstraram que há afinidade molecular dependente de concentração entre a CTA e o Glucantime e a Pentamidina.....	68

4.2 Ensaio <i>in vivo</i> .....	71
4.2.1. As formulações G1, G2, P1 e P2 foram mais eficazes na diminuição da carga parasitária da lesão da pata e do linfonodo do animal.....	69
4.2.2. A associação do CTA com GLU ou com PEN estimulam respostas imunológicas favoráveis ao controle do parasito.....	73
4.2.3. A associação do GLU ou PEN com CTA não aumenta a citotoxicidade <i>in vivo</i>	74
5. Discussão.....	77
6. Conclusões.....	85
7. REFERÊNCIAS.....	86
8. ANEXOS.....	100
<i>Anexo I</i> .....	101

## 1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses formam um complexo de doenças transmitidas por vetores chamados flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* no Velho Mundo e pelo *Flebotomíneo* no Novo Mundo. Até 2004, essa doença afetava 12 milhões de pessoas em 98 países (DESJEUX, 2004; WHO, 2016; AKHOUNDI et al., 2017). Dados de 2010 demonstram que o parasito vem vencendo a batalha uma vez que a Organização Mundial de Saúde estimou 2 milhões de novos casos anuais (500 mil de leishmaniose visceral (LV) e 1,5 milhões de leishmaniose cutânea (LC)) causando aproximadamente 50 mil mortes por ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2016), taxa superada somente pela malária colocando a leishmaniose em nono lugar na análise global de doenças infecciosas demonstrando a importância dessa doença para a saúde pública dos países afetados (WHO, 2016; TORRES-GUERRERO et al., 2017; WHO, 2017).

As Leishmanioses possuem seis formas clínicas definidas pela localização do parasito em tecidos infectados. Dentre as formas de Leishmaniose encontra-se a leishmaniose visceral (LV), pós kala-azar leishmaniose cutânea (PKLC), leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose da mucosa (LM) (AKHOUNDI et al., 2017). Em 2014, mais de 90% dos casos estão distribuídos em três regiões principais e o Brasil possui muitas formas patogênicas da doença (WHO, 2016; AKHOUNDI et al., 2017; WHO, 2017).

As lesões cutâneas e mucocutâneas podem provocar cicatrizes ou deformidades que causam graves efeitos sociais e, a forma visceral, se deixada sem tratamento pode levar à morte. Esses dados se tomados em conjunto levam à Organização Mundial de Saúde classificar esse conjunto de doenças entre as seis mais importantes do planeta dada a sua gravidade e prevalência (WHO, 2016).

O parasito causador da leishmaniose é um protozoário patogênico da família *Trypanosomatidae*, que possui uma forma flagelada, promastigotas, transmissíveis via vetores, e assume uma forma aflagelada, amastigotas, após serem endocitados por diferentes células do sistema imunológico do hospedeiro como fibroblastos, células dendríticas e macrófagos (PETERSEN et al., 2012). Atualmente há descritas 54 espécies de *Leishmania* e dentre essas 21 apresentam patogenicidade ao homem (AKHOUNDI et al., 2017) e devido à complexidade da interação entre o parasito e o hospedeiro, o controle da infecção é principalmente dependente de intervenção quimioterápica (DESJEUX, 2004).

Os antimoniais pentavalentes como Pentostam e Glucantime<sup>®</sup>, têm sido utilizados no tratamento da leishmaniose durante os últimos 70 anos (CROFT; COOMBS, 2003; TIUMAN et al., 2011; PETERSEN et al., 2012), contudo, vem perdendo a eficácia devido ao aumento da

resistência do parasito (PETERSEN et al., 2012). Os antimicrobianos Pentamidina e Anfotericina B (AnB) representam a segunda linha de tratamento. A Pentamidina tem eficácia demonstrada contra a leishmaniose cutânea, no entanto, os seus efeitos colaterais incluem a cardiotoxicidade, insuficiência renal e do desenvolvimento de diabetes em doses elevadas (ASSAN et al., 1995; ANTONIOU; GOUGH, 2005). Anfotericina B representam a segunda linha de tratamento, porém, com inadequações igualmente consideráveis. Contudo, associações e formulações lipídicas com Anfotericina B elevam a sua tolerabilidade tornando doses de até 175 mg.kg<sup>-1</sup> toleráveis embora o seu elevado custo limite a sua utilização em países em desenvolvimento (CROFT; COOMBS, 2003). No entanto, a AnB lipossomal é o tratamento de escolha nos EUA e na Europa mostrando eficácia contra a leishmaniose e efeitos colaterais menores (CHAPPUIS et al., 2007).

Portanto, tomadas em conjunto, as inadequações desses tratamentos implicam no desenvolvimento urgente de alternativas terapêuticas para curar a leishmaniose, as quais apresentem menos efeitos colaterais, fato que reveste de importância a presente investigação.

A despeito disso, diferentes estratégias têm sido empregadas e desenvolvidas, dentre elas, a combinação de moléculas a tratamentos clássicos como, por exemplo, a associação de Anfotericina B com a alicina (CORRAL et al., 2014), ou utilizando-se sistemas de liberação controlada de fármacos, mostra-se uma tendência. Com isso, a Crotamina (CTA) de *Crotalus durissus terrificus*, um nanopeptídeo com propriedade de penetração celular, potencial para o carregamento de fármacos, que apresenta ação microbicida e com interação com o DNA humano chama atenção pelas suas propriedades farmacológicas (CHEN et al., 2012). Essa molécula não é tóxica para células tronco de mamíferos tanto *in vitro* (KERKIS et al., 2006; NASCIMENTO et al., 2007) ou *in vivo* (LOWE, 2015; MAHNKE, 2014) e, curiosamente, registrou uma ação tóxica seletiva para células tumorais de melanoma de ratos (MARTINS, 2015). Estudos sugerem que essa molécula pode possuir propriedades carreadoras de fármacos para o interior da célula, inclusive até o DNA humano (CHEN et al., 2014). O parasito intracelular deve ser contido, enquanto a resposta imunitária patológica tem de ser controlada (LAKHAL-NAOUAR et al., 2015).

O sistema imunológico do hospedeiro tem um importante papel no controle do parasito envolvendo diferentes mecanismos possuindo papel essencial na patogênese e no controle da infecção. A imunidade protetora contra agentes patológicos como *L. amazonensis* é mediada por uma resposta do tipo T<sub>H1</sub>, enquanto, uma resposta do tipo T<sub>H2</sub> está relacionada com a progressão da doença. Quando IL-12, IFN- $\gamma$  e NO são produzidas caracteriza-se uma resposta celular protetora (MAHNKE et al., 2014; LOWE, 2015; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016).

Células dendríticas e macrófagos da pele estão diretamente implicados no controle da infecção (HEZARJARIBI et al., 2014; MARTINS et al., 2015) e produção de citocinas do perfil de resposta  $T_{H1}$ . Em contraste, o aumento das citocinas TGF- $\beta$ , IL-10 e IL-13 induzem um perfil de resposta do tipo  $T_{H2}$ . A produção da TGF-  $\beta$ , IL-10 e IL-13 estão relacionadas com a promoção da leishmaniose (BARBOSA et al., 2008; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016).

Portanto, o objetivo do presente estudo é avaliar a eficácia da associação farmacológica entre a CTA de *C. d. terrificus* e os fármacos Glucantime® e Pentamidina na terapia experimental da leishmaniose cutânea.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A doença

As leishmanioses são infecções parasitárias que ocorrem em inúmeras espécies animais, incluindo o homem, sendo causadas por várias espécies do gênero *Leishmania*. Constituem zoonoses de animais silvestres, e mais raramente, domésticos, afetando o homem de forma acidental (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A doença pode apresentar um espectro de manifestações clínicas com comprometimento cutâneo e mucocutâneo, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasito com seu hospedeiro (CARVALHO-GONTIJO et al., 2015b).

A forma visceral é considerada a mais grave podendo levar a óbito até 90% das pessoas acometidas pela doença sem tratamento. A forma cutânea apresenta lesões clássicas que correspondem à ulceração de bordas elevadas, endurecidas e de fundo com tecido de granulação, que pode evoluir para a forma mucosa por disseminação hematogênica ou linfática do parasito (AKHOUNDI et al., 2017).

As espécies de *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, e à família Trypanosomatidae. Apresentam ciclo biológico heteroxênico, envolvendo uma grande variedade de mamíferos silvestres, reservatórios do parasito, transmitida por diferentes insetos vetores da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* – no Velho Mundo (WHO, 2016; AKHOUNDI et al., 2017; WHO, 2017).

Nos hospedeiros mamíferos, o parasito é obrigatoriamente intracelular, com forma amastigota no interior das células do sistema mononuclear fagocitário. No trato alimentar dos flebotomíneos, as formas amastigotas se transformam em promastigotas, formas flageladas e móveis (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

Nas Américas, as áreas endêmicas de leishmanioses se estendem do México para a Argentina. Aproximadamente 67.000 casos clínicos são relatados a cada ano e 40.840.000 pessoas estão em risco de desenvolver a doença em mais de 21 países, com estimativas de 187.200 a 307.800 casos de LC e 4.500 a 6.800 casos de LV. Enquanto isso, em 2014, mais de 90% de novos casos reportados a WHO ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sul do Sudão e Bangladesh, e, aproximadamente 70% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Sudão, Etiópia, Nicarágua e Peru (WHO, 2016; AKHOUNDI et al., 2017; W, 2017). Contudo, há relatos de casos no sul dos Estados Unidos e províncias da Argentina (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Em um estudo com 25 países a incidência de leishmaniose, 13 apresentaram alta prevalência da forma visceral (Bangladesh, China, Etiópia, Geórgia, Índia, Kenia, Nepal, Paraguai, Somália, South Sudão, Spain, Sudão e Uganda), 11 possuem uma alta prevalência da forma cutânea CL (Afeganistão, Algeria, Colombia, Irã, Marrocos, Paquistão, Peru, Arabia Saudita, Siria, República Árabe, Tunísia, e Turquia) e 1 (Brasil) tem uma alta incidência de ambas as formas clínicas da doença (WHO, 2016; TORRES-GUERRERO et al., 2017; WHO, 2017).

Em razão da sua prevalência, gravidade e da potencial letalidade da forma visceral da doença, a World Health Organization, enquadra essa doença como uma das seis doenças infecto-parasitárias endêmicas de maior relevância, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (WHO, 2016; WHO, 2017). Atualmente, a LV causa mais de 50.000 mortes por ano, sendo superada apenas por Malária entre as doenças parasitárias, colocando a leishmaniose em nono lugar em uma análise global de doenças infecciosas. No Brasil e em outros países das Américas, as leishmanioses constituem importante problema de saúde pública devido a sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e baixa efetividade das medidas de controle (WHO, 2016; AKHOUNDI et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A epidemiologia das leishmanias é dinâmica e as circunstâncias da transmissão estão mudando continuamente em relação ao meio ambiente, demografia, comportamento humano, status socioeconômico e outros fatores como o perfil imunogênico das populações afetadas (WHO, 2016).

No velho mundo as principais espécies causadoras de leishmaniose são *L. aethiopica*, *donovani*, *infantum*, *major* e *tropica*. A leishmaniose recidivante, também conhecida como leishmaniose lupóide ou tuberculoide é produzida por *L. tropica*. Leishmaniose cutânea difusa é causada por *L. arthiopica*. Lesões bucais ou na laringe podem ser causadas por *L. infantum*, *L. major* e *L. tropica*. No novo mundo a doença é causada por múltiplas espécies de ambos os subgêneros. As do subgênero *L. (leishmania)* causadoras da leishmaniose no novo mundo são a *L. amazonensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis* e do subgênero *L. (vianna)* são *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana* e, em menor incidência, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni* e *L. lindebergi* (AKHOUNDI et al., 2017).

### **2.1.1 Leishmaniose Visceral (LV)**

A LV afeta mais de doze milhões de pessoas e mais 350 milhões estão em risco de serem afetadas em mais de 98 países prioritariamente pobres. Estima-se que há entre 200 a 400 mil novos casos de LV a cada ano em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão (WHO, 2015). A

Índia é a campeã de novos casos seguida pelo Leste da África. É uma doença endêmica na Eritreia, Kenia, Somália, Sudão, Sul do Sudão e Uganda e, a principal espécie envolvida nessas áreas é a *L. donovani*, seguida por *L. infantum* e *L. chagasi* respectivamente (DESJEUX, 2004; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010; W, 2017).

A forma visceral, como o seu nome sugere, acomete as vísceras, principalmente órgãos com alta concentração de leucócitos com destaque para medula óssea, fígado, baço e linfonodos levando frequentemente à anomalias no tamanho desses órgãos conhecidas como hepatomegalia (fígado), esplenomegalia (baço) e adenomegalia (linfonodos). Embora o período de incubação possa chegar a dois anos, dependendo da imunidade a infecção pode passar assintomática por toda a vida (BEN SALAH et al., 2013; BHATTACHARYA et al., 2015).

A LV é a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias do planeta atrás somente da malária. Estima-se que 60 mil pessoas morrem todos os anos em decorrência dessa doença e a co-infecção HIV/LV é uma preocupação emergente das mais importantes colocando a leishmaniose em nono lugar na análise global de doenças infecciosas demonstrando a importância dessa doença para a saúde pública dos países afetados (BEN SALAH et al., 2013; PAGLIANO et al., 2016; WHO, 2016).

**Figura 1: Crianças com Leishmaniose Visceral.**



Em destaque a dilatação do abdômen em razão da infecção e o desenvolvimento da Leishmaniose visceral.

Fonte: <http://leishmaniose.weebly.com/uploads/8/3/8/6/838638/7891315.jpg> e de <http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v81n3/a08f5.jpg>

### 2.1.2 – Leishmaniose pós-kala-zar (PKDL)

Após o tratamento, uma forma secundária da doença aparece no hospedeiro mesmo depois da pessoa ser considerada clinicamente curada, sendo chamada de leishmaniose dérmica

pós-kala-zar. Essa forma se manifesta inicialmente com úlceras na pele e rosto que podem crescer e se espelharem eventualmente desfigurando e edemaciando outras estruturas, assemelhando-se à lepra, podendo ainda causar cegueira se atingir os olhos. Vale ressaltar que essa doença não é a leishmaniose cutânea, mas, no entanto, é causada pelo parasito causador dessa forma de leishmaniose (AKHOUNDI et al., 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A apresentação clínica de VL e PKDL difere substancialmente. Na VL, os pacientes sofrem de febre prolongada, hepatoesplenomegalia, perda de peso e anemia, enquanto as manifestações de PKDL são limitadas a lesões maculares, papulares ou nodulares na pele (GANGULY et al., 2010a). A PKDL é confinada a duas zonas geograficamente distintas, nomeadamente o sul da Ásia (Índia, Nepal e Bangladesh) e a África Oriental, principalmente o Sudão (MOLINA et al., 2017). Na variante sul asiática, as lesões polimórficas (coexistência de maculas / manchas junto com papulonodules) são prevalentes, enquanto a variante sudanesa possui lesões papulares ou nodulares. Embora a mortalidade por PKDL seja baixa, é uma doença estigmatizante que traz uma carga socioeconômica significativa, ampliada ainda mais por uma relutância em obter tratamento ou devido a falha em cumprir o esquema terapêutico. As lesões, especialmente os papulonodules, são ricas em parasitas, levando a especulação de que a PKDL desempenha um papel fundamental na transmissão interdepidêmica da VL.

Compreender os aspectos clínico-epidemiológicos da PKDL ajudaria a definir estratégias para o controle de VL, fornecendo informações adicionais sobre a dinâmica de transmissão de *L. donovani*. A maioria dos estudos epidemiológicos com PKDL não apresentaram viés de gênero, uma notável exceção de estudos de nosso grupo onde uma predominância masculina foi relatada (GANGULY et al., 2010b; DAS et al., 2012). A distribuição por idade da PKDL no Sul da Ásia e no Sudão também difere, como no primeiro, os jovens adultos são mais afetados, enquanto que no último, as crianças são mais afetadas (MOLINA et al., 2017). Um período de atraso de 2 a 10 anos existe entre a cura da VL e o início da PKDL, sugerindo que a PKDL se reflete na epidemia de VL e pode persistir bem após a epidemia. Isto é apoiado por um estudo epidemiológico no Bangladesh, onde se observou que a incidência de PKDL mostrou um aumento acentuado de 1 caso por 10 000 em 2002-2004 para 21 casos por 10 000 em 2007 (RAHMAN et al., 2010).

As informações sobre a etiopatogenia da PKDL é limitada e, portanto, nenhum consenso surgiu para explicar quais fatores modificam o comportamento do parasita de *L. donovani* normalmente viscerotrópico para se tornar dermatotrópico e se manifestar como PKDL limitando maiores discussões sobre essa forma da doença. Nas seções a seguir, revisamos os principais mecanismos sugeridos para participar do desenvolvimento da PKDL (MUKHOPADHYAY et al., 2014; AKHOUNDI et al., 2017; MOLINA et al., 2017).

### 2.1.3 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

Clinicamente, caracteriza-se por evolução lenta, progressiva e crônica, com resposta terapêutica inicial satisfatória, recidivas frequentes e sendo refratária à diferentes esquemas terapêuticos. Os pacientes apresentam polimorfismo lesional característico associado à lesões pápulo-nodulares, tuberosas, tumorais, vegetantes, verrugosas e com formação de placas. Os pacientes apresentam um perfil do tipo T<sub>H</sub>2 de resposta imune à infecção e menor ação de macrófagos (MØ) conseqüentemente, fato que pode estar associado ao desenvolvimento e exacerbação da doença. Embora todos os sintomas clínicos em conjunto indiquem a doença, é recomendável um diagnóstico laboratorial definitivo para a introdução da terapia adequada (NOVAIS et al., 2013)

Exames de microscopia em tecidos retirados de lesões de leishmaniose mucocutânea demonstram que, no novo mundo, a principal espécie causadora dessa doença é a *Leishmania mexicana amazonensis*, enquanto, no velho mundo, *Leishmania aethiopica*, apresentando características distintas entre si (ZANLER et al., 2015). A cepa que causa essa doença no velho mundo apresenta visivelmente macrófagos contendo amastigotas na derme com grandes vacúolos parasitóforos que são características de pacientes recentemente infectados e com uma resposta imune aguda precoce ou anérgica. Com isso, uma mistura de infiltrado inflamatório, sem macrófagos necróticos ligados a poucos linfócitos plasmáticos (ZANLER et al., 2015).

### 2.1.2. Leishmaniose Cutânea (LC)

A leishmaniose cutânea pode ser classificada de quatro maneiras:

- Localizada: que pode ocorrer como lesão única ou múltipla na região da picadura do vetor e lesões múltiplas localizadas próximas da picada. Geralmente essa lesão é ulcerosa e apresenta tendência à cura espontânea, boa resposta ao tratamento podendo ser acompanhada de linfadenopatia regional, linfagite ascendente e inclusive ulceração de alguns nódulos.
- (II) Forma cutânea disseminada: que ocorre por disseminação hematogênica ou linfática do parasito. Apresenta lesões cutâneas numerosas e distantes do local da picada do vetor e em geral são pequenas, ulceradas e também apresentam boa resposta ao tratamento.
- (III) Forma recidiva cútis: que apresenta cicatrização espontânea ou medicamentosa do centro da lesão com manutenção da atividade parasitária nas bordas.

- (IV) Forma cutânea difusa: é rara e a mais grave das leishmanioses cutâneas e costuma ocorrer em pessoas imunodeprimidas. Inicia com lesão única não responsiva ao tratamento evoluindo lentamente com a formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não-ulceradas, infiltradas, coloração eritrematoviolácea, com fundo constituído por granulações vermelhas e quase sempre recoberta por secreção serosa ou seropurulenta. Mesmo com todas as características clínicas presentes exames laboratoriais são indicados para a identificação da presença de parasitos a fim de excluir outras doenças com características clínicas semelhantes como a sarcoidose, esporotricose ou lúpus vulgar (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Em complementação à demonstração do agente biológico pode ser obtida por diferentes métodos como cultura, inoculação em *hamster*, exame histopatológico ou até por PCR. Em infecções por *L. amazonensis*, os parasitos são facilmente encontrados por acumularem em grande número de macrófagos, frequentemente encontrados nos vacúolos. Em tecidos as amastigotas de *Leishmania* são evidenciadas por coloração de Hematoxilina e Eosina (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

**Figura 2: Leishmaniose tegumentar americana.**



A e C forma difusa da Leishmaniose, B e D forma localizada da Leishmaniose e E forma mucocutânea da Leishmaniose. Fonte: <http://leishmaniose.weebly.com/uploads/8/3/8/6/838638/7891315.jpg> e de <http://www.scielo.br/img/revistas/abd/v81n3/a08f5.jpg>

### 2.1.3. O parasito

Há mais de 20 espécies de *Leishmania*. Elas apresentam grande semelhança morfológica, fato que dificulta a sua classificação. Inicialmente, a classificação seguia o aspecto clínico da doença, embora dados epidemiológicos sugerissem que esse gênero seria composto por populações de parasitos extremamente heterogêneos. Baseado em critérios extrínsecos como comportamento do parasito em cultura e *in vivo* reuniram-se três complexos chamados

doravante de *L. brasiliensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*. Após o aspecto clínico e o comportamento em cultura, a classificação aceita atualmente é baseada em aspectos clínicos e epidemiológicos suportados por dados biológicos, bioquímicos e moleculares (WHO, 2015, 2016; WHO, 2017).

Lainson e Shaw (1987) demonstraram as diferenças morfológicas entre as diferentes espécies do parasito por meio de técnica de impressão, fixação, coloração e microfotografia. Posteriormente, pesquisadores empregaram métodos bioquímicos para caracterização do parasito como por anticorpos monoclonais e análise de antígenos de diferenciação em promastigotas ou seus fatores de excreção (GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1996).

As *Leishmanias ssp.* que afetam o homem são classificadas em dois complexos fenotípicos agrupados em dois subgêneros, englobando várias espécies cada um deles e, embora a essa classificação tenha mais de 20 anos ainda é aceita. O complexo Viannia que inclui o complexo *L. brasiliensis*, *L. guyanensis*, *L. lainsoni*, *L. naifi* e o *Leishmania* que inclui *L. mexicana*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. enrietti* e *L. hertigi* (AKHOUNDI et al., 2017).

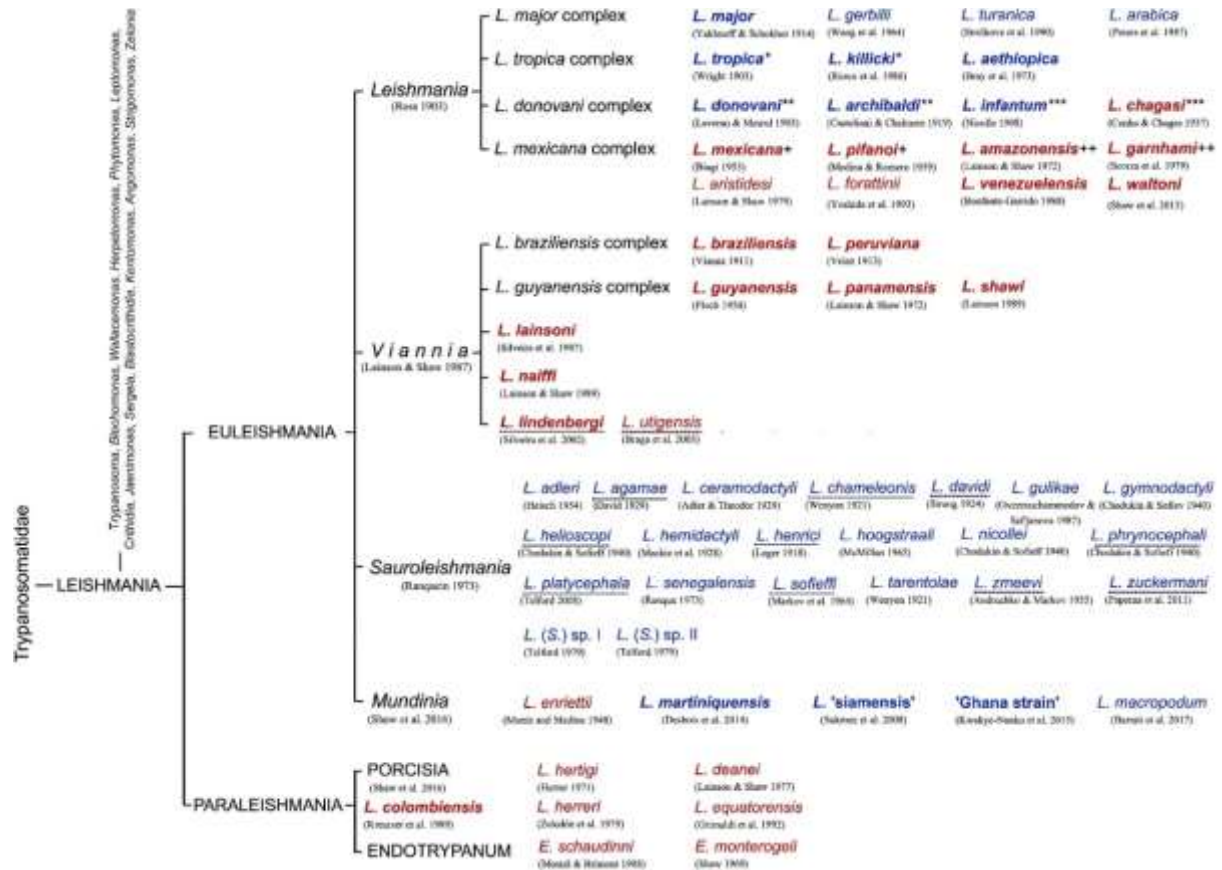
Grimaldi e McMahon-Pratt (1996) mais recentemente corroborado por Kevric; Cappel; Keeling (2015) afirmam que no novo mundo são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* que infectam o homem pertencentes a ambos os subgêneros, são elas:

- *Leishmania braziliensis* (I), causa lesões cutâneas e mucosas, possui ampla distribuição geográfica da América Central ao Norte da Argentina;
- *Leishmania guyanensis* (II), que causa predominantemente lesões cutâneas e ocorre na América do Sul, restrita, no entanto, à Bacia Amazônica;
- *Leishmania panamensis* (III), espécie causadora, predominantemente, de lesões cutâneas, e ocorre na América Central e na Costa Pacífica da América do Sul;
- *Leishmania lainsoni* (IV) causa lesões cutâneas e ocorre no norte do Estado do Pará, na Região Amazônica do Brasil;
- *Leishmania mexicana* (V), que causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre no México e América Central;
- *Leishmania amazonensis* (VI), que causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre desde a América Central até o Norte, Nordeste e Sudeste da América do Sul;
- *Leishmania venezuelensis* (VII), que causa lesões cutâneas e ocorre na Venezuela;

- *Leishmania chagasi* (VIII), que causa a forma visceral com febre, anemia, hepato e esplenomegalia, emagrecimento e ocorre do México ao Norte da Argentina, com predomínio no nordeste brasileiro.

A figura 3 mostra de maneira esquemática a classificação das *Leishmania ssp.*

Figura 3: Classificação das *Leishmania ssp.*



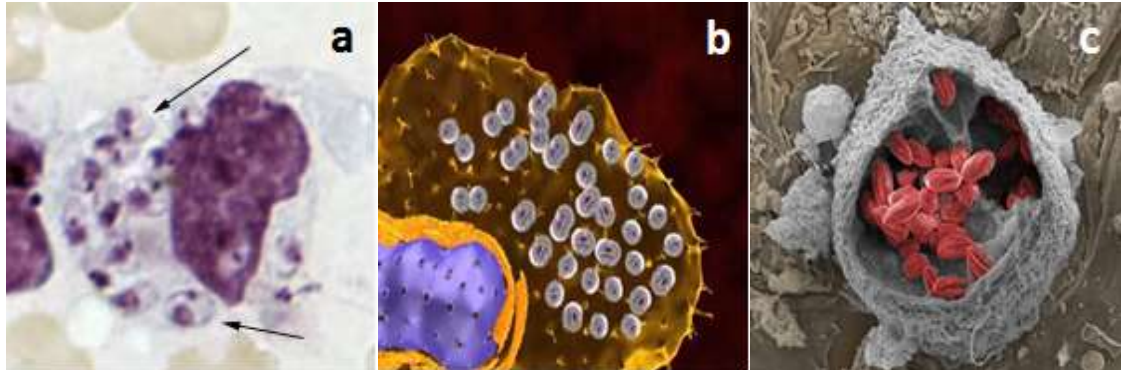
\*, +: Sinônimo; diferentes números de asteriscos (\*) e de sinais de mais (+) significa que o nome da espécie é o sinônimo das espécies originais sublinhadas: nenhuma classificação final. *L. siamensis* e *L. martiniquensis* também foram encontrados no Novo Mundo. Os nomes das *Leishmania ssp.* entre aspas são nomes não oficiais sem descrições formais. As espécies patogênicas humanas estão escritas em negrito. As espécies do velho e novo mundo estão destacadas em azul e vermelho, respectivamente. Figura adaptada de (AKHOUNDI et al., 2017). Baixado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299716300450?via%3Dihub> e, 28/01/2018.

Morfologicamente o parasito pode apresentar três formas distintas a amastigota, promastigotas e paramastigota. A forma amastigota é obrigatoriamente intracelular, habitando o interior das células do sistema fagocítico mononuclear de hospedeiros mamíferos. Possui forma arredondada ou ovalada, com cinetoplasto apresentando vacúolos e é aflagelada. O seu corpo celular é pequeno com aproximadamente entre 1,5 e 3µm x 3 a 6,5 µm (Figura 4). Essa forma apresenta, na sua região anterior, uma invaginação que forma uma bolsa flagelar que fica



o pequeno flagelo internalizado no corpo da amastigota (REIS; ALBUQUERQUE; SOARES, 2014).

**Figura 4: Formas amastigotas de *Leishmania* ssp.**



“a” imagem de microscopia de campo claro demonstrando a presença de amastigotas dentro de vacúolos de uma célula do sistema imunitário do hospedeiro, “b” imagem de microscópio de fluorescência demonstrando a presença de amastigotas dentro de uma célula fagocítica do sistema imunitário do hospedeiro e “c” imagem de microscópio eletrônico de transmissão demonstrando a presença de amastigotas. Fonte: Adaptado de JU et al, 2004 e HAGE, 2013.

A forma promastigota é alongada, apresentam flagelo livre, é móvel com núcleo localizado na região central da célula, o cinetoplasto entre a região anterior e o núcleo apresentando granulações e pequenos vacúolos. Habita o trato digestório dos hospedeiros invertebrados, mede entre 10 e 40 $\mu$ m x 1,5 a 3 $\mu$ m de diâmetro (Figura 5) dependendo da espécie (MICHALICK e RIBEIRO, 2014; MARZOCHI, 1992).

**Figura 5: formas promastigotas do parasito do gênero *Leishmania*.**



“a” imagens de microscopia de campo claro de formas promastigotas do parasito causador da leishmaniose, “b” imagens de microscopia de fluorescência de amastigotas do parasito causador da leishmaniose, “c” imagem de microscopia eletrônica de varredura do parasito causador da leishmaniose, “d” imagens de microscopia eletrônica de transmissão de um corte do parasito causador da leishmaniose, “e” desenho esquemático da morfologia interna da forma promastigotas do parasito causador da leishmaniose, “f” imagem de microscopia confocal de um macrófago fagocitando formas promastigotas do parasito causador da leishmaniose. Adaptado de JU et al, 2004 e HAGE, 2013.

As formas paramastigotas apresentam forma ovaladas ou arredondadas semelhantemente às amastigotas, com cinetoplasto margeando o núcleo ou posterior a este, pequeno flagelo livre e são encontradas aderidas ao trato digestório do vetor.

#### **2.1.4. Ciclo biológico do parasito**

O ciclo de transmissão da Leishmaniose Tegumentar Americana varia de acordo com a região geográfica, espécie do parasito, vetores, os reservatórios e o hospedeiro. No caso dos invertebrados e vetores são insetos denominados flebotomíneos da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phebotominae, gênero *Lutzomya*, conhecidos popularmente, dependendo também da região geográfica, como mosquito palha, tutuquira, birigui, entre outros (BRASIL, 2007).

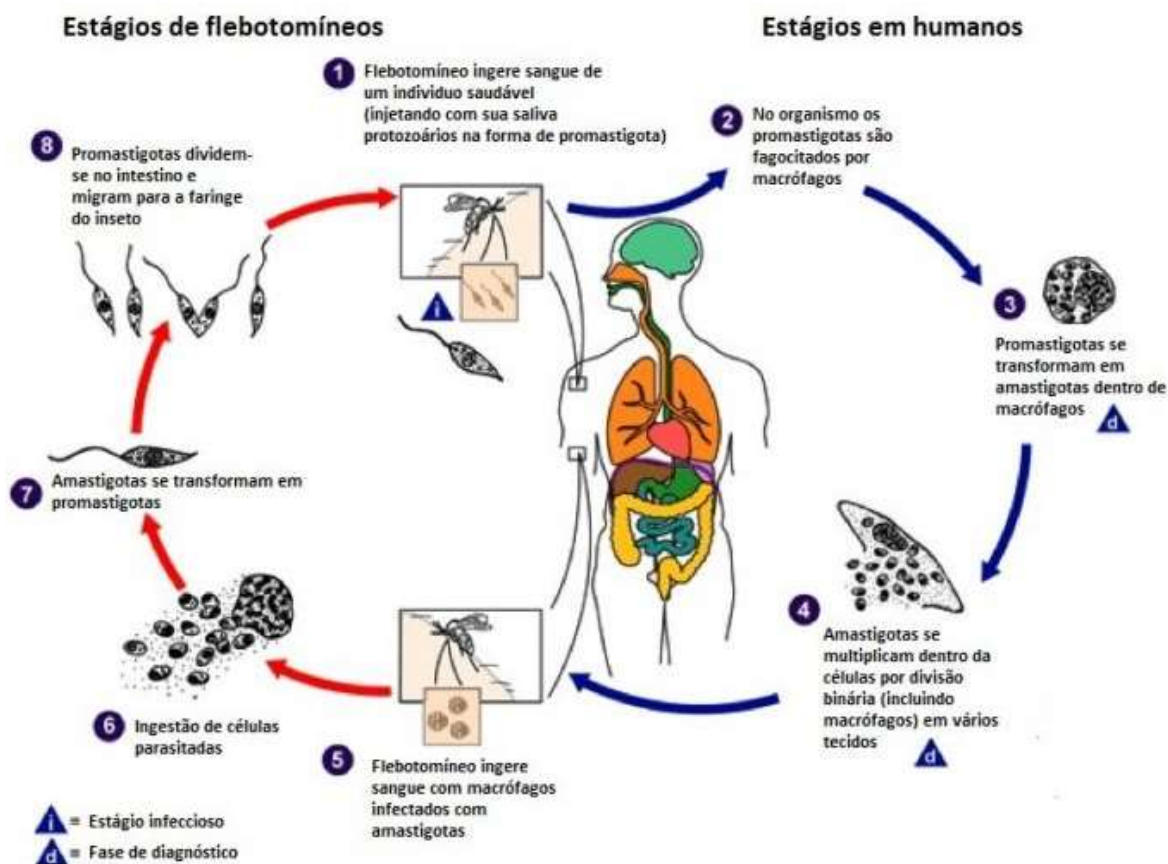
O ciclo do parasito causador da leishmaniose inicia com a fêmea do flebotomíneo, quando realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro mamífero infectado, acaba ingerindo formas amastigotas do parasito livres na circulação ou no interior de macrófagos. Estes mosquitos possuem um aparelho bucal curto e rígido adaptado para penetrar em tecidos e vasos sanguíneos que facilita a obtenção de sangue, linfa e restos celulares durante a alimentação. Se o sangue ingerido durante esse processo possuir parasitos, ele vai para o intestino médio do inseto e as amastigotas transformam-se em promastigotas procíclicas, após cinco dias transformam-se em promastigotas metacíclicas voltando a ser infectiva aos hospedeiros mamíferos. Essa última forma apresenta um corpo mais delgado, com diâmetro reduzido e flagelo com aproximadamente duas vezes o comprimento do seu corpo o que garante grande mobilidade (BATES, 2006).

As promastigotas metacíclicas migram para a probóscide do vetor e durante o hematofagismo são inoculadas no hospedeiro vertebrado (BATES, 1994 e 2007). A presença de moléculas como a lipopolissacaridase e a proteína Gp63 fazem com que estas formas resistem à ação lítica do complemento permitindo rápida fagocitose por células do sistema imune como neutrófilos, células dendríticas e, principalmente, macrófagos que foram atraídos até o local da inoculação iniciando uma reação inflamatória à infecção como afirmou Gueirard et al. (2008).

Após o processo de internalização e formação do vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas deste parasito diferenciam-se em formas amastigotas, aptas a se multiplicarem. Essas formas multiplicam-se em divisão binária até a ruptura da célula liberando na circulação as amastigotas que poderão infectar novas células vizinhas e novos vetores que venham a realizar o repasto neste hospedeiro infectado, podendo inclusive infectar animais domésticos

que funcionarão como reservatórios da doença (SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A figura 6 ilustra o ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*.

Figura 6: Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania*.



Fonte: <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>.

## 2.2 A Leishmaniose e o sistema imune do hospedeiro

Há mais de 20 anos os imunologistas descobriram que a resistência ou a susceptibilidade para a infecção pelo protozoário causador da leishmaniose, *Leishmania major*, foi associado com o desenvolvimento de células T-helper 1 (Th<sub>1</sub>) e T-helper 2 (Th<sub>2</sub>) respectivamente iniciando investigações para entender melhor a relação entre o sistema imunológico do hospedeiro e o parasito. Com isso, infecções experimentais vem sendo utilizadas para avaliar o papel de fatores chave como a Interleucina-12 (IL-12) e interleucina-4 (IL-4) no amadurecimento das células Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>. Esse modelo de infecção é um dos modelos preferidos para o estudo da diferenciação de células T e para entender melhor como as *Leishmania ssp.* interagem com o sistema biológico dos hospedeiros (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Os mecanismos de resposta imune nas leishmanioses envolvem componentes da imunidade inata e adaptativa, bem como a ativação da resposta imunológica humoral e celular do hospedeiro. As células inflamatórias e mediadores solúveis possuem uma atividade antimicrobiana potente, que juntas, representam uma fase efetiva para a resistência da imunidade inata, contudo, cada infecção apresenta as suas particularidades uma vez que cada parasito possui um perfil, cada hospedeiro apresenta uma reação e, a relação entre esses dois elementos produz respostas particulares (LAKHAL-NAOUAR et al., 2015).

A espécie do parasito e o sistema imune do hospedeiro determinam o tipo de resposta, o aparecimento e evolução da infecção. Após a infecção por *Leishmania spp.* pode ocorrer uma resposta inata complexa incluindo ativação de células como os neutrófilos, monócitos, macrófagos (M0), células dendríticas (DCs), "Natural Killer" (NK) e a ativação de receptores "toll like". Na fisiopatogenia das leishmanioses, os macrófagos, além de serem as células hospedeiras e apresentadoras de antígenos, possuem um importante papel efetor para a destruição do parasito. A participação dos linfócitos T CD4 é determinante para a evolução da infecção para cura ou exacerbação da patogenicidade do parasito (SACRAMENTO et al., 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Na relação entre o parasito e o hospedeiro, observa-se duas subpopulações de células na resposta adaptativa: Linfócitos T "helper" 1 (Th1) e linfócitos T "helper" 2 (Th2). As células Th1 produzem IFN- $\gamma$ , e são associadas à proteção contra os patógenos intracelulares, como as por *Leishmania spp.*, logo, quanto mais intensa a resposta de tipo 1, maior a eficiência na eliminação do parasito. Enquanto, as Th2 produzem interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 e estão envolvidas nos processos alérgicos e na proteção contra agentes extracelulares. No caso das infecções por micro-organismos intracelulares, a ativação das células Th2 leva ao agravamento da doença (CASTELLANO et al., 2009; HEZARJARIBI et al., 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016).

A resposta do tipo Th1, necessária para o controle da infecção, caracteriza-se pelo envolvimento de linfócitos CD4 e CD8 e citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e algumas quimiocinas produzidas por macrófagos como a MCP1 e a MIP1. Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos, tornando-os capazes de eliminar o parasito via IFN- $\gamma$ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio, espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares controlando a infecção (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

Estudos em modelos animais clássicos evidenciaram que o IFN- $\gamma$  e outras citocinas são secretadas no decurso da infecção, possui um efeito inibitório em outras citocinas e células do sistema imunológico do hospedeiro e esse mecanismo está relacionado com o estágio de

diferenciação das células T Helper (TH) CD4<sup>+</sup> (BHATTACHARYA et al., 2015; CARVALHO-GONTIJO et al., 2015b; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Experimentos realizados com camundongos C57BL/6 knockout em IFN- $\gamma$  ou no receptor de IFN- $\gamma$  apresentam alta susceptibilidade à doença causada por *L. major* que vem acompanhada por uma expansão da resposta do tipo Th2 (KIMA; SOONG, 2013). Esses animais, no entanto, quando infectados por *L. amazonensis* não apresentam a mesma exacerbação da doença que quando há uma maior produção de IL-4 que passa a apresentar maior gravidade (HURDAYAL; BROMBACHER, 2014).

Essas observações em conjunto sugerem distintos mecanismos na susceptibilidade entre hospedeiros infectados por espécies que acometem no novo e velho mundo, diferentemente ao que fora postulado que a variação da resposta clínica e imunológica à infecção por *Leishmania* estava relacionada, principalmente, com o perfil genético e imunológico dos hospedeiros (KIMA; SOONG, 2013; BHATTACHARYA et al., 2015).

Em infecções por *Leishmania ssp.* a resposta Th1 também é importante no controle da doença, porém, em ambos os contextos as principais ferramentas são as células T helper (Th) e T citotóxicas (Tc). As células Th possuem um importante papel na produção de citocinas como a IL-12 e IFN- $\gamma$  que direcionam a uma resposta do tipo Th1 esperada para o controle da doença (MAHNKE et al., 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Sabendo-se que o sistema imunitário do hospedeiro é fundamental para o controle da infecção e, também que a infecção muitas das vezes é capaz de ter sucesso sobre o sistema imunitário fazendo-se necessário uma intervenção quimioterápica, surge a dúvida de como parasito é capaz de evitar vários mecanismos de defesa da célula e do sistema imunológico? A esse fenômeno atribuiu-se o nome de mecanismos de evasão (III; KELLY, 2010).

A ativação de macrófagos e diferentes receptores de reconhecimento de patógenos podem levar a uma inflamação crônica incluindo aterosclerose, doença de Crohn, artrite, entre outras. No entanto, diferentemente dessas doenças, o protozoário causador da Leishmaniose parece conseguir evitar ativamente as respostas do sistema e suprimir as citocinas inflamatórias tal como a IL-12 induzida pela Lipopolissacaridio (LPS) do parasito (ZAMOSHNIKOVA et al., 2015). Mesmo assim, a natureza e os mecanismos de supressão das interleucinas inflamatórias não são tão bem caracterizadas e a elucidação desses mecanismos podem levar a novos alvos e intervenções terapêuticas em doenças inflamatórias (III; KELLY, 2010; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

A produção das citocinas IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-7 inicia uma cascata de sinalizações pró-inflamatórias da célula do hospedeiro que é seguida pela ativação dos Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) e diferentes receptores incluindo os *Toll-Like*

*Receptors* (TLRs) expressados primariamente por células do sistema imune inato ativado por ligantes específicos de patógenos como a LPS (CARVALHO-GONTIJO et al., 2015b; LAKHAL-NAOUAR et al., 2015; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017).

O mecanismo envolvido nessa relação entre citocinas e TLRs vem sendo exaustivamente estudados para diferentes citocinas e, frequentemente, nota-se uma relação entre a translocação do Fator Nuclear kB de Cadeia Leve (NF-kB), um fator de transcrição seguido por uma ligação com sequências de DNA associadas à promoção do estímulo para a produção de IL-12, por exemplo (HEZARJARIBI et al., 2014; KYRIAKOU et al., 2014; ZAMOSHNIKOVA et al., 2015). Adicionalmente, a ativação do NF-kB e a sinalização do TLR podem também estimular a proteína mitogênica ativada (MAP) e as suas vias que levam a ativação da proteína de ativação de transcrição 1 (AP-1) e do fator de regulação de Interferon (IRF) (AKHOUNDI et al., 2017).

Em contraste, a produção de IL-17 de macrófagos vem sendo demonstrada como um importante caminho inflamatório que culmina com a regulação de citocinas pró inflamatórias em macrófagos, embora esse mecanismo ainda não esteja bem caracterizado (KYRIAKOU et al., 2014), com evidências de que a produção de IL-17 está associada ao controle do parasito e da doença (BANERJEE et al., 2016).

Diferentemente de muitos patógenos, o estágio de promastigotas do parasito causador da leishmaniose fagocitado pelo macrófago ativa imediatamente respostas pró-inflamatórias clássicas do hospedeiro. Contudo, diferentes há evidências que o LPS suprime a ativação da IL-12 (III; KELLY, 2010). Este fato pode possuir um papel central no controle da infecção por *Leishmania ssp.* uma vez que a produção de IL-12 direciona o hospedeiro a uma resposta do tipo Th<sub>1</sub> fundamental ao controle da infecção (III; KELLY, 2010; MAHNKE et al., 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Infecções experimentais com *L. amazonensis* demonstraram um prejuízo inicial da resposta inflamatória. Ensaios demonstraram que infecções de linhagem de monócitos humanos com *Leishmania* suprimiram os genes reguladores da produção de IFN- $\gamma$  (VAN ZANDBERGEN et al., 2002). Em outro trabalho ficou evidente que a supressão do LPS sobre a produção de IL-12 ocasionada por *L. mexicana* está correlacionada com a degradação da MAP, JNK, e de componentes da via de sinalização da NF-kB demonstrando duas coisas: Primeiro (I), o gênero *Leishmania* promove inibição de mais de uma via inflamatória e; Segundo (II), essa inibição pode ser diferente conforme a espécie de envolvida na infecção (ZAMOSHNIKOVA et al., 2015).

Mecanismos adicionais têm sido propostos acerca da capacidade de *Leishmania* suprimir a ativação inflamatória como o envolvimento de receptores de superfície dos

macrófagos associados à supressão imunológica, tais como complemento do receptor 3 (CR3) e a elaboração de citocinas supressoras, tais como a IL-10 (RICARDO-CARTER et al., 2013).

Estudos em macrófagos provenientes de camundongos deficientes em CR3 confirmaram que esse receptor está envolvido na supressão da IL-12 durante a infecção por *Leishmania*, mesmo na presença de estimulação por IFN- $\gamma$  (HOSHINO, 1999). Apesar de progressos na compreensão de como *Leishmania* suprime as respostas inflamatórias de macrófagos venham acontecendo, o conhecimento da medida em que *Leishmania* modula a resposta de macrófagos, suas citocinas e os mecanismos moleculares subjacentes envolvidos são limitados (PÅLSSON-McDERMOTT, 2004).

Para reforçar a compreensão da resposta inflamatória do hospedeiro modulada por *Leishmania*, têm sido explorados os efeitos da supressão de *L. major* e *L. amazonensis*, no contexto da infecção de macrófagos durante a estimulação TLR-4 sobre uma gama de citocinas. Esses dois parasitos são dois representantes relacionados de *Leishmania* ssp., no entanto, ao mesmo tempo, distintos, pois são responsáveis por formas clinicamente diferentes de leishmaniose. Especificamente, foram estudados os efeitos moduladores de *L. major* e *L. amazonensis* sobre as citocinas pró-inflamatórias de IL-17, IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ . A citocina pró-inflamatória indutora de Th-1 primária, IL-12, e as citocinas associadas ao padrão Th-2 (IL-4, 13, 6, 10) e diferenças nas produções dessas citocinas foram notadas em resposta à infecção por esses parasitos (VAN DER KLEIJ, 2002).

As quimiocinas inflamatórias de macrófagos (MIP-1 $\alpha$ ) (proteína inflamatória macrófagos 1 $\alpha$ ) e a MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos-1) também foram estudadas.

Descobriu-se que, apesar de LPS inibir IL-17 e IL-12 por ambas as espécies de *Leishmania*, as respostas de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  induzidas por LPS são reforçadas. Outro achado foi que ambas as espécies de *Leishmania* suprimem IL-6, IL-13 e IL-3 por meio do LPS. Além disso, *L. amazonensis* também suprimiu de IL-4 e IL-10 induzida por LPS, ao passo que espécies de *Leishmania* tanto aumentam a produção de MIP-1 e MCP-1. Esses resultados sugerem, no contexto da estimulação TLR4, que promastigotas de *Leishmania* não promovem a supressão pró-inflamatória generalizada parecendo ter como alvo vias de sinalização de citocinas específicas do receptor TLR4, para seletivamente modular a produção de citocinas e quimiocinas durante parasitismo de macrófagos (KRAEMER et al., 2014; SACRAMENTO et al., 2017).

### 2.3 Tratamento da leishmaniose

Os tratamentos contra as leishmanioses são possuem efetividade abaixo da desejada. Eles podem ser tópicos ou sistêmicos onde a tomada de decisão para a escolha é baseada na espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, região geográfica e apresentação clínica dos sintomas. Para muitos casos de leishmaniose cutânea localizada ou difusa com no máximo de quatro ulcerações menores que 4 centímetros os tratamentos locais podem ser administrados, como termoterapia, crioterapia, paramomicina e infiltração local de antimoniais, pois, essas opções vêm mostrando-se eficientes e garantem menor toxicidade e possibilidade de tratamento ambulatorial, reservando os tratamentos sistêmicos a casos mais complexos(MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013a).

Os fármacos preconizados para o tratamento sistêmico das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes, estibogluconato de sódio (Pentosan<sup>®</sup>), produzido pela GlaxoSmithKline (GSK), antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e Pentamidina, ambos produzidos pela Aventis e a Anfotericina B, produzido pela Bristol-Myers Squibb e a Metilfosina (CROFT; COOMBS, 2003).

No entanto, esses fármacos apresentam elevada toxicidade para vários órgãos e sistemas, fato que limita a sua utilização, sugerindo uma urgência no desenvolvimento de novos fármacos que curem a leishmaniose de maneira eficaz e com menores efeitos colaterais para os pacientes (TIUMAN et al., 2011; PETERSEN et al., 2012) .

Berman, (2005) demonstrou que os antimoniais pentavalentes na quimioterapia das leishmanioses apresentam fatores que limitam o seu uso, como sua alta cardiotoxicidade e regimes de tratamento muito prolongados nem sempre efetivos.

Um paciente que apresenta lesões resistentes ao tratamento não significa que seja portador de uma cepa resistente ao tratamento, fato muitas vezes argumentado, mas difícil de ser demonstrado. O mais provável é que os pacientes refratários ao tratamento sejam, em geral, indivíduos que apresentam estado imunitário deficiente (SOLEIMANIFARD et al., 2017).

O Glucantime<sup>®</sup> não age senão à medida em que os macrófagos estejam estimulados e o doente comece a se defender contra o parasito, na realidade os imunodeprimidos não respondem bem ao tratamento. Por esse motivo, a OMS tem estimulado as pesquisas de alternativas, sendo propostos multicentros de investigações no Mediterrâneo e África para leishmaniose visceral e na América do Sul para leishmaniose tegumentar, visto que a associação do vírus AIDS com a Leishmaniose tem tido sua casuística aumentada especialmente em países africanos (CHOI; LERNER, 2001; MACHADO; PENNA, 2012).



A miltefosina não foi significativamente diferente do antimoniato de meglumina na taxa de cura completa após 6 meses em adultos, crianças e/ou na recidiva da doença (RUBIANO et al., 2012).

Se forem consideradas a espécie de *Leishmania* envolvidas na infecção, estudos com *L. panamensis* e *L. guyanensis* encontraram uma diferença significativa na taxa de cura completa favorecendo a miltefosina após 6 meses. Quanto à *L. braziliensis* Rubiano et al. (2010) e Chrusciak-Talhari (2011) encontraram uma diferença não significativa nas taxas de cura completa aos 6 meses, favorecendo a miltefosina no Brasil enquanto houve diferença significativa favorecendo o antimoniato de meglumina na Colômbia. Além disso, não houve diferença significativa nas taxas de eventos adversos graves em diferentes estudos (CHOI; LERNER, 2001; MACHADO; PENNA, 2012; OLALLA et al., 2015).

Casos de insucesso na quimioterapia com antimoniais pentavalentes vêm sendo relatados em leishmaniose mucocutânea e visceral há muitas décadas. Já é bem postulado que a resposta imune do hospedeiro vertebrado é importante para a cura desta doença, contudo dados sugerem que a falha terapêutica pode estar relacionada a fatores mediados pelo parasito (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; SEGUEL et al., 2016).

Outros estudos avaliaram a eficácia da Pentamidina. Há relatos de doses de 2, 4 e até  $7\text{mg.kg}^{-1}$  por dia com 2 a 4 aplicações em dias alternados. Porém, a tentativa de meta-análise das evidências que compararam a pentamidina com antimoniais pentavalentes é problemática devido à alta heterogeneidade observada dos efeitos do tratamento, o que pode ser devido à diversidade de espécies parasitos causando as doenças e a variação geográfica na resposta terapêutica já mencionada (HU et al., 2015; SEGUEL et al., 2016).

O alvo dos fármacos é a forma amastigota intracelular do parasito que reside no interior do vacúolo parasitóforo de células fagocitárias, especialmente macrófagos. Esse vacúolo possui um pH entre 4,5 e 5,0, fato que modifica as estratégias de nutrição e homeostase iônica do parasito envolvendo uma série de transportadores que podem mediar a entrada e saída de fármacos desse ambiente, determinando a suscetibilidade do parasito ao tratamento. Não obstante, diferentes espécies podem ter desenvolvido as suas estratégias de evasão que podem afetar profundamente a sensibilidade ao tratamento (GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013).

O interesse na classe de fármacos antiparasitários está focado no aumento da eficácia, diminuição dos efeitos colaterais e nos baixos custos dos genéricos. Por exemplo, a utilização da pentamidina apresenta importantes limitações devido a sua toxicidade. Não obstante, desde a sua introdução em 1952 esse fármaco possui valor no tratamento da LC, LV e LD, embora, normalmente seja utilizada como a segunda linha de tratamento quando os antimoniais pentavalentes mostram-se ineficazes (CROFT; COOMBS, 2003).

O antibiótico poliênico, Anfotericina B (AnB) mostra-se excelente opção contra *L. donovani* resistente ao tratamento com os antimoniais pentavalentes embora apesente alta toxicidade e necessite que seja feita uma infusão lenta que dura horas por via parenteral sugerindo cuidados médicos durante a aplicação do tratamento (BERMAN, 2005).

Mesmo com a AnB apresentando limitações, formulações lipídicas que reduzem a sua toxicidade e estende a meia vida vem sendo empregadas. A formulação lipídica (Ambisome<sup>®</sup>, incorporado em um complexo lipídico) ou em colesterol (Ampholin<sup>®</sup>, como um dispersor coloidal) vem apresentando bons resultados para LV ou LC atingindo até 90% de cura. No entanto, custo desse medicamento limita o seu uso justamente nos países mais pobres os que mais necessitam desse fármaco devido à incidência da doença (SPERRY, 1998; HERBRECHT et al., 2003; GANGULY et al., 2010a).

Estudos demonstraram que diferentes mecanismos celulares podem mediar a resistência aos fármacos em células eucariotas. A resistência aos quimioterápicos nestas linhagens podem ser mediadas por quatro mecanismos principais, como: (I) a redução da sua captação pelas células resistentes; (II) aumento da produção da enzima alvo da droga; (III) diminuição da afinidade da enzima alvo pela droga e (IV) extrusão da droga citotóxica pelas células resistentes (OUELLETTE; DRUMMELSMITH; PAPADOPOULOU, 2004; YASINZAI et al., 2013; SOLEIMANIFARD et al., 2017).

Diferentes autores sugerem mecanismos prováveis de resistência aos compostos antimoniais, dentre eles podem ser citados: a redução da capacidade de conversão do SbV em SbIII; a formação de conjugado entre Sb e o tiol intracelular (tripanotiona (TSH)) por conjugase/transferase não identificadas; e a extrusão de Sb por transportadores de efluxo ABC (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007; LIMA-JUNIOR et al., 2013). Desjeux (2005) afirmou haver cerca de 60% de não responsivos ao SbV em Bihar, na Índia, onde recomenda-se prolongado tratamento e uso de fármacos alternativos.

### **2.3.1. Antimoniais Pentavalentes**

Nos últimos 90 anos, o antimonial pentavalente (Sb+5) é o fármaco de primeira escolha recomendado para o tratamento das leishmanioses, estando disponíveis em duas formulações: o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostan) (CROFT; COOMBS, 2003; LIMA-JUNIOR et al., 2013). Apesar do antimoniato de meglumina ser empregado no tratamento da leishmaniose por tantas décadas, somente na década passada a estrutura e composição do composto foram elucidadas por espectrometria de massas e medidas de osmolaridade. No antimoniato de meglumina, o Sb foi identificado complexado à metil

glucamina nas estequiometrias 1:1, 1:2, 2:2 e 2:3 sendo que, em soluções concentradas presentes nas preparações comerciais, a mistura predominante consiste de complexos Sb-meglumina de estequiometria 2:2, 2:3 e 2:1 (AZEVEDO et al., 2014).

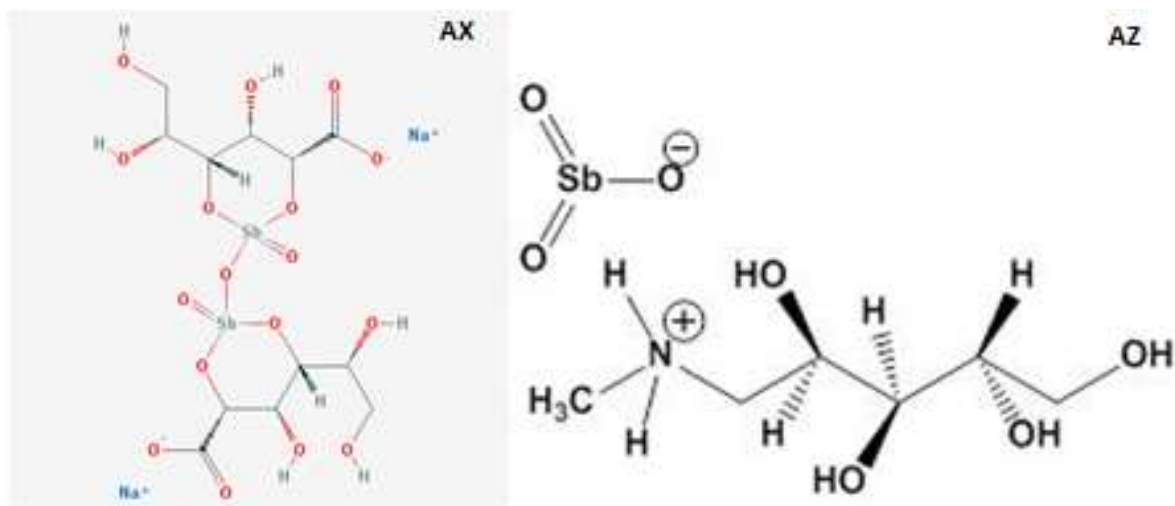
Os antimoniais pentavalentes, como o estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-methyl glucamine (Glucantime), ainda são os principais fármacos utilizadas no tratamento das leishmanioses. Na França e no Brasil emprega-se o Glucantime, apresentado em ampolas de 5mL, enquanto que nos países de língua inglesa utilizam o Pentostan que apresenta a vantagem de ser administrado pela via intravenosa (BAPTISTA et al., 2015).

### 2.3.1.1 Características químicas dos antimoniais pentavalentes

A estrutura química dos antimoniais pentavalentes é complexa. O N-Metilmeglumine, possui peso molecular de 333,33432 g/mol, fórmula molecular  $C_{14}H_{23}NO_8$ , 8 ligações doadoras e 9 receptoras de hidrogênio, carga 0 e 2 ligações covalentes. Seu nome de acordo com a IUPAC é hydroxy(dioxo)- $Sb^{5+}$ -stibane;(2R,3R,4R,5S)-6-(methylamino)hexane-1,2,3,4,5-pentol.

O Estibogluconato de Sódio apresenta peso molecular de 925,895288 g/mol, fórmula molecular  $C_{12}H_{35}Na_3O_{26}Sb_2$ , 16 ligações doadora de hidrogênio e 27 aceitadoras, carga 0 e 13 ligações covalentes (PUBCHEM, 2018). A Figura 7 demonstra a estrutura química e a fórmula eletrônica dos antimoniais pentavalentes.

Figura 7: Fórmula dos antimoniais pentavalentes.



“Ax” fórmula do N-Metilmeglumine estrutura 2D do N-Metilmeglumine retirados do Pubchem, “Az” estrutura em 2D do Estibogluconato de Sódio e fórmula eletrônica do Estibogluconato de Sódio, retirado do Pubchem. Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/64953#section=Top>

A farmacocinética indica que mais que 80% da dose administrada é excretada dentro de 24 horas na urina na forma inalterada. É eliminada em duas fases. Na primeira fase, a meia-vida é pequena e aproximadamente de 2 horas e na segunda fase, a meia-vida é mais lenta, cerca

de 76 horas. O estibogluconato de sódio e n-metilglucantime apresentam farmacodinâmica e farmacocinética semelhantes (TERAPÊUTICO et al., 1985).

#### **2.3.1.2. Mecanismos de ação**

O mecanismo de ação preciso dos antimoniais pentavalentes permanece incerto. Supõe-se que várias enzimas de *Leishmania spp.* sejam inibidas seletivamente. Esses agentes também parecem inibir a fosfofrutoquinase, com subsequente bloqueio da produção de adenosina trifosfato no parasito (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

Pouco se compreende ainda sobre o mecanismo de ação deste fármaco e, sugere-se que o antimônio pentavalente possa ser um pró-fármaco, ou seja, precisa ser convertido de antimônio pentavalentes (SB-V) a antimônio trivalente (SB-III) após sua administração para que os passe a interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, levando à uma depleção dos níveis de ATP intracelular e morte. Além disso, existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, essencial para o seu desenvolvimento (BALAÑA-FOUCE et al., 1998).

#### **2.3.1.3. Protocolos de tratamento com antimoniais pentavalentes para leishmaniose**

Os antimoniais podem ser absorvidos após aplicação por via parenteral, intravenosa ou intramuscular. A dose padrão para a leishmaniose cutânea é de  $20\text{mg}^{-1}$  por dia durante 20 dias e por 28 dias para leishmaniose visceral podendo seguir até 40 dias. Os antimoniais pentavalentes são rapidamente eliminados pela urina e a administração é feita por via parenteral, intramuscular ou endovenosa (CROFT; COOMBS, 2003; LIMA et al., 2010). Tratamentos em animais sofrem alterações principalmente quanto a sua frequência de visto que pode ser infundida em dias alternados por um período entre 21 a 28 (BARROS et al., 2013; DE BARROS et al., 2018)

#### **2.3.1.4. Reações adversas**

Os antimoniais utilizados no tratamento da Leishmaniose apresentam severos efeitos colaterais, tais como arritmias cardíacas, nefrotoxicidade, pancreatotoxicidade e hepatotoxicidade (LIMA et al., 2010; CANTANHÊDE et al., 2015).

A N-metilglucamina e estibogluconato de sódio na dose de  $15\text{ mg SbV/kg/dia}$  por 20 dias em camundongos BALB/c, apresentaram eficácia similar apesar do grupo tratado com

estibogluconato de sódio ter apresentado maior toxicidade, visto que os níveis de ALT, AST, amilase e lipase foram significativamente maiores para esse grupo. Resumidamente, o aumento nos teores das enzimas hepáticas tem sido observado em pacientes com o uso de compostos antimoniais. Elevações de duas a três vezes em relação aos valores basais são frequentemente observados durante a terapia (NAHIDI et al., 2012; NILFOROUSHZADEH et al., 2015; PAGLIANO et al., 2016).

Hamsters tratados por 20 dias com as doses de 120, 160 ou 240 mg SbV/kg/dia com os compostos antimoniais pentavalentes, demonstrou que não há diferenças em relação ao grupo sem tratamento nos valores séricos de ALT, AST, amilase e creatinina (JOLLIFFE, 1985; KATO et al., 2014), embora o Pentostam<sup>®</sup> tenha apresentado maior toxicidade que o Glucantime<sup>®</sup> em relação às alterações produzidas no local de aplicação do fármaco e pelo aumento nos valores da enzima creatina quinase (CK). Portanto, o estibogluconato de sódio está associado a danos hepáticos agudos e diminuição na capacidade funcional metabólica do fígado, os quais são normalmente reversíveis com interrupção do tratamento (KATO et al., 2014).

Alterações pancreáticas relacionadas à toxicidade do tratamento com antimoniais pentavalentes foram relatadas. Um estudo com 65 sujeitos infectados pelo subgênero L (Viannia), demonstrou ocorrência de pancreotoxicidade em 67% dos pacientes que utilizaram, 20 mg/kg de SbV Pentostam<sup>®</sup> uma vez ao dia por 21 (LC) ou 28 (LM) dias, principalmente após a segunda semana de tratamento (LAWN et al., 2006).

O tratamento de ratos com antimoniais pentavalentes na dose de 30 mg/kg do antimoniato de meglumina ou estibogluconato de sódio, durante trinta dias, induziu disfunção tubular caracterizada por diminuição da capacidade de concentração urinária, porém tais alterações parecem ser reversíveis após suspensão do uso desses fármacos e, nessa dose, não foram observadas alterações histopatológicas renais. Estudo realizado com antimonial pentavalente na dose de 40mg SbV/kg/dia mostrou efeitos nefrotóxicos por meio da diminuição da depuração de creatinina, elevação da fração de excreção de sódio e diminuição na capacidade de concentração urinária

As alterações cardiovasculares também são uma grande preocupação nos tratamentos com antimoniais pentavalentes (MATOUSSI et al., 2007). Há relatos que entre 1995-1996 morreram mais pacientes em decorrência do tratamento que por causa da Leishmaniose em Bihar na Índia (THAKUR, 1998).

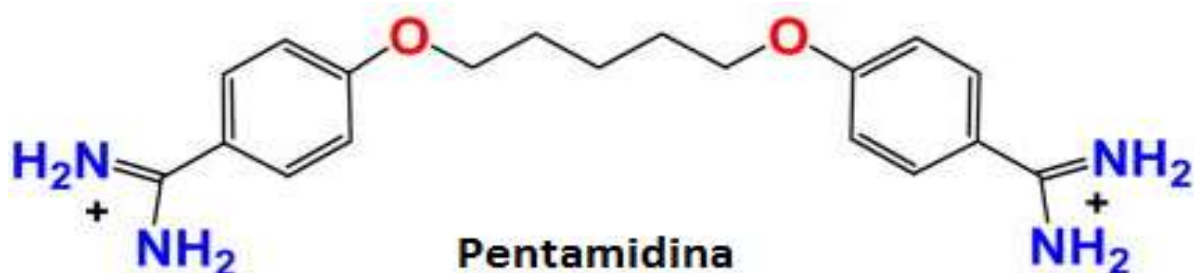
### 2.3.2. Pentamidina

As amidinas são compostos orgânicos caracterizados por possuírem grupamentos C=N e C-N (Figura 8) que os confere ações biológicas variadas. Os derivados aromáticos destes compostos são os mais intensamente estudados, onde a Pentamidina e o Berenil são os compostos mais representativos dessa classe (KOTTHAUS et al., 2011). Pentamidina é usada no tratamento de leishmaniose visceral e mucocutânea refratária aos antimoniais pentavalentes (ANDERSEN et al., 2005).

Essa droga é uma diamina aromática que atua interagindo com o cinetoplasto do parasito e fragmentando a membrana mitocondrial (ASHUTOSH; SUNDAR; GOYAL, 2007). É usada no tratamento da LTA em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano, possuindo maior toxicidade que os antimoniais (SUNDAR, SHYAMGARWAL; RAI; MURRAY, 2010).

A Pentamidina é um derivado sintético de amidina. Sua fórmula molecular é  $C_{19}H_{24}N_4O_2$  possui peso molecular de 340,41936 g/mol, sendo um agente antiprotozoal com eficácia em tripanossomíase, leishmaniose, diferentes infecções fúngicas, pneumonia em pacientes com HIV. Possui quatro pontes doadoras e quatro receptoras de hidrogênio, ponto de ebulição de 238° C, solubilidade de 29,2 mg/L a 25° C (PUBCHEM, 2018). A fórmula da Pentamidina está evidenciada na figura 8.

Figura 8: Fórmula da pentamidina.

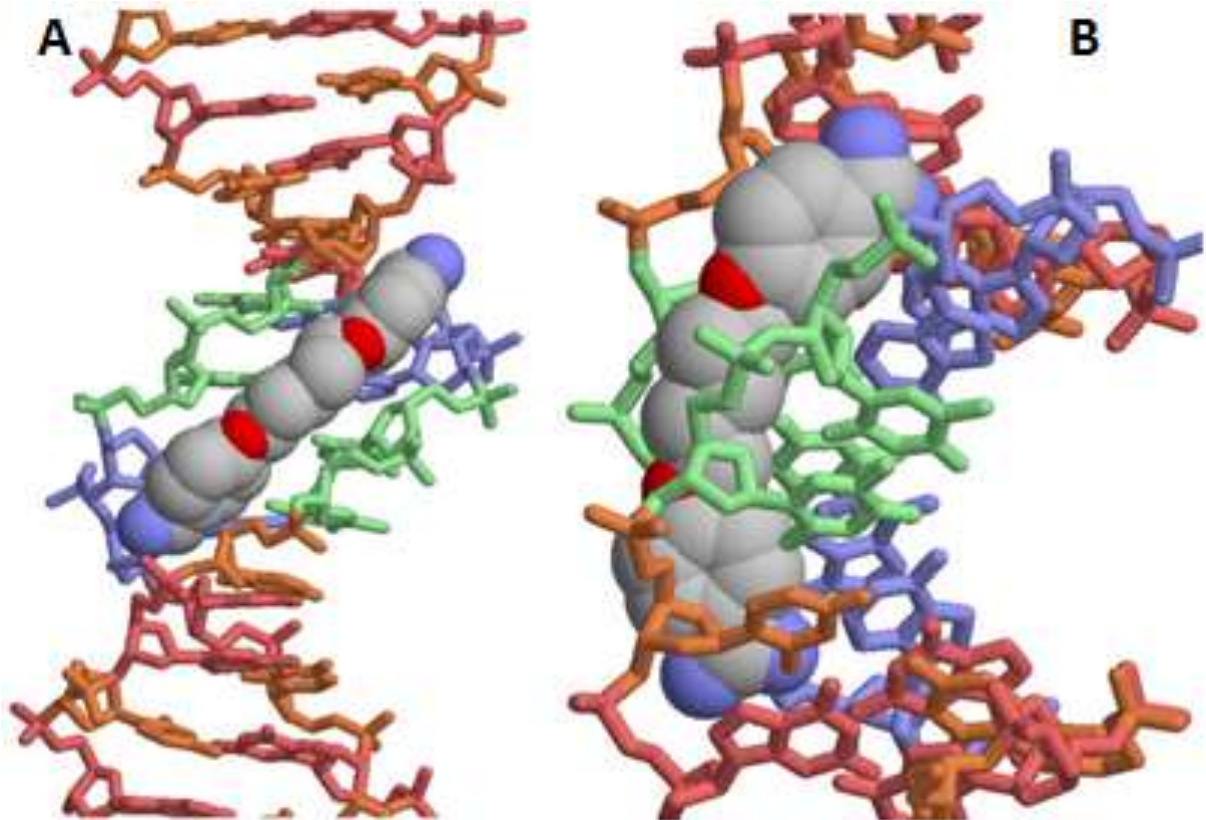


Fonte PUBCHEM. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4735>

A pentamidina possui uma conformação curva ou a capacidade para adotar uma forma diamidínica e terminais com cargas positivas, capacidade de doar ligações de hidrogênio e uma conformação relativamente plana que tem alguma flexibilidade no ajuste de ângulos diedros. Em análise de alta resolução, obteve uma estrutura cristalográfica de raios-X de pentamidina ligado a um de quatro pares de bases AATT ajudando a esclarecer essa ligação (EDWARDS; JENKINS; NEIDLE, 1992). A correspondência aproximada da curvatura do composto para a forma do sulco menor pode ser facilmente visualizada na Figura 9B.

A Pentamidina tem sido descrita como propensa a ligar-se especificamente nas sequências do sulco menor. Esta semelhança e a força de interação com o DNA para este composto fornece evidência inicial de ligação ao DNA que pode estar envolvido no mecanismo de ação do fármaco, especulando-se, portanto, que o mecanismo de ação dessa droga impede que o DNA produza RNA e o metabolismo do parasito para de funcionar acarretando na sua morte (WILSON et al., 2008).

**Figura 9: Estrutura cristalizada da pentamidina ligada ao sítio AATT do DNA.**



(A) vista mais distante e (B) vista aproximada do encaixe da Pentamidina no espaço curvado do DNA combinando com curvatura da sua estrutura. Fonte Wilson (2008) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2515095/#R12>.

### 2.3.2.1. Mecanismos de ação

Seu mecanismo de ação não está claramente definido. Contudo, pode-se interferir que há uma incorporação de nucleotídeos e de ácidos nucléicos do RNA e DNA ao impedir a fosforilação oxidativa, o que ocasiona a inibição da biossíntese do DNA, RNA, fosfolipídeos e proteínas. Especula-se que também pode interferir com a transformação de folato no parasito (CIRILLO et al., 2015; SEGUEL et al., 2016).

A análise das características sugere que as diamidinas devem ligar-se ao DNA. Os estudos iniciais com diamidinas indicaram que eles se ligam ao DNA e que não se

intercalam. Os compostos tipicamente exibiram uma preferência para a ligação com sequências AT, pelo menos, quatro consecutivas, em pares de bases no local de ligação. Correlacionou-se as diferenças de afinidade com alterações na curvatura dos compostos de amidina. Os compostos que se ligam bem a sequências AT tinha uma curvatura adequada para corresponder à forma convexa e torção helicoidal do sulco menor de DNA. As amidinas obtêm ligações de H por meio de grupos NH para interagir com ligações aceitadoras de, N3 O2 do A e T (WILSON et al., 2008).

### **2.3.2.2. Protocolos de tratamento**

A recomendação para o tratamento com Pentamidina é de 4 mg.kg<sup>-1</sup>, aplicados por via endovenosa três vezes por semana. Após a administração de 15 injeções (5 semanas de tratamento) foi observado 77% de sucesso do tratamento em pacientes com leishmaniose visceral e após a administração de 27 injeções (9 semanas de tratamento) o percentual foi de 94% (SOTO et al., 2016). No entanto, comparativamente, esse fármaco apresenta a toxicidade mais alta entre os fármacos utilizadas no tratamento da leishmaniose, sugerindo que as limitações para a sua utilização devem ser cuidadosamente consideradas (VAN DER MEIDE et al., 2009).

### **2.3.2.3 Reações adversas**

A alta toxicidade da Pentamidina é bem descrita na literatura. Relatos de morte repentina, é um dos principais fatores limitantes de seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos ou colaterais, as reações adversas mais frequentes são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Está também relacionada ao tratamento a possibilidade de hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013b).

Em pacientes com menos de seis meses de vida ou mais de 65 anos torna-se necessária a internação hospitalar. Nesse caso devem ser observados, criteriosamente, os seguintes sinais e sintomas: anemia acentuada, diarreia grave ou prolongada, edema generalizado, desnutrição grave, presença de sangramento e infecções concomitantes. Convém ficar atento à possibilidade do surgimento de doenças associadas ao tratamento com este fármaco, tais como: cardiopatia, nefropatia, hepatopatia e hipertensão arterial. Pode também apresentar ausência de resposta ao tratamento (refratariedade primária), casos de recidiva e a presença de icterícia (VAN DER



MEIDE et al., 2009). Leucopenia, neutropenia, ou a trombocitopenia pode ser grave com contagem inferior a 1000 um/mL<sup>3</sup>, plaquetas inferiores a 20.000/mm<sup>3</sup> em pacientes que receberam a terapia parentérica. No entanto a leucopenia acontece com mais frequência que a trombocitopenia. Por fim anemia, disfunção hepática e broncoespasmo tem sido relatada ocasionalmente em pacientes que receberam Pentamidina por via inalatória em muitos casos associada com zidovudina (ASSAN et al., 1995; HU et al., 2015; SOTO et al., 2016).

#### **2.4. Pesquisa de novos fármacos e alternativas antiparasitárias**

Doenças tropicais causadas por parasitos são largamente negligenciadas em todo o planeta. A descoberta de novos fármacos, de fato, não sofre investimentos tão volumosos quanto para outras doenças em razão da população mais afetada pela doença. Com isso, a maioria dos fármacos utilizados no tratamento dessas doenças apresenta décadas desde o seu descobrimento até a sua chegada no mercado e também costumam possuir muitas limitações com a necessidade de internação para a sua infusão ou largas contra indicações (WHO, 2015, 2016, 2017).

No contexto para a solução das diferentes inadequações apresentadas pelos fármacos, a biotecnologia vem avolumando-se em pesquisas para o desenvolvimento de alternativas para a o tratamento de diversas doenças, inclusive a leishmaniose a exemplo de Barros et al., 2016, 2018.

Embora tenha uma conotação as vezes considerada futurística, a biotecnologia não é novidade, ao contrário, os seres humanos vêm utilizando processos biológicos para a obtenção de produtos há dezenas de anos, embora, somente da segunda metade do século XX, o avanço tecnológico tenha sido capaz de impactar a ciência, a produção e a sociedade. A Biotecnologia moderna trabalha com muitos tipos de materiais, organismos, partes de organismos como células, moléculas e, frequentemente, há modificações da sua macro ou microestrutura afim de obter-se otimização da sua função (REIS et al., 2009; REIS; PIERONI; SOUZA, 2014).

Dentre as muitas aplicações da Biotecnologia há diversas tecnologias complexas como o DNA recombinante que propiciou a fabricação de moléculas muito grandes com aplicações terapêuticas antes impossíveis de sintetizar com as tecnologias anteriormente existentes. Ainda, anticorpos monoclonais que são produzidos por células artificiais chamadas de hibridomas permitiu produzir anticorpos idênticos em especificidade, estrutura e afinidade em escala industrial (KAI et al., 2015).

Outro impressionante avanço foi baseado na genômica, proteômica e outros processos biológicos. A tecnologia de sequenciamento permitiu entender a constituição genética de três

milhões de pares de base do genoma humano. A proteômica, por sua vez, permite que entendamos a estrutura e função das proteínas, inclusive as humanas (ZHOU; GAO; SKOLNICK, 2015).

Os biofármacos também são produzidos por meio de técnicas biotecnológicas e são geralmente obtidos a partir de tecnologia de DNA recombinante ou anticorpos monoclonais envolvendo o cultivo de células ou micro-organismos e a sua modificação para a produção (expressão) em condições específicas. Contudo, nem tudo são flores e há riscos na aplicação e desenvolvimento de uma série de tecnologias, em especial, de compostos, drogas e fármacos por meio de qualquer técnica, inclusive a biotecnologia (CATTANEO et al., 2010).

Nesse contexto, a exploração do potencial farmacológico das peçonhas de diferentes animais vem se mostrando promissores sítios de exploração para o desenvolvimento de drogas e fármacos antineoplásicos (M.; Y.A.; F.S., 1994; VONK et al., 2011; GOSWAMI; SAMANT; SRIVASTAVA, 2014), anti-HIV (FENARD et al., 1999) e antiparasitários (DE BARROS et al., 2018), interesse do presente trabalho.

## **2.5. Potencial farmacológico de peçonhas de serpentes**

As serpentes são representadas por aproximadamente 3150 espécies, sendo 2700 espécies predominantes e 600 consideradas peçonhentas (VONK et al., 2011). As peçonhas de animais costumam possuir numerosas famílias de peptídeos e polipeptídeos biologicamente ativos de diferentes naturezas e composições diferindo-se desde a sequência primária, estrutura tridimensional, especificidade, toxicidade, alvo e atividade biológica (BECKER; TERLAU, 2008).

Diversas peçonhas possuem muitos componentes para formar o composto completo que é inoculado pelos animais peçonhentos em caso de acidentes ofídicos. Dentre esses compostos, as fosfolipases-A2 (PLA2s), metaloproteases, serino proteases, acetilcolinesterases, L-aminoácidos oxidases e hialuronidases vem sendo estudados (VONK et al., 2011; GOSWAMI; SAMANT; SRIVASTAVA, 2014).

Dois dos mais importantes componentes de peçonhas de serpentes são as fosfolipases e metaloproteases que exibem uma variedade de efeitos farmacológicos. Outras toxinas possuem propriedades analgésicas como derivados da peçonha da serpente Rei (*Ophiophagus hannah*) e *Naja kaouthia* utilizados na medicina alternativa asiática contra dores agudas e crônica incontrolláveis são mais potentes que a morfina (PU; WONG; GOPALAKRISHNAKONE, 1995).

Muitas peçonhas de serpente possuem agentes antimicrobianos e antivirais. Por exemplo, um bioativo bactericida foi encontrado na peçonha da serpente *Pseudechis australians* que apresenta uma atividade 17.5 vezes mais potente que a tetraciclina e na peçonha das serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *O. scutellatus*, *Naja nigricolis*, *Naja mossambica* vem demonstrando que a sua PLA<sub>2</sub> possui potente ação contra o vírus HIV-1 (FENARD et al., 1999).

Um dos achados mais recentes demonstram uma propriedade anti-helmíntica com um mecanismo de ação diferente dos fármacos clássicos até então empregado no seu tratamento com potencial de sinergia em tratamento combinado com outros fármacos clássicos (DAL MAS et al., 2016).

Ao se considerar a possível aplicação de compostos naturais na medicina, como os presentes em peçonhas de diferentes animais, novas investigações são justificáveis uma vez que há inúmeras evidências sobre a uma vasta possibilidade de aplicação de diversos peptídeos, proteínas, ou enzimas como alternativas e futuramente como um novo fármaco.

### 2.5.1 Crotamina (CTA) de *Crotalus durissus terrificus*

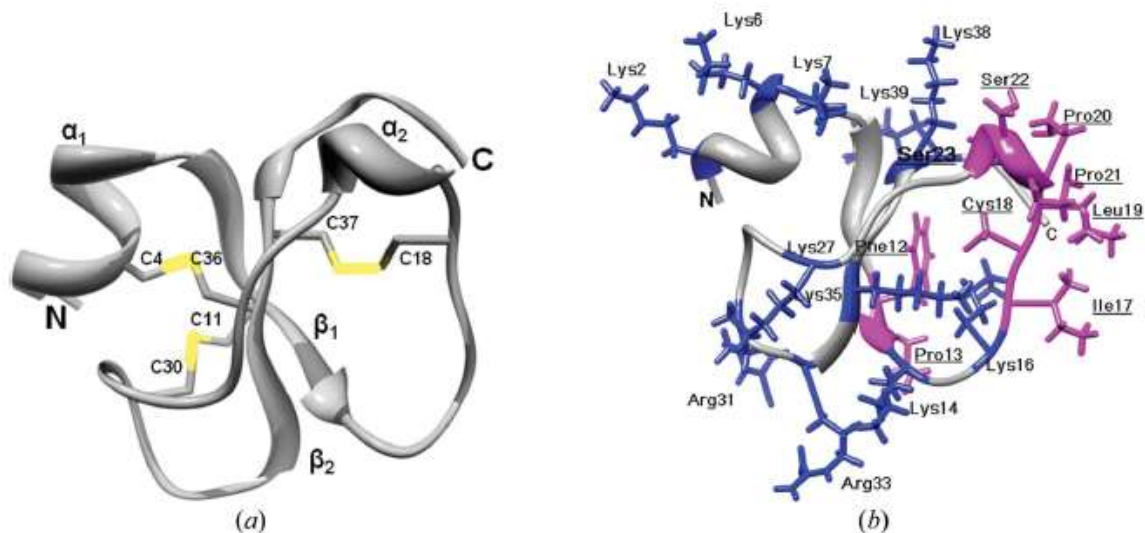
As serpentes do gênero *Crotalus* podem atingir de 1,20 a 1,50 metros e são facilmente identificadas pela presença de um guizo na cauda. São serpentes que preferem regiões secas e com maior presença de pedras e não gostam de florestas úmidas. No Brasil seis subespécies são encontradas com uma distribuição geográfica variada e pequenas diferenças morfológicas (HOYOS ARGÁEZ; ALMEIDA-SANTOS, 2012);

A ponte de dissulfeto Cys4-Cys36 ancora o primeiro seguimento  $\alpha$ -hélice para  $\beta 2$ .  $\beta 1$  e  $\alpha 2$  são conectados entre si por uma volta flexível formada pelos resíduos Lys14-Leu19 e a hélice que volta a  $\alpha 2$  é conectada a  $\beta 2$  por uma volta flexível ainda mais extensa formada pelos resíduos Asp24-Arg33. A respeito de sua topologia, ela pode ser classificada como  $\alpha\beta 1\beta 2$  visto a estrutura secundária que compreende uma pequena  $\alpha$ -hélice N-terminal (resíduos 1-7) e duas fitas  $-\beta$  antiparalelas. A folha  $\beta$  é estabilizada por pontes de hidrogênio entre  $\beta 1\alpha\beta 2$  envolvendo os resíduos His10-Cys37 e Phe12-Lys35 e pontes de hidrogênio entre  $\beta 2$  e  $\alpha 2$ , formado por Ser23-Lys38. Duas pontes de hidrogênio conectam  $\beta 2$  com o C-terminal (TOYAMA et al., 2003; CORONADO et al., 2013; KERKIS et al., 2014) A Figura 10 A evidencia essas propriedades.

A CTA é relativamente pequena, a sua carga assim como seus resíduos hidrofóbicos são expostos para fora conferindo a essa molécula forças eletrostáticas e hidrofóbicas na sua superfície. Os seus resíduos mais hidrofóbicos estão localizados no lado com carga positiva da

molécula e a maior carga positiva Lys2, Lys6, Lys7, Lys14, Lys16, Lys27, Lys35, Lys38, Lys39, Arg31 e Arg33 estão no lado oposto (TOYAMA et al., 2003; CORONADO et al., 2013; KERKIS et al., 2014). A figura 10 B evidencia essas características espaciais.

**Figura 10: estrutura da crotamina de *Crotalus durissus terrificus*.**



(a) O N- e C- terminais os resíduos de cisteína estão marcados. (b) os resíduos altamente hidrofóbicos em rosa estão localizados na lateral da molécula e os resíduos com carga positiva em azul estão no lado oposto da molécula. Fonte: adaptado de CORONADO, 2013.

A toxina apresenta similaridades estruturais com outros peptídeos antimicrobianos. A sua superfície altamente positiva pode interagir positivamente com superfícies negativas de membranas com potencial para induzir a formação de passagens por meio das quais moléculas e/ou íons podem difundir. A estrutura tridimensional da CTA é semelhante às  $\beta$ -defensinas que são moléculas ricas em lisina e arginina, porém, a sequência primária não apresenta a mesma similaridade, contudo, o arranjo da sua estrutura secundária de alfa hélices, folhas beta e a conservação de seis cisteínas com três pontes dissulfídicas da crotamina são típicas de beta defensinas de animais (CORONADO et al., 2013).

A elucidação da estrutura da toxina ajudará a compreender toda a ação de outros peptídeos homólogos que, inclusive, poderão suportar o design de novas moléculas capazes de transportar drogas ou fármacos no interior das células (CORONADO, 2013).

### 2.5.1.1. Propriedades farmacológicas da CTA de *Crotalus durissus terrificus*

A CTA isolada da serpente de *C. d. terrificus* foi a primeira molécula extensamente estudada no Brasil sobre os seus aspectos bioquímicos e farmacológicos. Clinicamente, há intensa paralização dos membros posteriores quando injetada por via peritoneal. Como um dos

efeitos mais estudados da toxina é a sua ação analgésica que chega a ser 30x mais potente que a morfina (MANCIN et al., 1998).

As células musculares são as primeiras a responder à CTA com a redução acentuada do potencial de repouso da membrana sugerindo ação sobre os canais de sódio e potássio alterando a permeabilidade desses íons, em especial, induzindo a uma forte entrada de sódio no músculo que acaba acarretando potente contração, induzindo lesões e necrose caracterizada pela extensa vacuolização do retículo sarcoplasmático e ruptura dos filamentos de actina e miosina, efeito clássico das miotoxinas (MANCIN et al., 1998; KERKIS et al., 2014)

Todavia, a toxina não atua em canais de sódio dependentes de voltagem, porém, provoca espasmos musculares rápidos, sugerindo que os canais de sódio não são o seu principal alvo sendo contraditório na literatura. Por outro lado, após um estudo de modelagem afirmam que há a interação da crotamina com canais de potássio dependentes de voltagem bloqueando-os (PEIGNEUR et al., 2012; HERNANDEZ-OLIVEIRA E SILVA et al., 2013).

A CTA isolada de *C. d. terrificus* apresenta forte atividade anti-helmíntica notando ainda que esse peptídeo é a única molécula célula penetrante com afinidade por vesículas ácidas conjuntamente com atividade antimicrobiana e antitumoral (DAL MAS et al., 2017). Essa molécula ainda demonstrou forte atividade e seletividade da crotamina sobre melanomas em modelos animais (PEREIRA et al., 2011) e alta seletividade dessa molécula para células neoplásicas. Finalmente, postulou-se que a crotamina possui grande potencial para marcador de células tumorais (KERKIS et al., 2014).

Como comentando anteriormente, a crotamina apresenta uma forma tridimensional semelhante às  $\beta$ -defensinas e, sugere-se, que podem ser derivadas de um gene ancestral comum embora a estrutura primária não apresente mais que 35% de semelhança. A Crotamina demonstrou atividade moderada para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (CORONADO et al., 2013; YAMANE et al., 2013).

Há relatos de um forte potencial bactericida e antifúngica semelhantemente à duas drogas empregadas no tratamento da leishmaniose, a pentamidina e a anfotericina B, respectivamente, com potente atividade contra *Candida spp.*, particularmente contra, *Candida albicans* incluindo em cepas resistentes (OGUIURA et al., 2011; YAMANE et al., 2013).

Os peptídeos que demonstram a capacidade de penetrar e se translocar no interior das células são chamados de Peptídeos Célula Penetrantes (PCPs). Podem ser referidos também como domínios de transdução de proteínas (DTP), peptídeos tróia ou sequência de translocação de membrana (STM) como postularam Järver e Langel (2006). Entre as propriedades que incluem a entrega intracelular de compostos bioativos como fármacos, outras biomoléculas ativas, ácidos nucleicos, DNA, RNA de interferência, peptídeos, proteínas, nanopartículas e

fluoróforos utilizados para captação de imagens de microscopia confocal ou de fluorescência (CHEN et al., 2012).

Esses dados em conjunto sugerem que a crotamina tem suporte científico suficiente para ser um promissor carreador de fármacos para o interior da célula e DNA de células proliferativas ativas especialmente pela habilidade de ligação com substratos macromoleculares negativos, fator essencial para funcionar como veículo de fármacos. Assim, o envolvimento de proteoglicanos de sulfato de heparan da superfície celular na captação da crotamina e na interação entre crotamina DNA implicam na ligação com o DNA e polissacarídeos (CHEN et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2012).

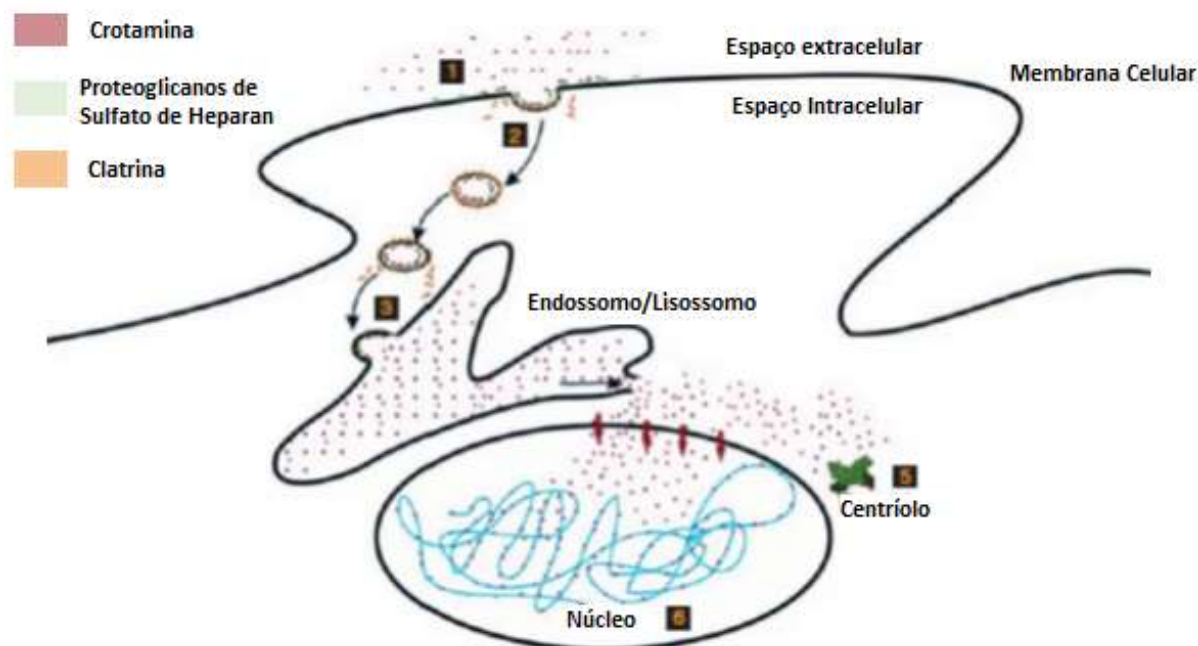
Em vários casos, a ligação inicial de PCPs com a célula ocorre por meio dos proteoglicanos de sulfato de heparan (HSPG) da membrana plasmática (negativos) e os resíduos de arginina (positivos) da membrana plasmática estabelecendo um contato eletrostático entre os peptídeos e a superfície celular, seguida por endocitose ou por macropinocitose (ZIEGLER et al., 2003). Estudo realizado com crotamina fluorescente visualizou a presença de crotamina na superfície celular de células CHO-K1 ricas em PHGS e o uso de anticorpos anti- HSPG confirmou que esse resultado (NASCIMENTO et al., 2007).

Em outros ensaios de competição e inibição, tais como os realizados com heparinase, confirmaram que há interação da crotamina com os HSPGs na superfície da membrana celular confirmando essa relação (KERKIS et al., 2010).

Estudo com microscopia confocal permitiu descobrir que esse peptídeo é capaz de penetrar nas células cinco minutos após a sua adição no meio de cultura com fibroblastos humanos (KERKIS et al., 2004). Este mesmo trabalho demonstrou *in vivo* que a Crotamina foi encontrada em células do líquido peritoneal e na medula de camundongos com localização perinuclear na célula, no entanto, após 16-24 horas a crotamina não foi mais encontrada na célula, tendo sido degradada ou exocitada, mecanismo ainda não elucidado.

Em baixas concentrações não tóxicas, a propriedade célula penetrante e, conseqüentemente, a capacidade de translocação através da membrana de células eucarionticas sem causar danos e, quando dentro da célula, a sua localização é frequentemente reportada no núcleo com uma afinidade específica por células ativas e altamente proliferativas penetrando no interior das células durante o período G1/S ligando-se aos centrossomos e aos cromossomos (KERKIS et al., 2004, 2014) O mecanismos de penetração celular da CTA está exposto na figura 11.

**Figura 11: Mecanismo de penetração celular da crotamina.**

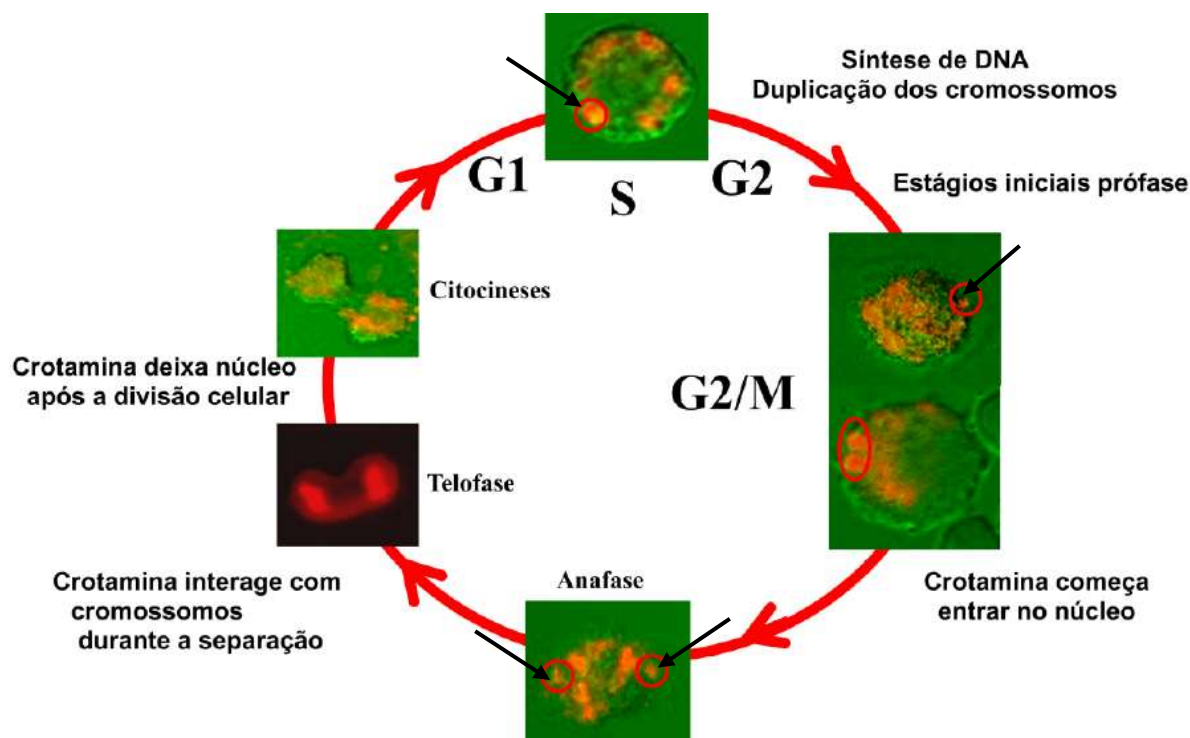


(1) a crotamina é apresentada na matriz extracelular e a sua carga positiva interage com a carga negativa dos Proteoglicanos de Sulfato de Heparan da Membrana (HSPG). (2) a crotamina e o complexo de HSPG são endocitados em vesículas as quais são transportadas dentro da célula com o auxílio da Clatrina. (3) essas vesículas se fundem com o endossomo/lisossomo. (4) a crotamina se acumula dentro do lisossomo até ser liberada no citosol. (5) após liberação, a crotamina interage com os centríolos e entra no núcleo. (6) interação com os cromossomos. Fonte: adaptado de (KERKIS et al., 2010).

Uma vez que a Crotamina entra em contato com a matriz extracelular pode ocorrer de interagir com a superfície da membrana por meio do HSPG formando complexos que são endocitados em vesículas e se fundem com os endossomos/lisossomos. A crotamina se acumula nos lisossomos até ser liberada para o citosol, no entanto, não se sabe se o conteúdo do lisossomo é liberado junto para o citosol. Deste ponto em diante, não se sabe exatamente se a crotamina permanece ligada ao HSPG. Uma vez a crotamina no citoplasma, há interação com os centríolos, direciona-se ao núcleo e, posteriormente, interagindo com os cromossomas celulares (KERKIS et al., 2010). O esquema básico de penetração da CTA na célula por meio da interação com a HSPG está demonstrado na Figura 12.

Investigações de translocação através da membrana celular indicam que a absorção desse peptídeo acontece independente de energia, receptores de membrana e transportadores podendo penetrar na célula por caminhos distintos, dependendo das propriedades biofísicas, bioquímicas e carga da molécula de cada PCP (RÄÄGEL; SÄÄLIK; POOGA, 2010).

Figura 12: Interação da crotamina com cromossomos.



Interação da crotamina com cromossomos duplicados e centríolos durante processo de replicação celular. A crotamina foi conjugada com Cy-3 e captou-se os sinais fluorescentes por microscopia confocal. Os círculos indicam a região e as setas o local exato da localização da Crotamina. Fonte: adaptado de KERKIS (2010).

A crotamina possui a propriedade de transfecção, pois, forma um complexo com o DNA de interação eletrostática. Ensaio de microscopia confocal *in vitro* revelou forte sinal de fluorescência verde nas células, sugerindo alta eficiência de transfecção, a qual variou de 30 a 90% de acordo com o tipo de célula utilizado (NASCIMENTO et al., 2007). Ensaio *in vivo*, com injeções intraperitoneais em camundongos C57BL/6 com complexos crotamina/plasmídeo pEGFP revelou que 10 a 20% das células da medula óssea, foram transfectadas e emitiam forte sinal de fluorescência (NASCIMENTO et al., 2007; HAYASHI et al., 2008).

## 2.6. JUSTIFICATIVA

A inadequação das terapêuticas atuais e a urgência pela descoberta de alternativas para o tratamento da Leishmaniose é urgente. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam em situação de risco para a contração de alguma das formas da leishmaniose em 98 países com clima tropical ou temperado. Essa doença negligenciada afeta 12 milhões de pessoas e há aproximadamente 2 milhões de notificações anuais, fato que sugere que as medidas de controle e prevenção não são efetivas. Por outro lado, a cura dessa doença, especialmente das formas mais graves são dependentes de quimioterapia, no entanto, o tratamento de primeira escolha chega a possuir entre 40 e 60% de falha terapêutica no primeiro esquema de tratamento com



consideráveis efeitos colaterais. O fármaco de segunda escolha apresenta severos efeitos colaterais incluído a morte súbita e lesão de diferentes órgãos, ou o custo total de um esquema de tratamento é inviável na maioria dos países que essa doença é endêmica, revestindo de importância essa investigação. A CTA de *C. d. terrificus* apresenta propriedades químicas, farmacológicas e biotecnológicas que inspiram pesquisas na exploração dessas propriedades. Finalmente, em razão destes fatos, o presente estudo resolveu explorar se a associação entre a CTA de *C. d. terrificus* modificaria a eficácia e toxicidade dos fármacos Glucantime e Pentamidina no tratamento da leishmaniose cutânea.

## **2.7. OBJETIVOS**

### **2.7.1. Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia e os possíveis efeitos tóxicos da Crotamina isolada da peçonha da serpente *C. d. terrificus* associada aos fármacos empregados na terapia da leishmaniose.

### **2.7.2. Objetivos Específicos**

- ✓ Verificar a viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*;
- ✓ Verificar a citotoxicidade *in vitro*;
- ✓ Verificar e comparar os efeitos sobre a produção *in vitro* de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO;
- ✓ Simular a possível interação molecular entre GLU ou PEN com CTA;
- ✓ Caracterizar as massas moleculares da GLU, PEN e CTA
- ✓ Verificar a eficácia da associação de Glucantime, Pentamidina à CTA de *C. d. terrificus in vivo*
- ✓ Verificar a toxicidade da associação de Glucantime, e Pentamidina associados à CTA de *C. d. terrificus*;
- ✓ Verificar a resposta imunológica do animal após os tratamentos GLU ou PEN combinadas com CTA.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 Experimentos *in vitro*

##### 3.1.1 Cepas de *Leishmania amazonensis*

Neste trabalho foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), cuja cultura original foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto, da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo. As culturas foram mantidas a partir de camundongos BALB/c, previamente inoculados com  $10^5$  promastigotas de *L. amazonensis*.

##### 3.1.2 Obtenção da Crotamina de *Crotalus durissus terrificus*

O veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel) foi adquirida no Serpentário Proteínas Bioativas LTDA-ME, Batatais-SP e a toxina isolada (Crotamina) no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde da FIOCRUZ-Rondônia e Universidade Federal de Rondônia (CEBio). Uso na Medicina da Universidade Federal de Rondônia (CEBIO) licenciado para trabalhar com toxinas animais (CNPq / CGEN protocolo No. 010627 / 2011-1). A concentração de proteína foi determinada por espectrofotometria a 280 nm, utilizando coeficientes de extinção da composição dos aminoácidos aromáticos de componentes Trp, Trp e Phe, respectivamente;  $280 = 265559 \text{ } 1197 \text{ } 0,7 = 1,236104 \text{ M}21 \text{ CM}21$ .

##### 3.1.3 Fármacos antileishmania

As drogas utilizadas foram a N-Metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup> (GLU)) (Sanofi-Aventis) e Pentamidina (Sanofi-Aventis), que foram devidamente acondicionadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento da diluição para o seu uso nos experimentos. As combinações de GLU com CTA ou PEN com CTA foram feitas no momento dos experimentos. As diluições para a concentração final foram feitas com PBS. Para os tratamentos *in vivo*, as drogas foram descongeladas, diluídas e combinadas momentos antes do tratamento dos animais semelhantemente aos procedimentos *in vitro*, contudo respeitando as concentrações de trabalho.

### 3.1.4 Obtenção dos macrófagos peritoneais de camundongos

Camundongos da linhagem BALB/c, machos, com 8-10 semanas de idade, pesando entre 20-22g, obtidos do Biotério (IPEPATRO/FIOCRUZ-RO) foram mantidos em condições padronizadas de biotério e experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do IPEPATRO/ FIOCRUZ-RO. O presente estudo foi aprovado sob o número de protocolo 2013/01.

Camundongos BALB/c foram inoculados, por via intraperitoneal, com 2 ml de Tioglicolato 3%. Após 5 dias os foram eutanasiados por deslocamento cervical e 5 mL de meio RPMI gelado foram injetados na cavidade peritoneal e em seguida recuperados com a própria seringa. O lavado peritoneal foi centrifugado a 200 G por 10 min a 4°C e o sobrenadante desprezado. Em seguida, o ‘‘*pellet*’’ foi ressuscitado em 5 ml de meio RPMI e as células obtidas, contadas em câmara de Neubauer. Os macrófagos ( $5 \times 10^5$ /poço) foram plaqueados em placa de 24 poços contendo lamínulas estéreis e incubados a 37°C em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> (Estufa modelo RCO3000TVBB, REVCO Technologies, Asheville, USA).

### 3.1.5 Ensaio de inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*

Para a diluição do GLU, PEN utilizou-se o modelo previamente descrito por Berenbaum, (1978) onde a concentração maior de trabalho sofre uma diluição de 100x para a menor (WAGNER, 2011). Em seguida, foi realizado um experimento piloto padronizando-se a utilização das concentrações de 100, 12.5 e 3,125µg/mL de CTA desprezando-se as concentrações de 50, 25 e 6,25µg/mL em razão de não haver diferença entre essas concentrações.

Para a realização do ensaio foi pipetado, em tubos de 1,5mL estéreis, as concentrações de drogas associadas ou não à crotamina e feito uma incubação de 48 horas como previamente padronizado, descartando-se os tempos de 24h e 72h. Cada poço possuía  $10^5$  promastigotas e a contagem foi realizada em câmara de Newbauer após coloração com Eosina. Esse experimento foi realizado em duplicata.

**Tabela 01:** descrição das concentrações e combinações entre a N-Metilglucamina e crotamina.

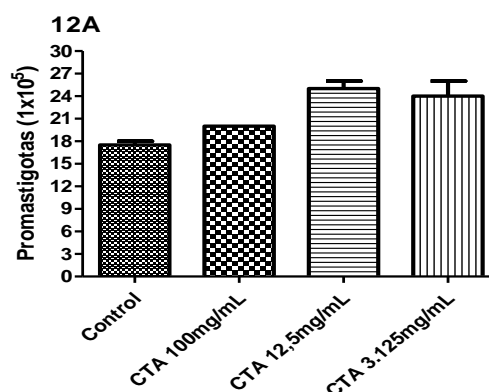
CONTROLES	EXPERIMENTOS	
Glucantime µg/mL	Glcantime µg /mL + Crotamina µg/mL	
300	300	100

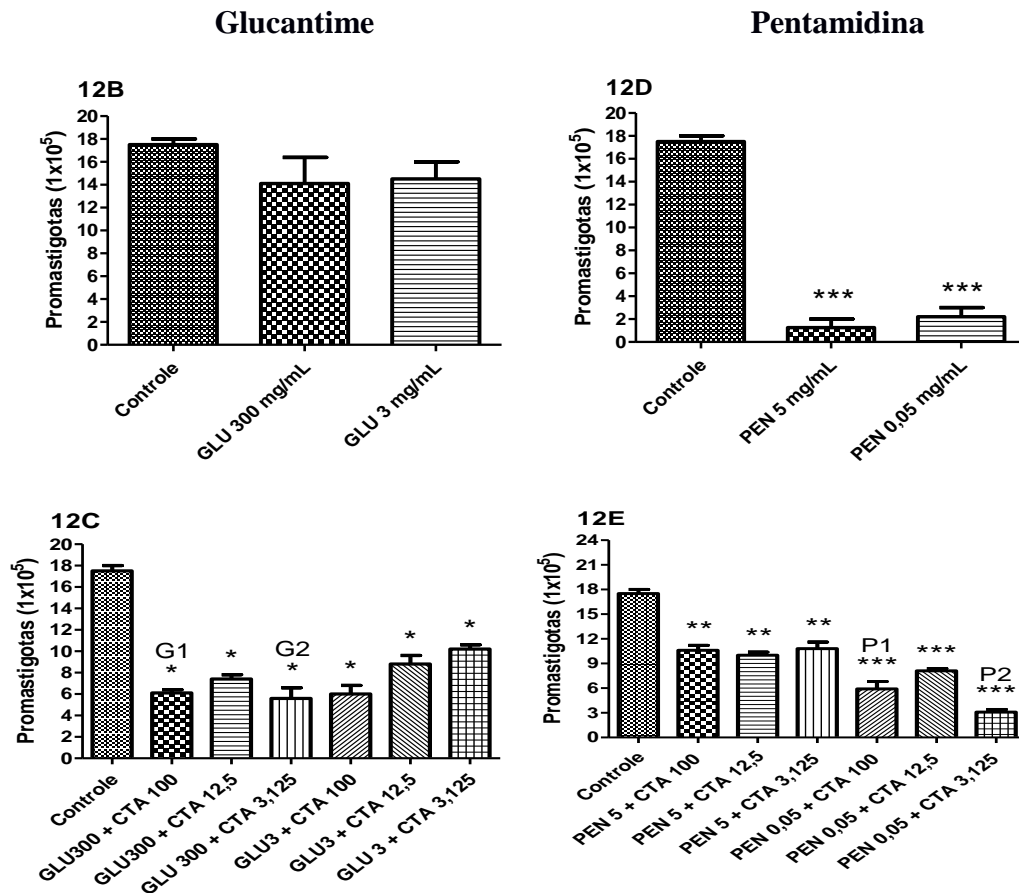
3	300	12,5
<b>Pentamidina</b>	300	3,125
5	3	100
<b>0,5</b>	3	12,5
<b>Crotamina µg/mL</b>	3	3,125
<b>100</b>	<b>Pentamidina µg /mL + Crotamina µg/mL</b>	
<b>12,5</b>	5	100
<b>3,125</b>	5	12,5
<b>SDS</b>	5	3,125
0,2%	<b>0,5</b>	100
	<b>0,5</b>	12,5
	<b>0,5</b>	3,125

Este estudo preliminar determinou as associações mais promissoras a partir da % de inibição das formas promastigotas de *L. amazonensis*. Portanto, as combinações GLU 300 µg/mL + CTA 100 µg/mL e GLU 300 µg/mL + CTA 3,125 µg/mL; PEN 0,05 µg/mL + CTA 100 µg/mL e PEN 0,05 µg/mL + CTA 3,125 µg/mL foram consideradas as mais adequadas seguindo o critério estabelecido e doravante chamadas de G1, G2, P1 e P2 respectivamente.

Os resultados demonstraram que a Crotamina, nas concentrações aqui utilizadas não inibem o crescimento no número de parasitos se comparados ao controle e entre si (Fig. 12A) ( $p>0,05$ ). As duas concentrações de GLU não inibem o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* se comparado ao controle e entre si (Fig. 12A) ( $p>0,05$ ). Contudo, a associação entre GLU e CTA, todas as concentrações foram mais eficientes na inibição de promastigotas de *L. amazonensis*. A Pentamidina apresenta elevada toxicidade para *L. amazonensis* (Fig. 12D) ( $p<0,0001$ ) e as combinações da PEN com a CTA mantiveram o efeito leishmanicida desse fármaco (Fig. 12E) ( $p<0,01$  e  $0,0001$ ). No entanto, não foi observado efeito concentração dependente (Fig. 12C e 12E).

**Figura 13: Ensaio preliminar de inibição de promastigotas de *L. amazonensis* para determinação das concentrações de trabalho**





**Figura 12: Ensaio preliminar de inibição de Promastigotas de *L. amazonensis*.** Promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^5$ ) incubadas por 48h com as seguintes concentrações de fármacos: Pentamidina 5 $\mu$ g/ml (Pen5) Pentamidina 0,05  $\mu$ g/ml (Pen0,05), Glucantime 300  $\mu$ g/ml (Glu300), Glucantime 3  $\mu$ g/ml (Glu3), Crotamina 100 $\mu$ g/ml (CTA100), Crotamina 12,5 $\mu$ g/ml (CTA12,5), Crotamina 3,125  $\mu$ g/ml (CTA3,125) e; com as seguintes combinações entre elas: GLU 300 + CTA 100, GLU 300 + CTA 12,5, GLU 300 + CTA 3,125, GLU 3 + CTA 100, GLU 3 + CTA 12,5, GLU 3 + CTA 3,125, PEN 5 + CTA 100, PEN 5 + CTA 12,5 e PEN 5 + CTA 3,125, PEN 0,05 + CTA 100, PEN 0,05 + CTA 12,5 e PEN 0,05 + CTA 3,125. Foi utilizada a ANOVA ONE WAY com teste posterior de Tukey e sensibilidade de 5%. (\*= $p < 0,05$  vs Controle; \*\*= $p < 0,01$  vs Controle. \*\*\*= $p < 0,0001$  vs Controle)

### 3.1.6 Infecção, tratamento de macrófagos peritoneais e inibição de amastigotas de *L. amazonensis*

Para avaliação da atividade antileishmania sobre formas intracelulares alvo principal dessa pesquisa, foram realizados ensaios de infecção em macrófagos peritoneais, obtidos de camundongos BALB/c. Os ensaios de infecção foram realizados conforme anteriormente descrito (SILVA-JARDIM, I; HORTA, M F; RAMALHO-PINTO, 2004). Os macrófagos, depois de 24 horas de incubação, foram lavados duas vezes com meio RPMI e, em seguida, infectados com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 5 parasitos x 1 macrófago. As células infectadas foram incubadas “overnight” a 33°C em estufa com atmosfera úmida contendo a 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período os poços foram novamente lavados com RPMI. Foram utilizadas células infectadas não tratadas, como controle negativo da infecção.

As culturas infectadas foram tratadas com GLU e da PEN, da CTA e das associações P1, P2, G1 e G2 por 48 horas e mantidas a 33°C. Após esses períodos, o sobrenadante das culturas foi coletado e congelado para ensaios.

A taxa de infecção e o número de parasitos intracelulares foram avaliados pela contagem de 100 macrófagos, em microscópio óptico - aumento de 1000X, após coloração das lâminas pela técnica May Grünwald-Giemsa (MGG). As células foram lavadas com RPMI sem suplemento e imobilizadas com soro fetal bovino até a lamínula secar naturalmente em temperatura ambiente. Depois de secas, o corante May Grünwald foi adicionado sobre as lamínulas por 10 segundos, em seguida, foi adicionado água destilada por 1 minuto. A solução corante/água foi removida e o corante Giemsa, preparado no momento do uso, foi acrescentado por 5 segundos (1 gota corante/mL água destilada). Finalmente a lamínula foi lavada rapidamente com água destilada e, depois de seca, montada com bálsamo sobre uma lâmina de vidro para realização da contagem de amastigotas intracelulares. O índice fagocítico foi determinado por meio da fórmula:

**Índice fagocítico: (% de macrófagos infectados x no total de leishmania)**

**Fórmula 1:** fórmula para a determinação do índice fagocítico.

### **3.1.7 Determinação do IC 50**

Os resultados dos valores de absorbância referentes à inibição de promastigotas em ensaio de diluição seriada foram convertidos em porcentagem de viabilidade celular onde as células em presença de DMSO correspondiam a 100% de morte. A análise de regressão foi realizada nos resultados de viabilidade, resultando em uma equação usada para calcular a concentração de substância necessária para produzir 50 % de redução de viabilidade celular (IC50) por meio do software GraphPad Prism 5.0. Como pode ser visto nas figuras 12C e 12 D não há um resultado dependente de concentração fato que impossibilitou a determinação do IC50. Com isso, optou-se por utilizar o modelo de Berembaum, (1978).

### **3.1.8 Ensaio de citotoxicidade**

O objetivo desse experimento foi determinar a citotoxicidade do GLU e da PEN, da CTA e das associações P1, P2, G1 e G2 por meio de verificação de sua viabilidade. Para tal, dois métodos foram utilizados a quantificação de MTT e LDH. Células de linhagem J774

( $1 \times 10^5$ ), HEP-G2 ( $1 \times 10^5$ ), VERO ( $1 \times 10^5$ ) e C2C12 ( $4 \times 10^4$ ) foram incubadas por 48h com GLU, PEN, CTA, G1, G2, P1 e P2.

O método de MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5difeniltetrazólio), foi realizado seguindo protocolo como anteriormente descrito em Nicolete et al., (2009) e, parte do sobrenadante das culturas foi separado para a quantificação de LDH.

Para a realização do MTT, as células foram cultivadas em frascos apropriados e mantidos em exponencial contínuo crescimento. Então, elas foram removidas dos frascos, lavadas e colocados em placas de 96 poços em uma densidade de  $10^5$  células/poço. Como controle de morte foi utilizado dodecilsulfato (SDS) (1%) diluído no meio de cultura).

No final do período de tratamento, adicionou-se 10 ml de MTT (5 mg / ml) para os poços e as células foram incubadas por mais 4 h. Finalmente, 50 ml de SDS a 20% foi adicionada a cada poço. Os cristais de formazan foram dissolvidos a  $37^\circ \text{C}$ , durante a noite. A absorvância de cada poço foi lida em uma microplaca leitor (mQUANT, Biotek Instruments Inc.) a 570 nm. A taxa de citotoxicidade foi calculada da seguinte forma: % de composto citotoxicidade  $\frac{1}{4}$  1 (média) O.D. tratamento medicamentoso / (média) O.D. de células cultivadas em média + 2% de DMSO x 100, compondo uma fórmula conforme descrito abaixo.

$$\text{Citotoxicidade celular} = \frac{1 - (\text{D.O. amostra} \times 100)}{(\text{D.O. controle})}$$

**Fórmula 2:** fórmula para a determinação da citotoxicidade celular

Como anteriormente citado, parte do sobrenadante da cultura utilizada para se determina a citotoxicidade por MTT foi utilizada para quantificação de (LDH).

O LDH foi quantificado por meio do Kit Wiener em automatizador Kanelab 60i. Anteriormente à quantificação, o automatizador foi calibrado seguindo o manual do equipamento. Todos os experimentos foram realizados em duplicata por poço. Para se determinarem os resultados, observou-se a diferença para os valores do controle e expressados em %. Ambos os experimentos foram realizados em sextuplicatas.

### 3.1.9 Determinação da produção de nitrito

A concentração de nitrito, como medida indireta da produção de NO pelas células foi quantificada pelo método colorimétrico de Griess, na qual o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido. O diazo composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina (NED), gerando um composto de coloração vermelha intensa como anteriormente descrito (GREEN et al., 1982).

O reagente de Griess é uma mistura 1:1 de 1% de sulfanilamida e 0.1% de naftiletilenodiamino-bicloridrato em ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 5%. Os tratamentos das células (M0 peritoneais de camundongos BALB/c) seguiram as mesmas condições experimentais descritas no item 3.1.6.

As condições de incubação de células seguiram os experimentos anteriores onde as células (M0 peritoneais de camundongos BALB/c ( $1 \times 10^5$ )) foram encubados com GLU, PEN, CTA, G1, G2, P1 e P2 por 48 horas. Em seguida, foram retirados 0,1ml dos sobrenadantes livre de células dos poços e foram incubados com igual volumes de misturas de reagentes Griess (1% de sulfanilamina, 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) -etilendiamina, 2,5% de  $H_3PO_4$ ) à temperatura ambiente durante 15 min. O a absorbância foi medida em um leitor de microplacas em 540 nm. As concentrações de NO foram calculadas a partir de curva padrão de nitrito de sódio. Os dados foram apresentados como concentração mM de  $NO_2$  (nitrito).

### **3.1.10 Determinação da produção de citocinas**

As citocinas TNF- $\alpha$  e IL-12 foram quantificadas nos sobrenadantes de macrófagos peritoneais coletados em experimento previamente descrito. Para cada citocina mensurada foi adotado o método imunoenzimático ELISA de captura. Para esta finalidade, foi utilizado o kit BD OptEIA® de acordo com as instruções dos fabricantes.

As condições de incubação de células seguiram os experimentos anteriores onde as células (M0 peritoneais de camundongos BALB/c ( $1 \times 10^5$ )) foram encubados com GLU, PEN, CTA, G1, G2, P1 e P2 por 48 horas.

A quantificação do TNF- $\alpha$  e IL-12 realizada no sobrenadantes das culturas de M0 peritoneais de camundongos BALB/c foi realizada por meio do método de ELISA. Nesse método foram aplicados 50 $\mu$ L de tampão pré-tratamento em cada poço. Em seguida foram adicionados 50 $\mu$ L dos controles e das amostras e duplicata. A placa foi incubada à temperatura ambiente (20-25°C) por 1 hora e, após esse período, foi lavada por 3 vezes com solução tampão do kit. A seguir, foram adicionados 50 $\mu$ L de anticorpo biotilado em cada poço, incubada por mais 1 hora e após esse período lavada por três vezes com solução tampão do kit. Em seguida foi feita a adição de astreptamidina HRP em cada poço e nova incubação por 30 minutos foi realizada à temperatura ambiente. Após esse período nova lavagem com solução tampão foi realizada por 3 vezes. Após essa lavagem 100 $\mu$ L de substrato TMB foi adicionado em cada poço e procedendo-se em seguida outra incubação de 10 minutos com a placa abrigada da luz. Finalmente, a reação foi bloqueada aplicando-se 100 $\mu$ L de “solução de parada” contida no kit.



A absorvância foi medida em espectrofotômetro (mQUANT, Biotek Instruments Inc.) a 450 e 550nm. Este experimento foi realizado em duplicata.

## 3.2 Experimentos *in silico*

### 3.2.1 Simulação de interação molecular por Bioinformática (Docking e Dinâmica Molecular)

Para investigar as características estruturais e interações entre CTA e moléculas dos dois fármacos (Glucantime® e Pentamidina), foi realizado o *Docking* molecular. Para obtenção da estrutura da CTA foi utilizado dados do Protein Data Bank (PDB) (<http://www.pdb.org>) (código PDB: 4GV5). As estruturas dos fármacos foram obtidas do servidor PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). A acoplagem foi efetuada em GEMDOCK programa 2.1, utilizando Genethic Algoritmo (GA) com o tamanho da população (N = 300) e toda a proteína foi considerada como alvo. A estrutura de melhor pontuação de ancoragem foram analisados e visualizados no Swiss-PDB espectador, UCSF Chimera [g], ligplot + 1,4 [h] e estruturas imagens com persistência de visão Raytracer (POV-ray) 3,62 (<http://www.povray.org/>).

Uma simulação molecular dinâmica (MD) do complexo CTA-Glucantime em água foi realizada a uma temperatura de 298K. A estrutura da cadeia A da crotamina foi submetida ao programa H++ no servidor web <http://biophysics.cs.vt.edu/H++> (Gordon et al., 2005) para obter estimativas dos PKs dos resíduos e definir quais grupos seriam ionizados na simulação MD a pH = 7,4. Os resíduos de histidina 5 e 10 foram protonados e uma carga líquida de +8 foi calculada para CTA, uma proteína básica. Todos os resíduos Asp, Lys e Arg foram ionizados em conjunto com N e C-terminal. A topologia do glucantime foi gerada usando o Automated Topology Builder (ATB) (CANZAR et al., 2012; KOZIARA et al., 2014) com um servidor web e a versão 2.2 em um framework de campo de força GROMOS 53A6 (OOSTENBRINK et al., 2004).

A Dinâmica Molecular DM foi realizada utilizando o pacote GROMACS-5.1 (SZILÁRD et al., 2015). As coordenadas atômicas do complexo CTA-Glucantime e CTA-Pentamidina obtidas por encaixe foram utilizadas para montar uma caixa de simulação com 6,4 x 6,3 x 6,8 nm e completou-se com 9106 moléculas de água SPC (BERENDSEN et al., 1981) e oito íons Cl<sup>-</sup> para neutralizar o sistema. O campo de força GROMOS 53A6 foi utilizado para modelar a CTA e os íons. As interações entre átomos não vinculados, incluindo o Van der Waals e a eletrostática, foram considerados dentro do raio de corte (rc= 1,4 nm) e o tratamento de correções através do uso de rc foi feito por meio da PME (DARDEN; YORK; PEDERSEN,

1993). LINCS foi usado para manter os vínculos envolvendo átomos de hidrogênio na proteína (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992; HESS et al., 1997) para a geometria da água. O tempo de integração foi definido em 2fs durante 200 ns nas corridas MD. Antes de executar a DM, a energia do sistema foi minimizada usando Conjugate Gradients para 5000 passos. Em seguida, realizaram-se simulações de DM, com 10000 passos em volume constante (conjunto NVT) e pressão controlada (conjunto NPT) com tempo de temporização de 0,1; 1 e 2 fs. No conjunto NVT, as posições atômicas de CTA e Glucantime ou CTA e Pentamidina foram congeladas para uma melhor orientação das moléculas de água. No conjunto de NPT, a densidade do sistema foi ajustada, considerando a pressão a 1 atm, controlada pelo algoritmo de Berendsen (BERENDSEN et al., 1984). A trajetória de simulação na DM foi coletada no conjunto NPT, com temperatura mantida em 298 K pelo algoritmo V-rescale (BUSSI; DONADIO; PARRINELLO, 2007).

O potencial de interação molecular (ICP) entre o CTA e Glucantime, ou CTA E Pentamidina foram obtidos por meio da soma dos potenciais de interação ( $r < 1,4$  nm) entre os átomos não vinculados (potencial eletrostático de van der Waals), calculados usando o caminho MD. O desvio quadrático médio (RMSD), entre as posições dos átomos de carbono  $\alpha$  na primeira estrutura CTA e os outros coletados no trajeto MD a cada 2 fs, foi usado para monitorar a estrutura do CTA durante a simulação.

### 3.2.2 Ensaio de interação molecular por Ressonância Plasmônica de Superfície

Todos os ensaios de interação molecular foram realizados utilizando sistema Biacore T200 (GE Healthcare), que utiliza a tecnologia de Ressonância Plasmônica de Superfície – RPS, para detectar as interações em estudo.

Para o escalonamento de pH e pré concentração foi utilizado sensor chip série S tipo CM5 carboximetilado para imobilizar o ligante, neste caso a CTA purificada da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Previamente a imobilização, se fez necessário estabelecer as condições ideais de pH para a etapa de imobilização do ligante a superfície do sensor chip. O escalonamento de pH e análise de pré concentração foram realizados nas concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de CTA em seis faixas crescentes de pH, utilizando tampão de acetato de sódio 10 mM nos pHs 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; e 6,0; tampão de fosfato de sódio 66 mM nos pHs 6,5; 7,0; 7,5; 8,0; tampão de carbonato de sódio 100 mM nos pHs 8,5; 9,0; 9,5 e 10. As análises de escalonamento de pH e pré concentração foram realizadas na célula de fluxo 2, com uma taxa de fluxo de 5 $\mu\text{L/min}$  e tempo de contato de 180 segundos para cada ciclo. Para regeneração de

pequenos montantes residentes na superfície do sensor chip por atração eletrostática, foi utilizado um pulso de 30s de uma solução de NaOH 50 mM ao final de cada ciclo

Dentre os possíveis métodos de imobilização da proteína a superfície do sensor chip, optou-se pelo acoplamento amina, que consiste na imobilização da proteína por ligação covalente entre aminas primárias, principalmente de lisina, à matriz de dextrana carboximetilada existente na superfície do sensor chip. O nível de imobilização de ligante (RL) foi previamente calculado segundo a equação 1, em 2210,3 Unidades de Ressonância (RU) para Pentamidina, 3853,7 e para Glucantime<sup>®</sup> 814,3 considerando-se Rmax igual a 100 RU e estequiometria da ligação 1:1. Desta maneira foi planejado preparar um sensor chip com 4000 RU de CTA imobilizada, capaz de detectar interação com qualquer uma das duas substâncias.

As informações foram obtidas no Chemspider e NCBI, conforme Tabela 2.

<b>Substância</b>	<b>Massa Molecular</b>	<b>Banco de Dados</b>	<b>Número de ID</b>
Pentamidina	340,18	ChemSpider	4573
Glucantime <sup>®</sup>	195,11	ChemSpider	8249
Crotamina	7519,05	NCBI	GenBank AAF34911.1

**Tabela 2:** Dados das moléculas utilizadas neste estudo.

**Equação 1:** determinação da resposta de ligação

$$R_{max} = \frac{MM_{analito} \times RL \times S}{MM_{ligante}}$$

Após atingir os níveis de imobilização pl:

Rmax = Resposta máxima do sensor chip  
 MM analito = Massa molecular do analito  
 MM ligante = Massa molecular do ligante  
 RL = Nível de ligante imobilizado sobre o sensor chip  
 S = Estequiometria da ligação

remanescentes bloqueado com um pulso de 400 segundos, em fluxo contínuo de 10 µl/min de etanolamina 1M. Paralelamente as células de fluxo foram preparadas apenas com etanolamina imobilizada, para serem utilizadas como células de fluxo de referência, desta maneira os ensaios foram todos realizados simultaneamente em duas células de fluxo, sendo uma célula de fluxo analítica contendo CTA imobilizada, e outra célula de fluxo de referência contendo apenas etanolamina imobilizada.

Os sensorgramas foram analisados a partir da subtração entre os sinais de ambas células de fluxo utilizando o programa BIAevaluation versão 1.0.

Os ensaios de ligação entre o ligante (CTA) e os analitos (PEN e GLU) foram realizados nas seguintes condições analíticas: tampão PBS 1X (10mM de fosfato de sódio, 2,7 mM cloreto de potássio, 137 mM de cloreto de sódio; pH ajustado para 7,5) (GE Healthcare Cat. # 100672), temperatura de 37°C, fluxo contínuo de 30 µL/min, tempo de contato de 60 segundos e tempo de dissociação de 180 segundos. Para as etapas de regeneração, ao final de cada ciclo, foi utilizado uma solução de glicina pH 2,5, onde foram aplicados pulso sequenciais de 30 segundos de duração em um fluxo de 30µL/min.

As amostras foram todas analisadas nas concentrações de 100, 50, 25 e 5  $\mu\text{M}$  diluídas em tampão de corrida PBS 1X. Exceto a PEN que se apresentou insolúvel na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Todas as soluções foram centrifugadas a 12000 xg por 10 min antes de proceder com as análises.

### 3.2.3 Caracterização molecular por Espectrometria de Massas (EM)

A espectrometria de massa foi realizada em equipamento de MALDI (Dessorção assistida por ionização da matriz a laser), com dois analisadores TOF (AXIMA TOF/TOF<sup>2</sup> Shimadzu Biotech, Riverwood Drive, Columbia, Maryland, USA), operando em modo reflectron e utilizando solução saturada de ácido Alfa-4-ciano-hidroxicinamico como matriz de ionização. As massas moleculares das amostras foram determinadas por comparação com padrões externos de proteínas.

Todos os experimentos foram utilizados com matriz ionizante de solução saturada de ácido Alfa-4-ciano-hidroxicinamico que foi homogeneizada com a amostra em uma proporção de 1:1 (v/v) e após a co-cristalização na placa do aparelho, esta foi introduzida na câmara a vácuo do AXIMA-TOF e analisada em modo linear, o espectro representa a média dos pulsos a laser.

## 3.3 Experimentos *in vivo*

### 3.3.1 Infecção dos animais

Para a realização dos ensaios, 30 camundongos BALB/c foram inoculados na pata traseira direita com  $1 \times 10^5$  promastigotas de *L. amazonensis* diluídas em PBS 1x. Após oito semanas o tratamento foi iniciado e os camundongos foram separados, de acordo com o tratamento recebido, em seis grupos de cinco animais: G1-PBS, G2 (CTA  $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ), G3 (GLU  $300\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ), G4 (PEN  $4\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ), G5 (GLU  $300\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  + CTA  $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ) e G6 (PEN  $4\text{mg}/\text{kg}^{-1}$  + CTA  $5\text{mg}/\text{kg}^{-1}$ ). A progressão da lesão foi monitorada por meio da medida do tamanho das patas, com o auxílio de um paquímetro. Os animais infectados e do grupo controle foram avaliados três vezes por semana, após o início do tratamento, por um período de 21 dias, pela comparação do tamanho da lesão da pata infectada com a pata contralateral não infectada.

### **3.3.2 Protocolo de tratamento dos animais**

Os animais foram selecionados aleatoriamente em grupos de cinco indivíduos por gaiola, tratados por três semanas. O tratamento procedeu com injeções em dias alternados durante a semana, todas as segundas, quartas e sextas feira, contudo, nos sábados e domingos não havia tratamentos. Totalizou-se nove dias de tratamento e 48 horas após o último dia de tratamento procedeu-se a eutanásia dos animais.

### **3.3.3 Massa dos animais**

O monitoramento da massa dos animais foi realizado como controle dos efeitos toxicológicos relacionado aos tratamentos aqui propostos. Inicialmente foi realizada a mensuração da massa dos animais dois dias antes do início do tratamento experimental. Logo, a cada dia de tratamento, nova mensuração da massa foi realizada imediatamente antes da infusão dos medicamentos. A balança utilizada foi da marca Toledo, modelo MS Precision L com precisão de 0,1g. A mensuração era dada como válida quando a balança apontava o momento de mensuração ao travar a leitura.

### **3.3.4 Monitoramento do tamanho da lesão da pata dos animais**

O tamanho da lesão da pata dos animais foi descrito em milímetros e medida com paquímetro manual com precisão de 1 mm. A mensuração aconteceu sempre no ponto de maior volume da pata infectada e realizada do início ao fim pelo mesmo pesquisador.

### **3.3.5 Recuperação de amastigotas dos tecidos da pata e linfonodo de camundongos infectados**

Após os camundongos serem eutanasiados, as patas e os linfonodos foram removidos na primeira articulação acima da lesão com a utilização de uma tesoura cirúrgica em condições estéreis. Em seguida, partes dos tecidos das patas e linfonodos foram maceradas em meio RPMI completo liberando as amastigotas de *L. amazonensis* e outra parte foi pesados e acondicionados em formol para posterior histologia. Ao término, o macerado, foi diluído 100x em meio RPMI completo e plaqueado em placa de 96 poços com um volume final de 200µl. O macerado concentrado foi centrifugado a 200x G por 10 minutos a 4°C. Parte do sobrenadante foi removido e acondicionado em tubo estéril de 1,5mL a -20°C para posterior quantificação de

citocinas. Após 6 dias, uma alíquota destes parasitos (transformados em promastigotas) foi diluída em eritrosina B (0,04%) e contada em câmara de Neubauer espelhada, em microscópio óptico (aumento de 400X). Os parasitos corados de vermelho foram considerados mortos e aqueles birrefringentes e móveis foram considerados vivos. O cálculo para determinar o número de parasitos na infecção foi realizado por meio da equação a seguir:

$$n^{\circ} \text{de parasitas} = n^{\circ} \text{de parasitas contados} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

**Equação 2:** equação do cálculo para determinar o número de parasitos no tecido da pata e linfonodo.

### 3.3.6 Quantificação dos marcadores bioquímicos

No momento da eutanásia, parte do plasma que foi centrifugado a partir do sangue dos animais foi separado para a quantificação de Lipase, Amilase, Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Creatinina, Ureia, Creatina Kinase MB (CK/MB) e Creatina Kinase total (CK Total). Esses ensaios foram realizadas por meio de um automatizador da marca Konelab, modelo 60i e com os kits Wiener Lab. seguindo o protocolo do aparelho. O referido automatizador foi calibrado antes da realização dos ensaios de acordo com o manual do fabricante. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

### 3.3.7 Quantificação de citocinas séricas

O teste de matriz de contas citométricas (CBA) foi utilizado para a determinação de citocinas no soro. Todos os reagentes utilizados foram do kit para citocinas de ratos Th1 / Th2 / Th17 compradas de Becton Dickinson Biosciences (San Jose, CA, EUA). O citómetro foi calibrado de acordo com as recomendações do fabricante. As curvas padrão para cada citocina (0,00 a 5,000 pg / mL) e as amostras foram analisadas com FCAP Array Software (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA), e os valores foram relatados como pg / mL.

## 3.4 Análise estatística

Os dados, quando paramétricos, foram tratados por meio da ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey e quando não paramétricos foram tratados por meio do teste de KRUSKAL-WALLIS seguido por teste posterior de Dunn ambos com significância de 5%. Os dados descritivos foram expressos em média e desvio padrão e em porcentagem (%). Os dados foram tratados por meio do programa PrismStat 7.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Ensaios *in vitro*

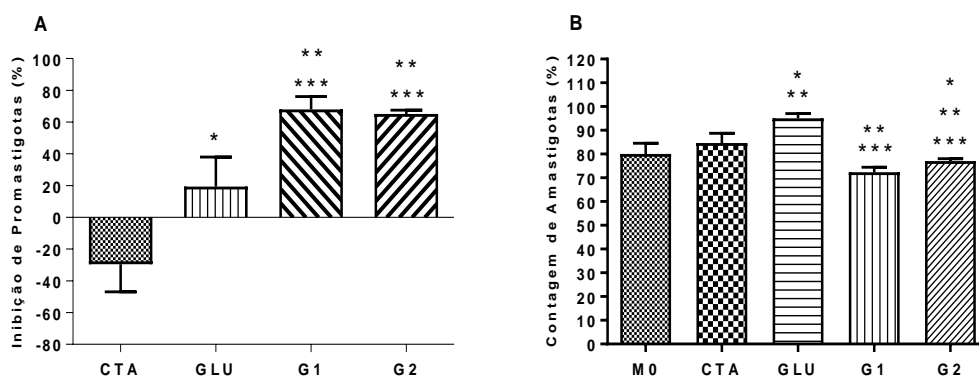
#### 4.1.1 A associação do GLU ou PEN com CTA inibe o crescimento das formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

Após incubação de 48 hs das promastigotas de *L. amazonensis* com CTA foi observado aumento de 29,5% na contagem de parasitos (Fig. 13A e 13C). Fenômeno semelhante foi observado após a incubação de macrófagos infectados por 48h com CTA com aumento de 4,6% na contagem de amastigotas (Fig. 13B). Por outro lado, as formulações G1 e G2 foram mais eficientes na inibição das formas promastigotas ( $P<0,01$ ) (Fig. 2A) e amastigotas ( $P<0,0001$ ) (Fig. 13B) de *L. amazonensis* que GLU ( $P<0,05$ ).

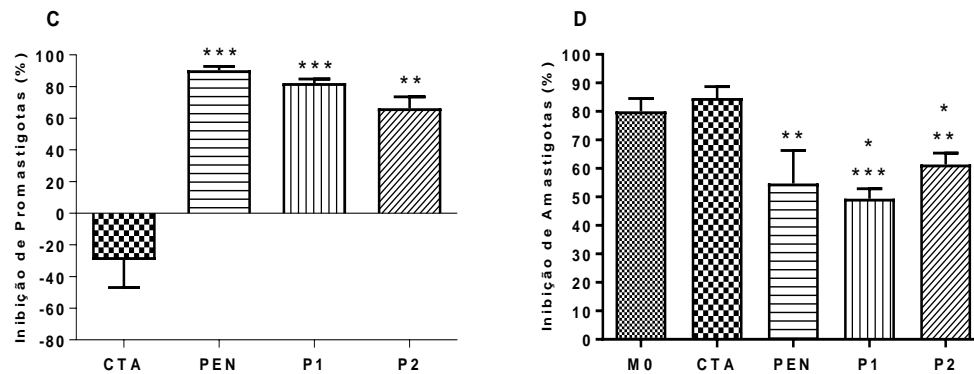
A PEN inibiu o crescimento das promastigotas de *L. amazonensis* ( $P<0,0001$ ) com a mesma eficiência que as formulações P1 e P2 ( $P>0,05$ ) (Fig. 13C), efeito semelhante foi observado na inibição das amastigotas de *L. amazonensis* também com igual efeito da PEN e das formulações P1 e P2 ( $P<0,001$ ) (Fig. 13D), porém, não há diferença entre a PEN e as formulações se comparados entre si ( $P>0,05$ ).

Figura 13: Ensaio de inibição de promastigotas e tratamento de macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

#### Glucantime



## Pentamidina



(A e C) promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^5$ ) incubadas por 48h com CTA (Crotamina 100 $\mu$ g/mL), GLU (Glucantime 300 $\mu$ g/mL), G1 (Glucantime 300 $\mu$ g/mL + Crotamina 100 $\mu$ g/mL), ou G2 (Glucantime 300 $\mu$ g/mL + Crotamina 3,125 $\mu$ g/mL), PEN (Pentamidina 5 $\mu$ g/mL), P1 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/mL + Crotamina 3,125 $\mu$ g/mL), P2 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/mL + Crotamina 100 $\mu$ g/mL). (B e D) ensaio de infecção e tratamento de macrófagos peritoniais com *L. amazonensis*. Utilizou-se a ANOVA ONE-WAY seguido de Tukey com nível de significância de 5%. (M0= Macrófagos Infectados) (A) (\* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  vs CTA e  $P < 0,005$  vs GLU). (B) (\* $P < 0,05$  vs M0; \*\* $P < 0,05$  vs CTA; \*\*\* $P < 0,0001$  vs M0). (C) (\*\* $P < 0,01$  vs CTA; \*\*\* $P < 0,0001$  vs CTA, (D) (\* $P < 0,05$  vs M0; \*\* $P < 0,05$  vs CTA; \*\*\* $P < 0,0001$  vs M0).

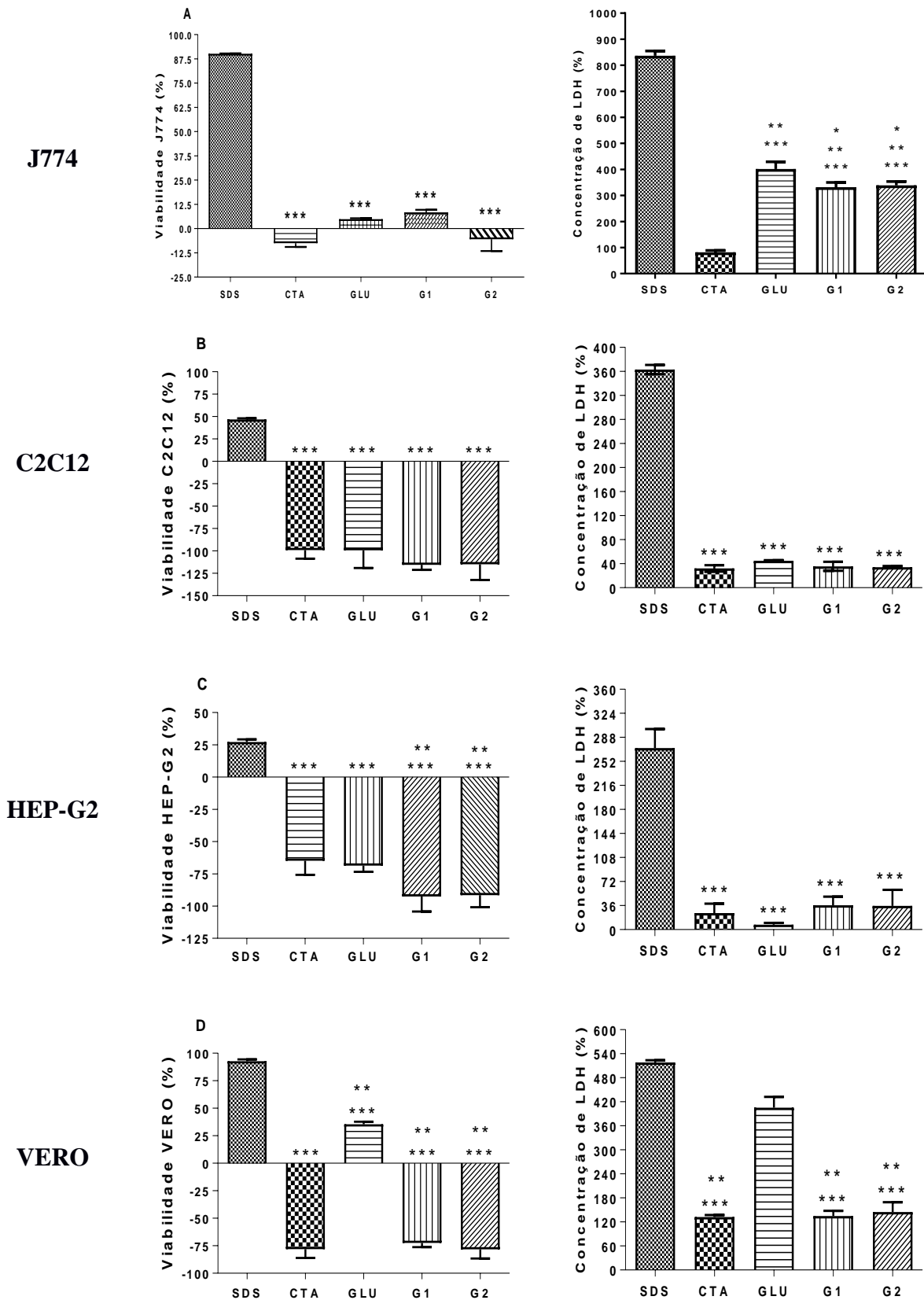
### 4.1.2. As formulações G1 e G2 não apresentaram maior citotoxicidade *in vitro* do que GLU, porém, P1 e P2 foram menos citotóxicos que PEN

O GLU apresentou citotoxicidade para células de linhagem VERO, porém, a CTA e as formulações G1 e G2 não foram tóxicas para as linhagens celulares aqui testadas. A CTA permitiu proliferação de células J774, C2C12, HEP-G2 e VERO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14A, 14B, 14C e 14D). O GLU demonstrou citotoxicidade para as células VERO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 3D), porém, não para as outras linhagens celulares ( $P > 0,05$ ) (Fig. 14A, 14B e 14C). A formulação G1 inibiu o crescimento de J774 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14A), porém, permitiu proliferação de C2C12, HEP-G2 e VERO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14B, 14C e 14D). A formulação G2 permitiu proliferação de células J774, C2C12, HEP-G2 e VERO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14A, 14B, 14C e 14D). A PEN demonstrou alta citotoxicidade em células J774 e VERO ( $P > 0,05$  vs SDS) (Fig. 14E e 14H), contudo, em células C2C12 e HEP-G2 não demonstrou efeito citotóxico. As formulações P1 e P2 não demonstraram citotoxicidade em células J774, C2C12, HEP-G2 e VERO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 14E, 14F, 14G e 14H).

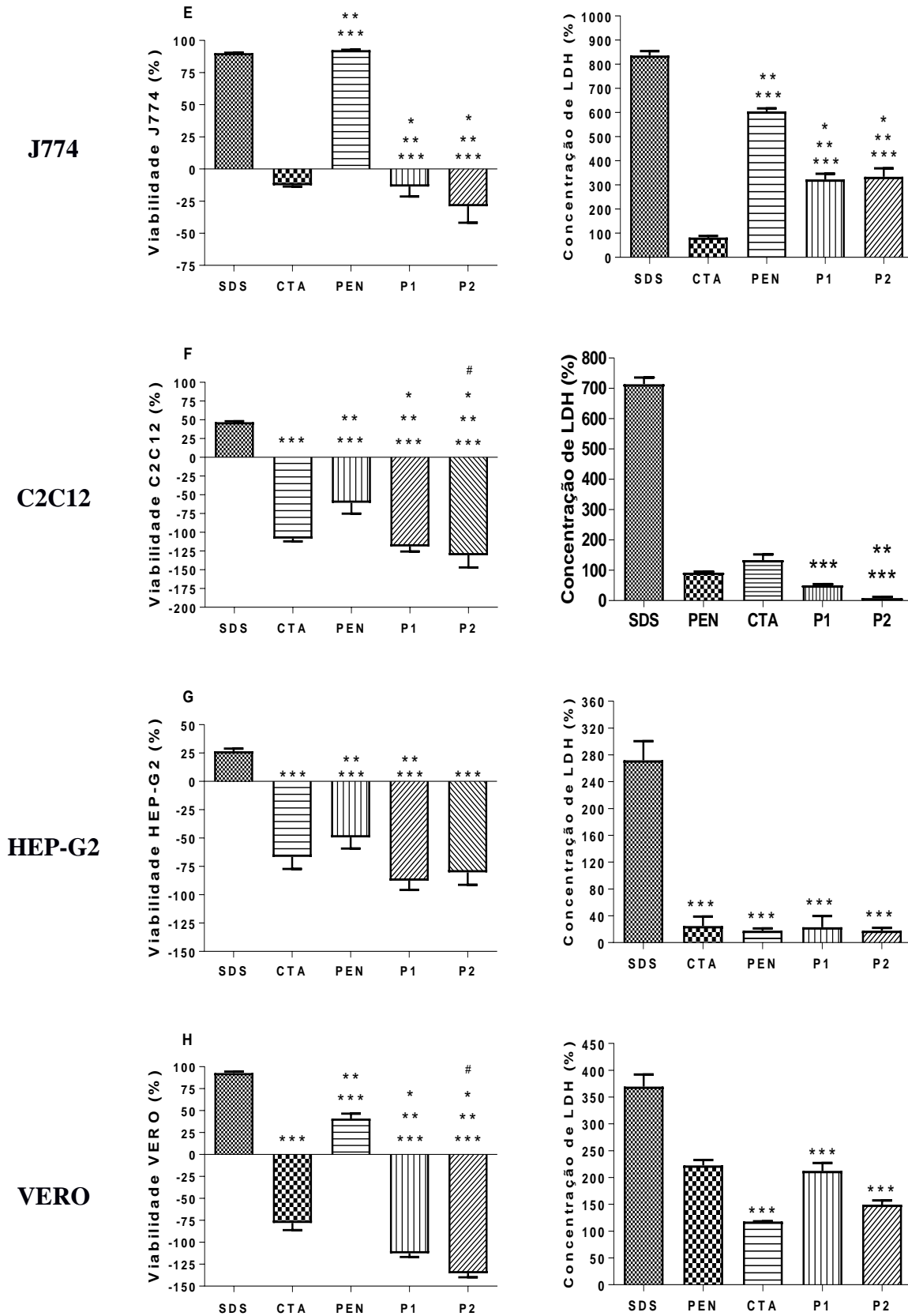


Figura 14: Ensaio de citotoxicidade.

## Glucantime



## Pentamidina



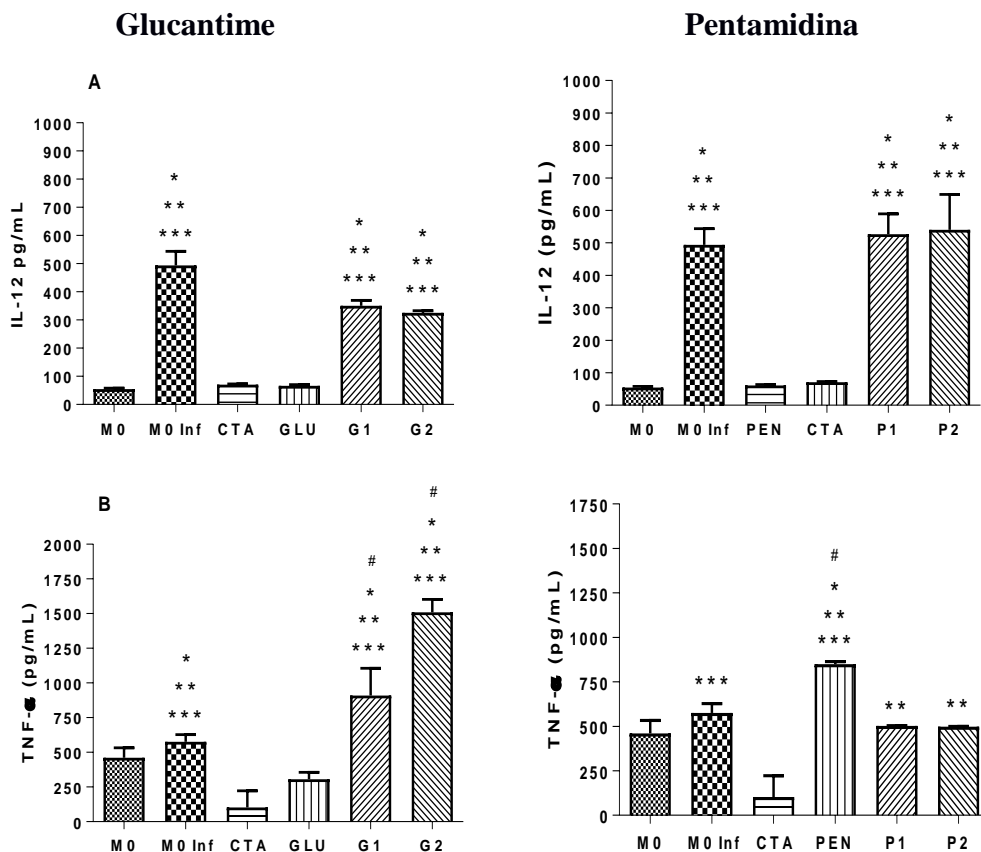
Células (A e E) J774 ( $5 \times 10^5$  células), (B e F) C2C12 ( $4 \times 10^4$  células), (C e G) HEP-G2 ( $5 \times 10^5$  células) e (D e H) VERO ( $5 \times 10^5$  células) foram incubadas por 48h com SDS, CTA (Crotamina 100 $\mu$ g/ml), GLU (Glucantime 300 $\mu$ g/ml), G1 (Glucantime 300 $\mu$ g/ml + Crotamina 100 $\mu$ g/ml), ou G2 (Glucantime 300 $\mu$ g/ml + Crotamina 3,125 $\mu$ g/ml), PEN (Pentamidina 5 $\mu$ g/ml), P1 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/ml + Crotamina 3,125 $\mu$ g/ml), P2 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/ml + Crotamina 100 $\mu$ g/ml). Foi utilizada a ANOVA ONE-WAY seguido de Tukey com significância de

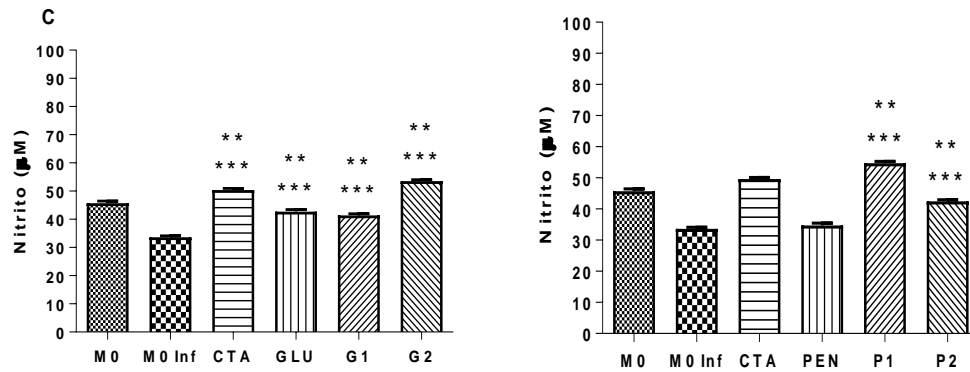
5%. (A) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,0001$  vs CTA e \*) $P < 0,0001$  vs GLU). (B) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS). (C) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,0001$  vs CTA). (D) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,0001$  vs CTA), (E) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,0001$  vs CTA, \*) $P < 0,05$  vs PEN). (F) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,05$  vs CTA, \*) $P < 0,01$  vs PEN, # $P < 0,05$  vs P1). (G) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,05$  vs CTA). (H) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs SDS, \*\*) $P < 0,0001$  vs CTA, \*) $P < 0,0001$  vs PEN, \*) $P < 0,0001$  vs P1).

#### 4.1.3. As formulações G1, G2, P1 e P2 são capazes de modular a produção de IL-12, TNF- $\alpha$ e NO de Macrófagos peritoneais *in vitro*

O GLU não foi capaz de modular IL-12 ou TNF- $\alpha$  ( $P > 0,05$ ) (Fig. 15A e 15B), no entanto, aumentou a produção de NO ( $P < 0,0001$ ) assim como a CTA (Fig. 15C). As formulações G1 e G2 foram eficazes em estimular a produção de IL-12 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15A) e TNF- $\alpha$  ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15B). A CTA, o GLU, G1 e G2 foram igualmente eficientes no estímulo da produção de NO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15C). A PEN não se mostrou capaz de estimular a produção de IL-12 e NO ( $P > 0,05$ ) (Fig. 15D e 15F), contudo, estimulou a produção de IL-12 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15E). P1 e P2 estimularam IL-12 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15D) e NO ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 15F).

Figura 15: Ensaio de quantificação de IL-12, TNF- $\alpha$  e NO *in vitro*.



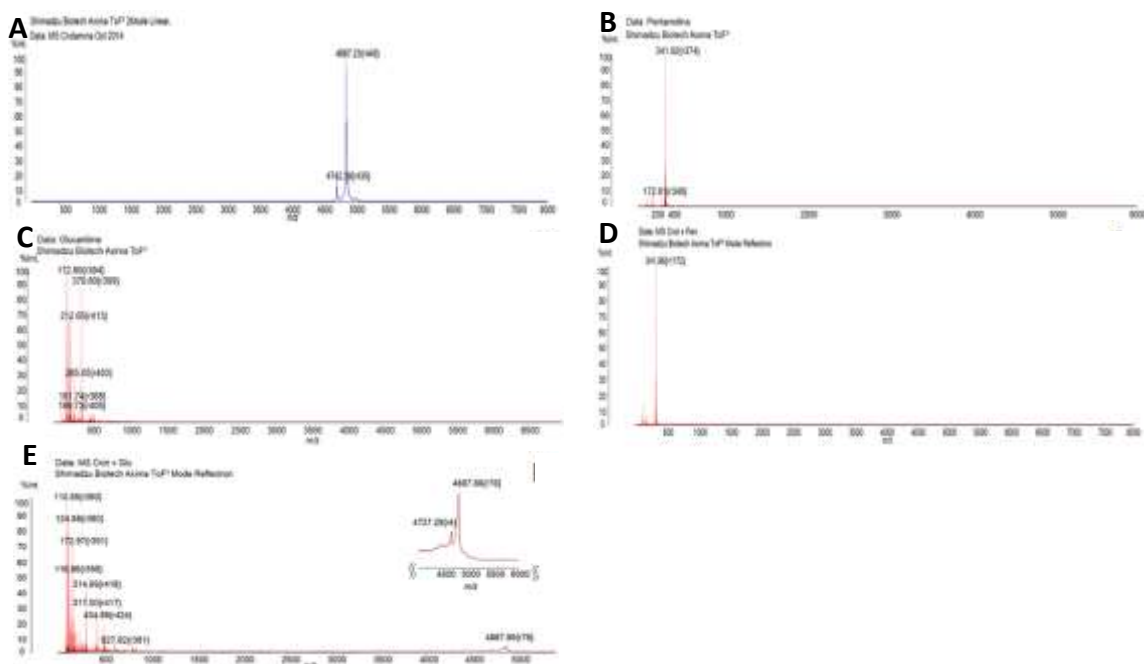


(A) IL-12 e (B) TNF- $\alpha$  de macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^5$  células) após 48h de incubação do controle negativo (M0); macrófagos infectados (M0 Inf), CTA (Crotamina 100 $\mu$ g/mL), GLU (Glucantime 300 $\mu$ g/mL), G1 (Glucantime 300 $\mu$ g/mL + Crotamina 100 $\mu$ g/mL), ou G2 (Glucantime 300 $\mu$ g/mL + Crotamina 3,125 $\mu$ g/mL), PEN (Pentamidina 5 $\mu$ g/mL), P1 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/mL + Crotamina 3,125 $\mu$ g/mL), P2 (Pentamidina 0,05 $\mu$ g/mL + Crotamina 100 $\mu$ g/mL). Utilizou-se a ANOVA ONE-WAY seguido de teste de Tukey com nível de significância de 5%. (A) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs M0, (\*\*) $P < 0,0001$  vs CTA, (\* $P < 0,0001$  vs GLU ou PEN). (B) (\*\*\*) $P < 0,0001$  vs M0, (\*\*) $P < 0,0001$  vs CTA e (\* $P < 0,01$  vs GLU, # $P < 0,01$  vs M0 Inf). (C) (\*\*\*) $P < 0,05$  para M0, (\*\*) $P < 0,01$  para M0 Inf).

#### 4.1.4. Caracterização Molecular da CTA, GLU e PEN por Espectrometria de Massa

A razão massa/carga ( $m/z$ ) da CTA é 4887,23 (Fig. 16A), da PEN é de 341,92 (Fig. 16B) e a razão  $m/z$  dos íons presentes na solução de GLU foi inconclusiva (Fig. 16C). A Solução GLU + CTA (razão 1:1) demonstrou o pico da CTA sem picos que sugiram um novo composto. A razão  $m/z$  da solução PEN + CTA (razão 1:1) evidenciou o pico da PEN, porém, não o da CTA e nem picos de somação de carga embora, para ambos, haja indícios de ligações de hidrogênio.

Figura 16: Espectro de massa da CTA, GLU, PEN e soluções contendo CTA e GLU e CTA e PEN.



Foi utilizada uma solução saturada de ácido Alfa-4-ciano-hidroxicinamico como matriz ionizante homogeneizada com a amostra em uma proporção de 3:1 (v/v) e após a co-cristalização na placa do aparelho, foi introduzida na câmara a vácuo do AXIMA-TOF e analisada em modo reflectron para a CTA e linear para o GLU, PEN e as soluções de CTA + GLU e CTA + PEN, o espectro representa a média dos pulsos a laser. Foi determinada a razão massa/carga ( $m/z$ ) do íon da CTA, da Pentamidina e a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons presentes na solução de Glucantime não pôde ser determinada. O espectro demonstra a razão massa/carga ( $m/z$ ) dos íons presentes na mistura de Crotamina + Glucantime e Crotamina Pentamidina. (A) Espectro de Massa da Crotamina. (B) Espectro de Massa da Pentamidina. (C) Espectro de Massa do Glucantime. (D) Espectro de Massa da solução de Crotamina + Pentamidina. (E) Espectro de Massa da solução de Crotamina + Glucantime.

#### 4.1.5. O Docking, a dinâmica molecular e a Ressonância Plasmônica de Superfície demonstraram que há afinidade molecular dependente de concentração entre a CTA e o Glucantime e a Pentamidina

O Docking sugere um esquema de ligação hidrogênio do GLU (linha tracejada verde) com distâncias em angstroms e interações hidrofóbicas (semicírculos em aminoácidos) (Fig. 17Ax) com indícios de afinidade molecular (energia de ancoragem entre o GLU e a CTA de  $E = -91,64$  kcal / mol) e modelo 3D do GLU representado em bastões e CTA representação da superfície colorido por hidrofobicidade (vermelho é mais hidrofóbico do que o azul) (Fig. 17Az).

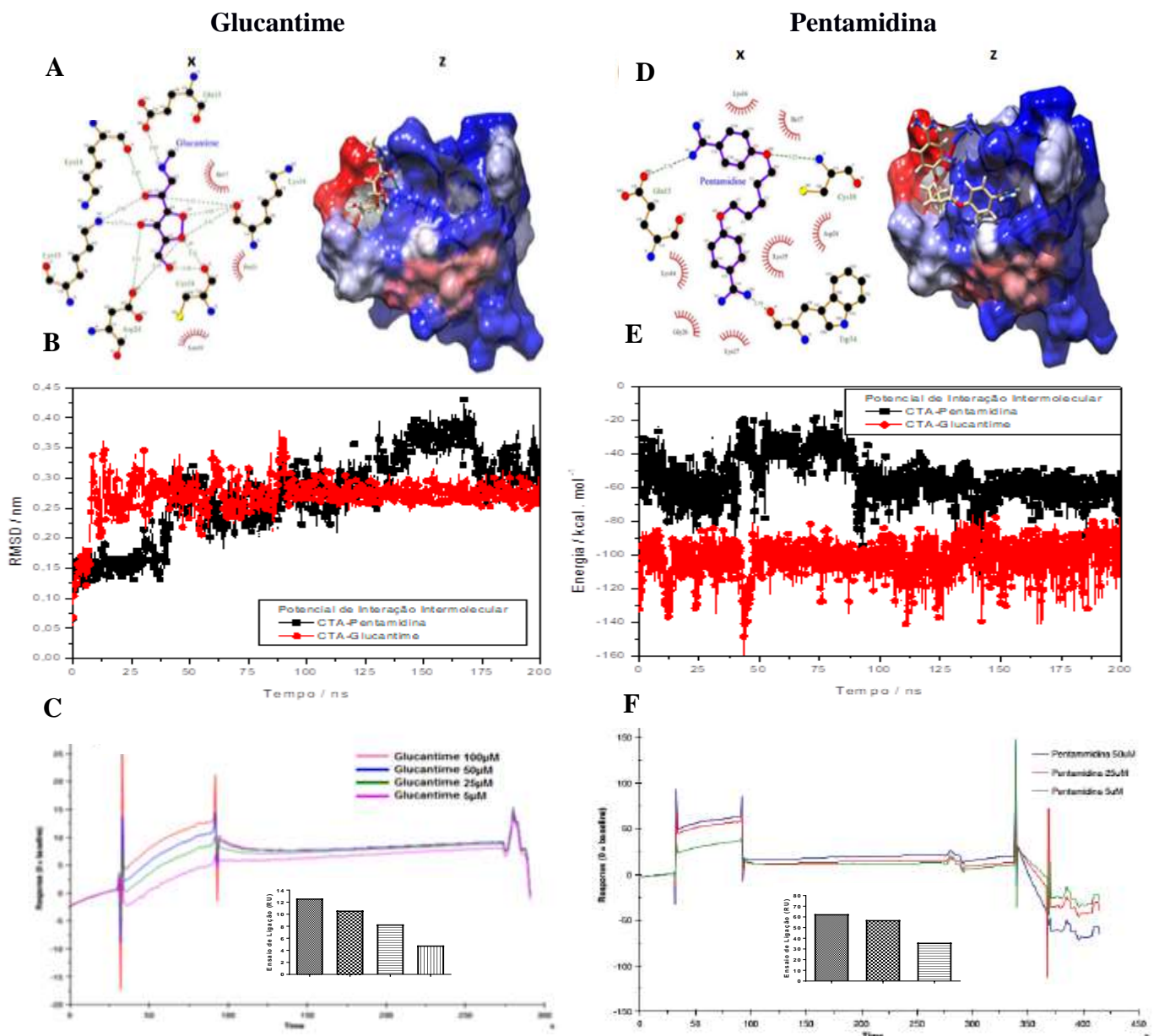
A análise de interação entre GLU e CTA foi realizada nas concentrações de 100, 50, 25 e 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 17C). A interação atinge cerca de 50% do valor de  $R_{\text{max}}$  calculado para esta interação sugerindo afinidade entre as moléculas e corroborando o Docking (Fig. 17C) com perfil dependente da concentração. O esquema de ligação de pontes de hidrogênio da PEN (linha tracejada verde) com distâncias em angstroms e interações hidrofóbicas (semicírculos em aminoácidos) (Fig. 17Bx com indícios de afinidade molecular (energia de ancoragem entre a PEN e a CTA de  $E = -96,74$  K cal/mol) e modelo 3D da PEN representado em bastões e CTA representação da superfície colorido por hidrofobicidade (vermelho é mais hidrofóbico do que o azul) (Fig. 17Dz). A análise de interação entre a PEN e a CTA foi realizada nas concentrações de 50, 25 e 5  $\mu\text{M}$  (Fig 17F).

A interação atinge cerca de 60% do valor de  $R_{\text{máx}}$  calculado para essa interação sugerindo afinidade entre as moléculas corroborando o Docking (Fig. 17F). A partir do equilíbrio estrutural da crotamina em água ( $\sim 10$  ns) o RMSD médio foi de  $0,28 \pm 0,03$  nm até 105 ns e após esse momento  $0,27 \pm 0,01$  nm até o final da DM (Fig. 17E). Destaca-se que o desvio reduziu após 105 ns inferindo menor mudança estrutural da CTA após 105 ns.

A figura 6B mostra no perfil de IIP da interação entre GLU e água que em 105 ns ocorre uma redução de energia média de  $-34,8 \pm 11,0$  a  $-76,3 \pm 11,1$  Kcal.mol<sup>-1</sup>. No caso da interação entre CTA-GLU não ocorrer grandes modificações na energia no mesmo período ( $-103,4 \pm 9,2$  a  $-101,5 \pm 10,5$  Kcal.mol<sup>-1</sup>). O IIP CTA-GLU na DM está ligeiramente abaixo do que foi

calculado por docking molecular ( $-91,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ ). Portanto, a partir de 105 ns GLU passa interagir mais atrativamente com a água e deixa o sitio de atracamento da CTA e nesse momento ocorre maior estabilidade na estrutura de CTA. Os resultados de DM sugerem que a afinidade entre GLU e CTA é dependente do atracamento entre eles, minimizando o contato com a água que pode deslocar a GLU para o bulk. A figura 17B. Perfil de IIP entre CTA e GLU e água com GLU dentro de um raio de 0.13 nm.

**Figura 17: Simulação de interação molecular por Docking, Dinâmica molecular e Ressonância Plasmônica de superfície.**



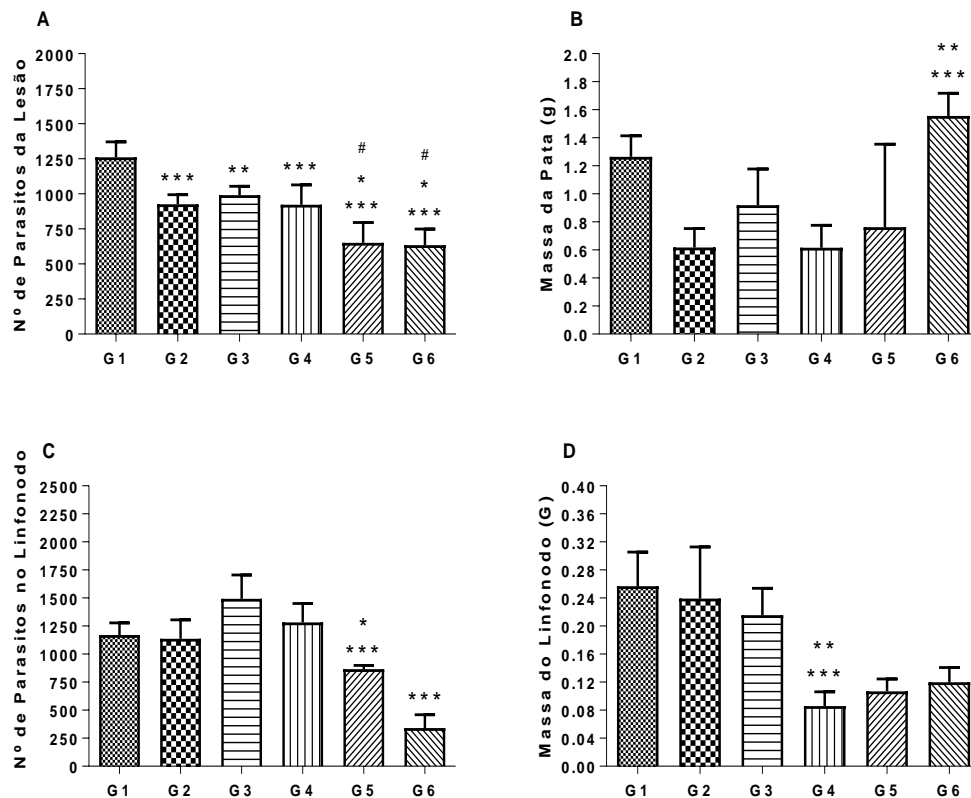
A imagem 6Ax mostra o layout de ligação de hidrogênio da GLU, 6Dx da PEN, 6Az modelo 3D de GLU (representação em bastões) e CTA (representação de superfície) e 6Dz da PEN. (B) Demonstração do sensorgrama de interação molecular da diluição 1: 100 (v / v) do soro de lama imunizado com CTA total. A análise de interação apresentou cerca de 1200 RU de resposta confirmando a presença de CTA sob a superfície do chip do sensor. (E) GLU, (F) solução de GLU com CTA (G) RMSD para CTA interagindo com GLU, considerando a sobreposição e desvio de átomos de C a partir de estruturas coletadas durante 200 ns de MD e a estrutura na primeira configuração (Material Suplementar).

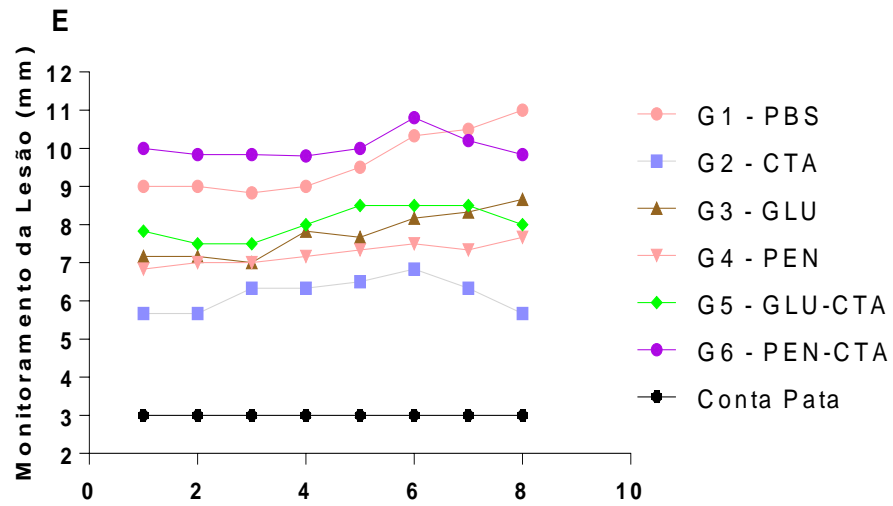
## 4.2 Ensaios *in vivo*

### 4.2.1. As formulações G1, G2, P1 e P2 foram mais eficazes na diminuição da carga parasitária da lesão da pata e do linfonodo do animal

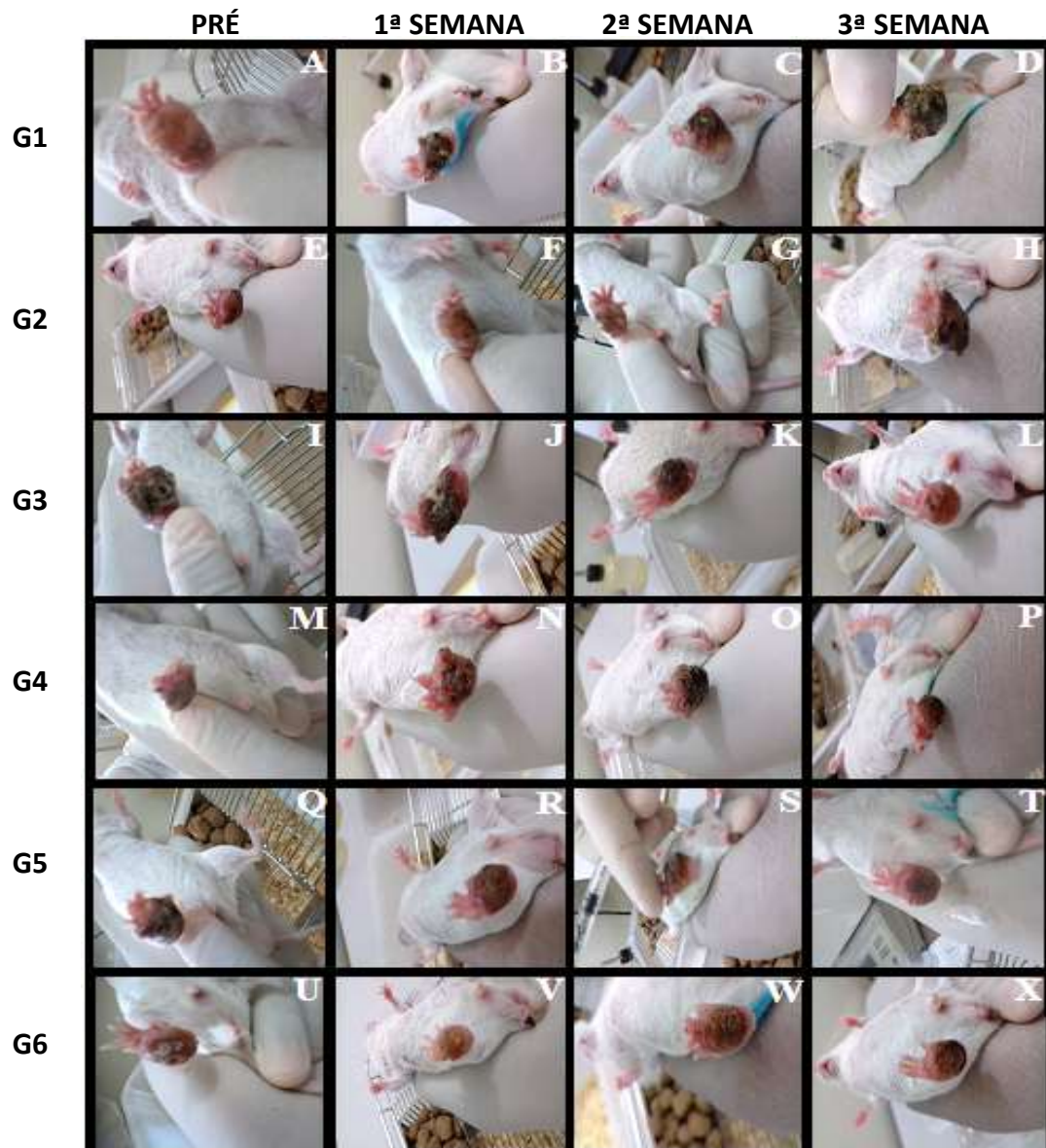
Os grupos G5 e G6 (formulação GLU + CTA e PEN + CTA respectivamente) apresentaram redução na contagem de parasitos no tecido da pata e no linfonodo da pata infectada ( $P < 0,05$  e  $0,0001$  respectivamente) (Fig. 18A e 18C) mais que os grupos G3 e G4 (GLU e PEN respectivamente) embora a massa e tamanho da lesão da pata infectada e massa do linfonodo não tenham diminuído no G1, G2, G3, G5 e G6 ( $P > 0,05$ ) (Fig. 18B, 18D, 18E e 18F). O tratamento com CTA (G2) reduziu o tamanho da lesão e a massa da pata ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 18E e 18B) sem diminuir a contagem de parasitos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 18A e 18C). Os grupos G1 e G3 apresentaram crescimento do tamanho da lesão ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 18E) e, ao fim do experimento demonstraram maior massa e volume médio da pata infectada se comparada com o grupo tratado com a formulação contendo G5 e G6 ( $P < 0,05$ ) (Fig. 18E e 18B) sem diminuir o número de parasitos na lesão, massa da pata, contagem de parasitos no linfonodo assim como a massa desse órgão ( $P > 0,05$ ) (Fig. 18A, 18B, 18C e 18D).

Figura 18: Tratamento *in vivo* da leishmaniose experimental.





**F**



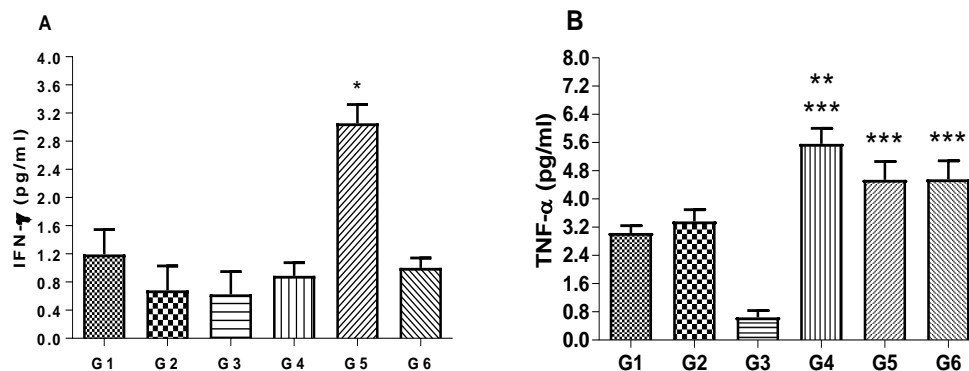


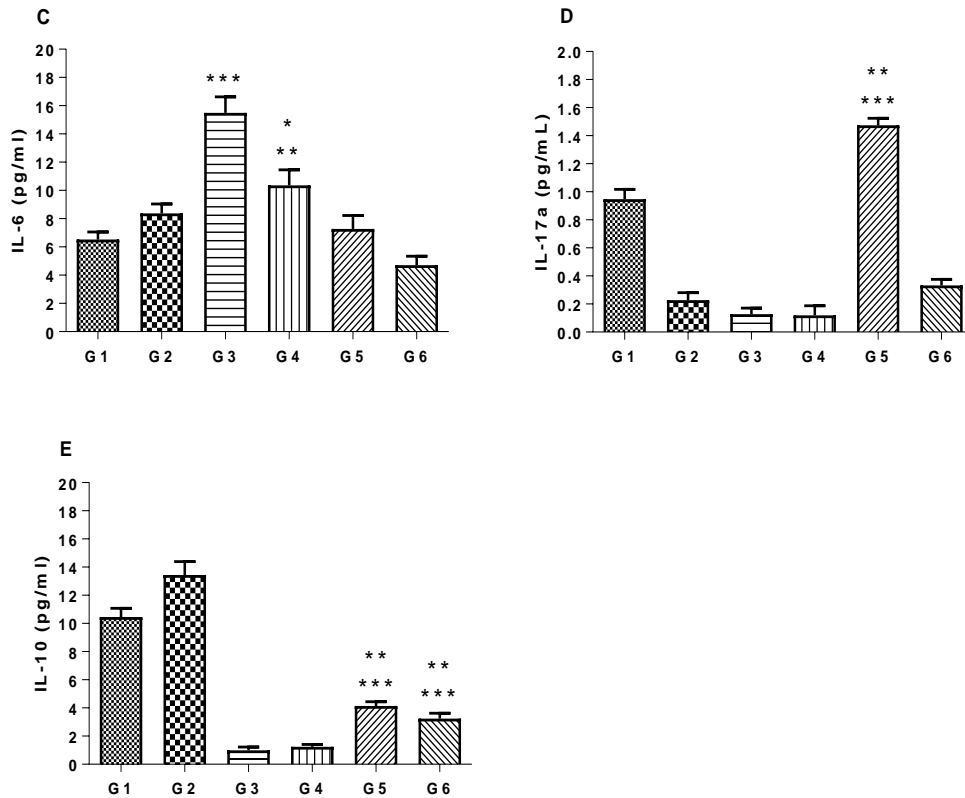
Foi feita infecção com *L. amazonensis* ( $1 \times 10^5$ ) e após três semanas de infecção o tratamento foi iniciado. Os animais foram tratados por via intraperitoneal, por 21 dias com G1 (PBS 2%), G2 (CTA  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G3 GLU ( $300 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G4 (PEN  $4 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G5 (GLU  $300 \text{ mg/kg}^{-1}$  + CTA  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) e G6 (PEN  $4 \text{ mg/kg}^{-1}$  + CTA  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). A contagem de parasitos, após cultivo de cinco dias para transformação dos parasitos em formas promastigotas ocorreu em câmara de Neubauer cinco dias após a eutanásia. O número de parasitos foi dividido pela média da massa do tecido do grupo. **(A)** carga parasitária no tecido da pata infectada. **(B)** massa da pata após amputação cirúrgica na articulação imediatamente acima da lesão **(C)** contagem de parasitos no linfonodo da pata infectada. **(D)** massa do linfonodo do animal após eutanásia. **(E)** evolução do tamanho da lesão a cada dia de tratamento. **(F)** imagens representativas da evolução da lesão. Para se determinar as diferenças no tamanho da lesão, massa da pata e massa do linfonodo dos animais foi utilizada a análise de variância ANOVA ONE-WAY com teste posterior de Tukey e significância de 5%. Para se determinar as diferenças na contagem de parasitos no tecido da lesão e no linfonodo utilizou-se a análise de variância KRUSKAL-WALLIS e teste posterior de DUNN com significância de 5%. **(A)** ( $***P < 0,0001$  vs G1,  $**P < 0,01$  vs G1,  $*P < 0,0001$  vs G2 e  $\#P < 0,0001$  vs G3 e G4). **(B)** ( $***P < 0,05$  vs G2 e  $**P < 0,05$  vs G4). **(C)** ( $***P < 0,0001$  vs G1, G2, G3, G4 e G5,  $**P < 0,05$  vs G1 e G2,  $*P < 0,01$  vs G3 e G4). **(D)** ( $***P < 0,0001$  vs G1, G2 e G3  $**P < 0,05$  vs G6). **(F)** imagens representativas da evolução das lesões. **G1** imagens de A a D; **G2** imagens de E a H; **G3** imagens de I a L; **G4** imagens de M a P; **G5** imagens de Q a T **G6** imagens de U a X.

#### 4.2.1 A associação do CTA com GLU ou com PEN estimulam respostas imunológicas favoráveis ao controle do parasito.

O grupo G5 foi capaz de aumentar a produção de IFN- $\gamma$  se comparado a todos os outros tratamentos ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19A). Os grupos G4, G5 e G6 foram capazes de produzir mais TNF- $\alpha$  ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19B). Os grupos G4 produziu mais IL-6 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19B), G5 e G6 produziram mais IL-17A ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19D). O grupo G3 produziu mais IL-6 se comparado a todos os outros tratamentos ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19C). Os grupos G1 e G2 tiveram um aumento esperado na produção de IL-10, porém, os G3, G4, G5 e G6 foram capazes de inibir a produção de IL-10 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 19E).

Figura 19: Resposta imunológica *in vivo* aos tratamentos.

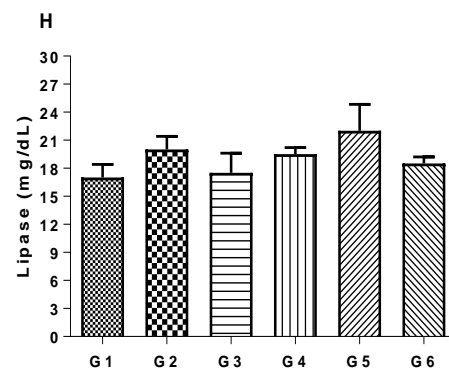
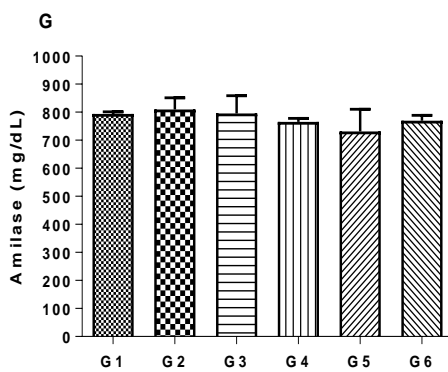
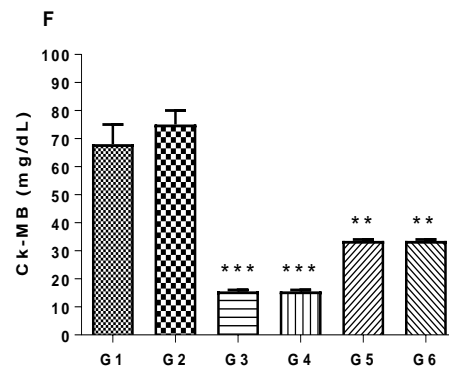
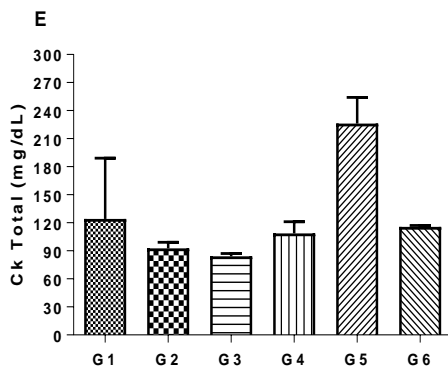
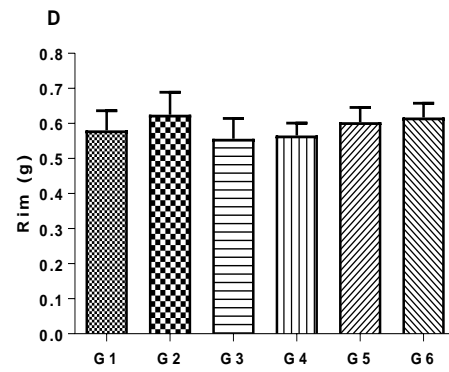
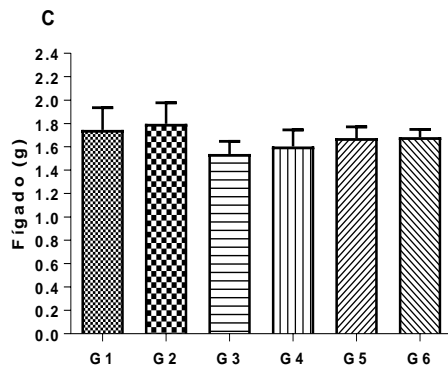
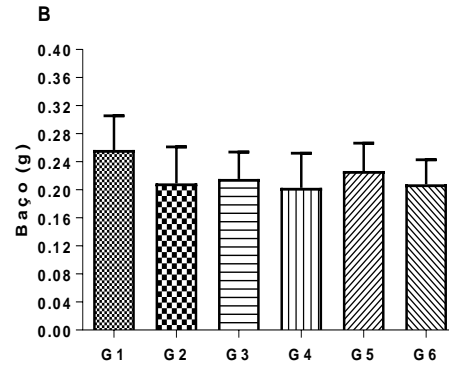
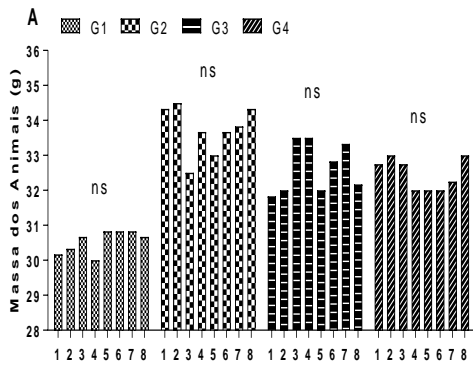


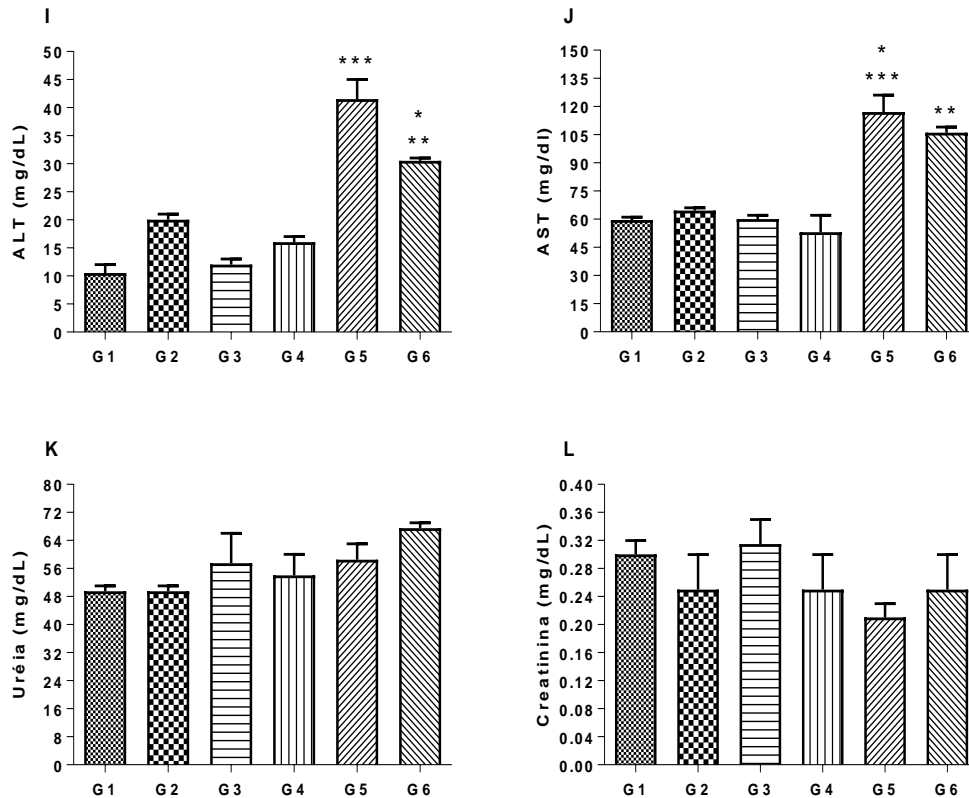


Foi feita infecção com *L. amazonensis* ( $1 \times 10^5$ ) e após três semanas de infecção o tratamento foi iniciado. Os animais foram tratados por via intraperitoneal por 21 dias G1 (PBS 2%), G2 (CTA  $5 \text{mg/kg}^{-1}$ ), G3 GLU ( $300 \text{mg/kg}^{-1}$ ), G4 (PEN  $4 \text{mg/kg}^{-1}$ ), G5 GLU ( $300 \text{mg/kg}^{-1}$ ) + CTA ( $5 \text{mg/kg}^{-1}$ ) e G6 PEN (PEN  $4 \text{mg/kg}^{-1}$ ) + CTA ( $5 \text{mg/kg}^{-1}$ ). (A) Produção de interferon Gama (IFN- $\gamma$ ). (B) Produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). (C) Produção de interleucina 6 (IL-6). (D) Produção de Interleucina 17 a (IL-17a). (E) produção de interleucina 10 (IL-10). Utilizou-se a análise de variância ANOVA ONE-WAY com teste posterior de Tukey com significância de 5%. (A) ( $*P < 0,0001$  vs G1, G2, G3, G4 e G6). (B) ( $***P < 0,0001$  vs G1, G2, G3,  $**P < 0,05$  vs G5 e G6). (C) ( $***P < 0,0001$  vs G1, G2, G5 e G6,  $**P < 0,01$  vs G6 e  $*P < 0,05$  vs G1) e (D) ( $***P < 0,0001$  vs G2, G3, G4 e G6,  $*P < 0,01$  vs G1). (E) ( $***P < 0,0001$  vs G1 e G2 e  $**P < 0,05$  vs G3 e G4).

#### 4.2.2 A associação do GLU ou PEN com CTA não aumenta a citotoxicidade *in vivo*.

Foi observado que a massa total dos animais não sofreu alteração do início ao fim do tratamento ( $P > 0,05$ ) (Fig. 20A). A massa do baço, baço, fígado e rins não sofreram alterações evidenciando que não houve megalias ( $P > 0,05$ ) (Fig. 20B). A enzima CK MB mostrou-se menor no G3 e G4 se comparados com G1 ( $P < 0,05$ ) e G2 ( $P < 0,01$ ) (Fig. 20B). As enzimas amilase e lipase não sofreram alteração ( $P > 0,05$ ) (Fig. 20C). A enzima ALT exibiu maior perfil no G3 comparado com G1 e G2 ( $P < 0,01$ ) e G4 se comparado com G1, G2 e G3 ( $P < 0,0001$ ). O G4 exibiu maior concentração de AST que G1, G2 e G3 ( $P < 0,0001$ ) (Fig. 20D). As enzimas uréia e creatinina não apresentaram diferença entre os grupos ( $P > 0,05$ ) (Fig. 20E).





**Figura 20: Massa corporal e dos órgãos dos animais.** Foi feita infecção com *L. amazonensis* ( $1 \times 10^5$ ) e após três semanas de infecção o tratamento foi iniciado. Os animais foram tratados por via intraperitoneal por 21 dias G1 (PBS 2%), G2 (CTA  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G3 GLU ( $300 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G4 PEN ( $4 \text{ mg/kg}^{-1}$ ), G5 GLU ( $300 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) + CTA ( $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) e G6 PEN ( $4 \text{ mg/kg}^{-1}$ ) + CTA ( $5 \text{ mg/kg}^{-1}$ ). (A) massa corporal dos animais ao longo do tratamento. (B) massa do baço após eutanásia. (C) massa do fígado após eutanásia. (D) massa dos rins após eutanásia. (E) concentração sanguínea de Ck-Total. (F) concentração sanguínea de Ck-Mb. (G) concentração sanguínea de amilase. (H) concentração sanguínea de lipase. (I) concentração sanguínea de de alanina amino transferase (ALT). (J) concentração sanguínea de aspartato amino transferase (AST). (K) concentração sanguínea de uréia. (L) concentração sanguínea de creatinina. Para se determinar as diferenças na massa total dos animais, Ck-Total, Ck-MB, Amilase, Lipase, ALT, AST, Uréia e Creatinina foi utilizado KRUSKAL-WALLIS e teste posterior de DUNN com significância de 5%. Para se determinar as diferenças na massa do baço, rins e fígado dos animais ao fim do tratamento foi utilizado a análise de variância ANOVA ONE-WAY com teste posterior de Tukey com significância de 5%. (A, B, C, D, E, G, H, K e L não apresentaram diferença) (E) ( $***P < 0,0001$  vs G1 e G2;  $**P < 0,01$  vs G3 e G4) (F) ( $***P < 0,0001$  vs G1 e G2 e  $**P < 0,01$  vs G3 e G4). (I) ( $***P < 0,0001$  vs G1, G3 e G4,  $**P < 0,01$  vs G1, G3 e G4 e  $*P < 0,05$  vs G2 e G5). (J) ( $***P < 0,0001$  vs G1, G4, G5,  $**P < 0,01$  vs G1, G2, G3 e G4,  $*P < 0,01$  vs G2).

## 5 DISCUSSÃO

Os tratamentos disponíveis para as Leishmanioses apresentam efetividade cada vez menor. Esse fato é devido ao parasito apresentar resistência à primeira linha de tratamento, os antimoniais pentavalentes, que pode chegar a 65% de falha terapêutica e fortes efeitos colaterais. A segunda linha de tratamento, a Anfotericina B lipossomal (Ambissome), possui um custo elevado dificultando a sua utilização na principal população acometida pela doença que se encontra prioritariamente em países pobres ou paupérrimos (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013a). Outro importante fármaco de segunda escolha é a Pentamidina, que apresenta efeitos adversos ainda mais graves que o Glucantime ou a Anfotericina B, dificultando a sua utilização por necessitar de forte acompanhamento em razão da sua toxicidade ao paciente, embora, esse fármaco exiba potente atividade leishmanicida (KOTTHAUS et al., 2011; ARINO et al., 2012; CORRAL et al., 2014).

Os referidos tratamentos podem ser tópicos ou sistêmicos e a tomada de decisão para a escolha é baseada na espécie de *Leishmania* envolvida na infecção, região geográfica e apresentação clínica dos sintomas (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013a).

Contudo, nos últimos anos, tratamentos com a associação de moléculas à fármacos clássicos ou associando mais de um fármaco veem sendo explorados como alternativas a essa problemática. No presente trabalho, foi avaliado a associação de dois fármacos empregadas no tratamento da Leishmaniose com a CTA purificada da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*.

Para se determinar a eficácia e citotoxicidade dessa associação ensaios *in vitro*, *in sílico* e *in vivo* foram realizados com a N-metil-glucamina, fármaco de primeira escolha, e Pentamidina, fármaco de segunda escolha, onde ambas apresentam muitas inadequações acerca da sua eficácia e efeitos colaterais que chegam a inviabilizar a sua utilização de maneira segura em alguns casos (CORRAL et al., 2014).

O Glucantime<sup>®</sup>, mesmo sendo o fármaco de primeira escolha, apresenta incidência de efeitos colaterais graves em aproximadamente 25% dos pacientes. Os parasitos também vêm demonstrando aumento considerável da sua resistência com falhas terapêuticas chegando à taxas de 40 a 65%, fato que representa um desafio crescente na descoberta de novas alternativas ao tratamento da Leishmaniose (LAWN et al., 2006; MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010).

Aquo, o GLU, quando administrado sozinho, mostrou-se ineficiente em inibir o crescimento de promastigotas, ao contrário, G1 e G2 inibiram eficazmente o crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* (Fig. 13A). Fato semelhante aconteceu na inibição das

amastigotas de macrófagos. O GLU sozinho não foi capaz de inibir o crescimento do parasito, porém, G1 e G2 demonstram a capacidade de inibir o crescimento das amastigotas de *L. amazonensis* em células infectadas (Fig. 13B).

Diferentes autores relataram que há um aumento de até três vezes na liberação das enzimas hepáticas em tratamentos com antimoniais pentavalentes (LAWN et al., 2006; MATOUSSI et al., 2007; KATO et al., 2014) e aqui as células hepatócitos de linhagem HEP-G2 foram conservadas após incubação com combinações contendo GLU associado à CTA. Ainda, Ikeda-Garcia et al., (2007) observaram que a ALT e a AST estavam aumentados em cachorros após 30 dias de tratamento com doses de  $75\text{mg.kg}^{-1}$ , porém com ausência de sinais clínicos, fato não observado nos experimentos *in vivo* aqui realizados mesmo com uma concentração 4x maior de fármaco.

A associação com a CTA também foi capaz de diminuir a citotoxicidade desse fármaco em células J774 (Figura 14A) quando comparado com o Glucantime<sup>®</sup> somente. Com relação à citotoxicidade em células C2C12 e HEP-G2 o Glucantime<sup>®</sup>, assim como as combinações com esse fármaco não se mostraram tóxicas (Figura 14B e 14C), embora as combinações tenham permitido maior proliferação celular de células HEP-G2 do que a CTA sugerindo melhor tolerabilidade, sendo que os resultados sobre células HEP-G2 são especialmente importantes por representarem o tecido mais ativo no metabolismo do Glucantime<sup>®</sup>.

Outro fato importante é que o tratamento dos animais com essa associação não provocou hepatomegalia, esplenomegalia, ou nefromegalia, corroborando os dados referentes aos ensaios de citotoxicidade *in vitro* e a avaliação da toxicidade e tolerabilidade *in vivo*, demonstra ser um tratamento tolerável e que apresenta toxicidade dentro de níveis toleráveis pelo animal.

Esses dados em conjunto sugerem toxicidade moderada para o fígado dos tratamentos aqui propostos. O mesmo efeito ficou evidente em células C2C12 e VERO que são importantes tecidos envolvidos tanto na metabolização dos fármacos, ou são afetados pela CTA, de maneira que sugere segurança adequada à combinação farmacológica aqui descrita.

Com relação às reações imunológicas celulares *in vitro*, a produção de NO dos macrófagos murinos demonstra uma modulação da resposta à infecção por *L. amazonensis*, de maneira que a formulação G2 foi capaz de acentuar a modulação da produção de NO (Fig. 4C). Estes dados corroboram a literatura que apontam uma associação positiva da produção de NO com o controle da leishmaniose como aqui evidenciado ajudando a explicar a inibição das amastigotas observadas para a formulação G2.

O fato de uma relação entre NO e inibição de amastigotas pela formulação G2 pode ser explicado pela diminuição da citotoxicidade e diminuição da carga parasitária intracelular que leva a supor que a inibição do parasito intracelular pode contribuir para uma menor ativação

dos mecanismos de escape do parasito e, conseqüentemente permitindo à célula a ativar os seus mecanismos microbicidas com mais efetividade e conseqüente inibição do parasito intracelular.

Em relação a IL-12, o tratamento com GLU não foi capaz de modular esta citocina, no entanto, as formulações G1 e G2 estimularam aumento da expressão de IL-12 (Fig. 15A) concomitantemente à inibição do parasito. Esse dado reforça o fato que, de alguma maneira, há uma relação entre a carga parasitária e a produção dos mecanismos microbicidas celulares, como a produção de IL-12, que de maneira global, vai sinalizar para uma resposta do tipo Th1, que relacionada à ativação de IFN- $\gamma$ , vão contribuir para o controle da leishmaniose (PETERSEN et al., 2012).

Outro fato que direciona a suposição que há uma relação inversa entre a carga parasitária intracelular e a ativação de mecanismos imunológicos de controle da doença é a produção de TNF- $\alpha$  que ficou evidente para as formulações com G1 e G2. Esses tratamentos foram capazes de estimular potentemente a produção desta citocina, em especial G2 que estimulou uma produção de cerca de 2,6 vezes mais TNF- $\alpha$  que o controle (M0 infectado), demonstrando que esses tratamentos podem aumentar a resposta celular para a infecção por *L. amazonensis*.

É importante ressaltar que parece haver uma importante relação entre a inibição do parasito intracelular e a ativação de .

O aumento da IL-12 bem como da TNF- $\alpha$  são importantes resultados, visto que a essas duas citocinas estão associadas com o controle da doença e eliminação do parasito intracelular (PETERSEN et al., 2012; COSTA et al., 2013; HEZARJARIBI et al., 2014; CARVALHO-GONTIJO et al., 2015a; LAKHAL-NAOUAR et al., 2015; MACEDO et al., 2015a; REGULATÓRIOS et al., 2015).

Após tratamento, os grupos G5 e G6 não diminuíram o volume e massa da pata dos animais durante o decorrer do tratamento (Fig. 18B e 18E) e ilustrado nas imagens da figura 7 (G5 e G6 de Q-T), contudo, a a carga parasitária no tecido da pata e do linfonodo apresentou importante diminuição sugerindo maior eficácia do tratamento (Fig. 18A e 18C). Em uma primeira análise, esse fato parece controverso em razão de boa parte da literatura associar uma menor parasitemia com diminuição da lesão como em Petersen et al., (2012) descrevem em seu trabalho que o tamanho da lesão pode apresentar relação com o n° de parasitos, corroborado por (BARROS et al., 2016). Macedo et al., (2015) demonstraram que ao inibir farmacologicamente o fator de transcrição NF-kB, no tecido da pata infectada houve diminuição da parasitemia e concomitante diminuição do tamanho da lesão, mas, por outro lado, a inibição do NF-kB e, conseqüentemente, também da citocina TNF- $\alpha$  permitiu a migração de parasitos para os linfonodos, descrevendo mais uma vez a importância dos níveis de TNF- $\alpha$  no controle sistêmico e local da infecção. Contudo, embora a maior parte da literatura

demonstre que uma diminuição do volume da pata e tamanho da lesão estão associados a um menor número de parasitos no tecido afetado, já foi demonstrado que a diminuição do número de parasitos pode acontecer sem que haja uma esperada regressão da lesão corroborando os resultados aqui encontrados (PATRÍCIO et al., 2008).

Os experimentos *in vivo* com a combinação contendo GLU não apresento toxicidade elevada, fato desejável para uma futura utilização em animais maiores e até *in human*, O tratamento do grupo G5 não demonstrou diminuição da massa dos animais, fato que demonstra boa tolerabilidade ao tratamento (Fig. 20A).

Em relação à massa dos órgãos dos animais, a combinação com GLU não exibiu megalias, indicando não haver toxicidade subaguda sobre os órgãos investigados (Fig. 20B–D) embora a expressão de proteínas hepáticas ALT e AST (Fig. 20I e 20J) tenha sofrido aumento, sem, no entanto, caracterizar-se como hepatotoxicidade uma vez que a variação ficou dentro dos níveis fisiológicos dos animais, efeitos até certo ponto esperado para o tratamento com a N-metil glucamina (BERMAN, 2005). No entanto, outros autores demonstraram aumento em marcadores renais ou cardíacos (HENAO et al., 2004, FEDERAL et al., 2012) fato não observado aqui (Fig. 20K, 20L 20E e 20F respectivamente).

Foi envesgada a afinidade entre o GLU e CTA, por meio de *Docking e Dinâmica Molecular*. Essas duas moléculas demonstram vários sítios de interação e possíveis formações de ligações de hidrogênio com baixa energia entre as moléculas estudadas (Fig. 17A), Esses dados, em conjunto com os dado da dinâmica molecular, sugerem moderada afinidade (Fig. 17B). Essas análises *in silico* foram corroborado pela SPR (Fig. 17C). Os resultados da bioinformática e SPR em conjunto são importantes na medida em que sugerem que a formulação estabelecida entre a CTA e GLU possuem ação sinérgica corroborada pelos resultados biológicos aqui demonstrados semelhantemente ao que foi observado para a PEN. Quanto à afinidade molecular entre a PEN e a CTA, a simulação de bioinformática por meio de *Docking e dinâmica molecular*, sugerem que para a interação entre a CTA e PEN há a necessidade de baixa energia para ancoragem (Fig. 17D e 17E). Esses resultados a exemplo do que aconteceu com a GLU, foram corroborados pelo ensaio de afinidade conduzido pela SPR (Fig. 17F) que sugeriu afinidade moderada comprovando ligações do fármaco ao chip funcionalizado com CTA. Quando tomados em conjunto, esses resultados sugerem afinidade entre as moléculas ajudando a explicar sinergia aqui evidenciada entre a GLU e CTA, PEN e CTA tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

A Pentamidina, é um potente microbicida que vem sendo empregado no tratamento de diferentes doenças, inclusive a leishmaniose (HU et al., 2015; SEGUEL et al., 2016), contudo, da mesma maneira que os antimoniais pentavalente apresentam consideráveis inadequações,



esse fármaco, apresenta toxicidade mais elevada se comparada com o Glucantime ou a Anfotericina B lipossomal inspirando ainda mais cuidados quando a indicação desse tratamento, especialmente em crianças e idosos uma vez que o metabolismo da glicose e as funções cardíacas podem ser profundamente afetadas (ASSAN et al., 1995; ANTONIOU; GOUGH, 2005; ARINO et al., 2012; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013b).

No presente estudo, as combinações P1 e P2 sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* mantiveram a eficácia do fármaco sozinho mesmo em uma concentração cem vezes (100x) menor (0,05 µg/ml) que a maior concentração (5 µg/ml) utilizada no neste trabalho (Fig. 13C). As formulações P1 e P2 mantiveram eficácia sobre as formas amastigotas mesmo com uma concentração cem vezes menor que a utilizada na PEN (Fig. 13D). Esses dados podem indicar que a CTA aumenta a eficácia do fármaco e, pode-se especular que uma concentração 100x menor poderá produzir menores efeitos colaterais associados ao tratamento .

Por outro lado, um dado interessante, demonstra que a associação da PEN à CTA foi capaz de reduzir drasticamente os efeitos citotóxicos da PEN sobre as células de linhagem J774 (Figura 14E) assim como não demonstrou toxicidade contra células C2C12, HEP-G2 e VERO (Figuras 14C, 14D e 14E), mesmo considerando-se o fato da Pentamidina apresentar das mais altas toxicidades entre os fármacos empregadas no tratamento da Leishmaniose (ASSAN et al., 1995; ANTONIOU; GOUGH, 2005; ARINO et al., 2012; MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013b).

Mesmo ao se considerar o fato desse fármaco representar a segunda linha para o tratamento da leishmaniose na maioria dos países onde essa doença é endêmica, os dados acerca da citotoxicidade tornam-se particularmente importantes, uma vez que a dose e frequência do tratamento podem aumentar a incidência e gravidade dos efeitos colaterais do tratamento com a Pentamidina, devendo-se considerar cuidadosamente a seleção dessa abordagem terapêutica para garantir adequada segurança ao doente e, ao mesmo tempo, assegurar eficácia na cura dessa doença (WANG, 2010).

Outro fato que chama atenção é em relação à resposta imune celular aos tratamentos formulados com PEN. De fato a associação da PEN à CTA demonstrou ser satisfatória em produzir uma resposta imune intracelular, visto que houve produção de IL-12, a qual sinaliza para um direcionamento de respostas imunológicas globais do tipo Th1, que, por sua vez, está relacionada com o controle da infecção que costumeiramente são amortecidos pelos mecanismos de evasão do parasito (PETERSEN et al., 2012; GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013) (Fig. 15A), contudo, não houve aumento na produção de TNF- $\alpha$ , o que seria o esperado para auxílio no controle da carga parasitária (Fig. 15C).

O aumento da IL-12 é importante em razão dessa citocina ser implicada com o controle da infecção, uma vez que estudos demonstram que quando IL-12 não é produzida por macrófagos em resposta à infecção a doença aumenta de proporção tornando-se mais grave (MACEDO, 2015; BARROS, 2015; LAKHAL-NAOUAR, 2015; CARVALHO, 2015; HEZARJARIB, 2014; MARTINS, 2013 e PETERSEN, 2012). No entanto, é esperado que também haja o aumento da produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina que vem sendo descrita como uma relacionada com uma resposta inflamatória no local da infecção controlando o parasito na lesão e no linfonodo (LAKHAL-NAOUAR, 2015; CARVALHO, 2015; HEZARJARIB, 2014; MARTINS, 2013 e PETERSEN, 2012).

No contexto das respostas imunológicas e inflamatórias envolvidas no controle do parasito e da doença, os tratamentos P1 e P2 se mostraram significativamente mais capazes de estimular a produção de NO que PEN (Fig. 15C), sugerindo uma modulação da resposta celular para a produção de NO. Esses dados corroboram a literatura que vem associando o aumento da produção de NO ao controle da doença (LAKHAL-NAOUAR, 2015; CARVALHO, 2015; HEZARJARIB, 2014; PETERSEN, 2012).

A resposta do tipo Th1, necessária para o controle da infecção, é caracterizada pelo envolvimento de linfócitos CD4 e CD8 e citocinas como IL-12, IFN- $\gamma$ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e algumas quimiocinas produzidas por macrófagos como a MCP1. Esta resposta tem como resultado a ativação de macrófagos, tornando-os mais capazes de eliminar o parasito via IFN- $\gamma$ , resultando na síntese de intermediários de nitrogênio (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) e, conseqüentemente, na morte dos parasitos intracelulares controlando a infecção (CUNNINGHAM, 2002; 1999; AWASTHI et al., 2004).

*In vivo* os resultados demonstram aumento da TNF- $\alpha$  (Fig. 19B) que provoca uma reação inflamatória local que geralmente ajuda no controle do parasito no local da lesão (BARROS et al., 2015; PETERSEN, 2012; LOPES, 2012).

A referida modulação pode ser explicada em parte pela conservação da integridade do macrófago que foi observada pela menor citotoxicidade verificada por meio do MTT e LDH, fato que, se tomado em conjunto com a diminuição da carga parasitária no interior da célula pode ter propiciado a uma menor efetividade dos mecanismos de evasão do parasito, além de ter permitido a manutenção física e funcional das estruturas e maquinários celulares envolvidos nessas reações, ao contrário do que fora observado no tratamento realizado exclusivamente com a PEN que demonstra uma potente atividade citotóxica nas células alvo do tratamento.

Esses dados corroboram em parte diferentes estudos que demonstraram a diminuição do número de parasitos no sítio da infecção em resposta ao tratamento com PEN (BARROS et al., 2015), em outras espécies como a *L. peruviana* (ANDERSEN, 2005), ou quando outros

tratamentos experimentais são empregados na terapia (PETERSEN, 2012; LOPES, 2012). No entanto, contraria a literatura que frequentemente relata a diminuição da inflamação associada ao menor número de parasitos (BARROS et al., 2015, PETERSEN, 2012) e, conseqüentemente o tamanho da lesão, fato que não ocorreu no presente estudo e sugerindo que a diminuição dos parasitos na lesão ocorreu sem diminuição da inflamação local.

Esse fato pode ser explicado pela potente produção de TNF- $\alpha$  no grupo tratado com PEN (Fig. 15B) corroborando Patrício (2007). Por outro lado, Macedo et al. (2015b), demonstraram que o tratamento com antimonial pentavalente associado a um inibidor de NF- $\kappa$ B é mais efetivo ao manter sob controle a produção de TNF- $\alpha$  uma vez que uma produção de exacerbada dessa citocina levar a um processo inflamatório local descontrolado e maiores lesões no tecido da infecção. Esse fato sugere que um aumento da produção de TNF- $\alpha$  precisa ser vista e avaliada cuidadosamente. Aqui a produção de TNF- $\alpha$  parece ter contribuído para o controle da carga parasitária, contudo manteve o processo inflamatório local alto, fato que pode ajudar a explicar o fato das lesões não terem diminuído de tamanho.

Em relação à toxicidade subaguda *in vivo*, os animais não apresentaram perda de massa corporal (Fig. 20A), e também não foi notado megalias dos órgãos que foram retirados e pesados (Fig. 20B, 20C e 20D), inclusive demonstrando que para o linfonodo houve diminuição da massa para o grupo que recebeu PEN (Fig. 18D) mesmo sem diminuição da contagem de parasitos nesse órgão (Fig. 18C) fato que diverge de parte da literatura (ARAÚJO, 2012). Contudo, o tratamento do grupo G6 (PEN + CTA) foi o grupo que mais diminuiu a carga parasitária em todas as comparações.

A análise da toxicidade *in vivo* demonstra que a CK-MB tanto quando a CK-Total estão dentro da variação para animais BALB/C embora tenham sofrido aumento (Fig. 20E e 20F) não sugerindo toxicidade muscular (ARAÚJO, 2012) nos grupos testados. Fato semelhante ocorre para a ureia e creatinina demonstrando serem iguais. Já em relação à ALT e AST os grupos G6 demonstrou uma maior expressão dessas enzimas sem ser considerado hepatotoxicidade, pois, embora a ALT e AST tenham aumentado, fato que até certo ponto é esperado, estão dentro da variação fisiológica do animal (ARAÚJO, 2012). Finalmente, quanto à amilase e lipase, não há indícios de toxicidade ao pâncreas.

Os dados da toxicidade *in vivo* se mostram adequados em razão de terem ficado dentro da variação normal para camundongos BALB/C como descrito em Araújo (2012) que objetivou determinar os valores de referência para camundongos BALB/C e dentre outros trabalhos que utilizou marcadores bioquímicos como referência para se determinar toxicidade de tratamentos sugerindo que a combinação de CTA + PEN, na concentração aqui investigada apresenta maior eficácia e boa tolerabilidade.

Estes dados são particularmente importantes, visto que o pâncreas e o fígado são os principais órgãos mantenedores da homeostase da glicose e, referindo-se ao descontrole no metabolismo da glicose proporcionado pela Pentamidina, anteriormente relatado como um dos mais graves efeitos colaterais desse fármaco, que pode inclusive levar ao óbito (ASSAN et al., 1995; ARINO et al., 2012), e, em se considerando os níveis de CK-Mb e CK-total que estavam dentro da variação fisiológica no animal, leva a acreditar que o tratamento aqui proposto apresentou tolerabilidade adequada.

Em outra análise, tanto para a associação entre GLU e CTA, assim como da PEN e CTA, a metodologia de Berimbaum (1978) sugerem sinergia, mais um fato que corrobora a potencial utilização dessa abordagem em investigações mais extensas.

Comparando-se as duas formulações aqui testadas, ambas apresentam resultados importantes e promissores, contudo a associação da PEN à CTA parece possuir resultados de desempenho *in vivo* e citotoxicidade que sugere melhor resultado para essa associação, embora, a CTA tenha melhorado sensivelmente a performance do GLU *in vivo* e *in vivo*. Os dados *in silico* e o método para a determinação da sinergia de Berimbaum também corroboram a impressão que aqui ficara sobre a comparação entre as duas formulações aqui investigadas.

Portanto, com base no que se evidenciou nesse estudo, mesmo que não tenha sido o foco, a associação entre PEN e CTA apresenta vantagens do ponto de vista farmacológico sobre a associação GLU e CTA embora ambos os fármacos tenham apresentado benefícios quando associadas à CTA.

## 6 CONCLUSÕES

A Crotamina de *Crotalus durissus terrificus* demonstrou ser capaz de aumentar a eficácia dos fármacos Pentamidina e Glucantime *in vitro* e *in vivo*, diminuir a citotoxicidade dos tratamentos *in vitro* e a toxicidade *in vivo* não aumentou, considerando o tratamento tolerável. Além disso, houve modulação da produção celular de NO, IL-12 e TNF- $\alpha$  *in vitro* e, *in vivo* houve uma clara reação imunológica direcionada a um perfil Th1 favorável ao controle da doença uma vez que aumentou a produção de IFN- $\gamma$ , IL-17a e inibiu a produção de IL-10. Com isso, parece correto concluir que a crotamina possui potencial como ferramenta biotecnológica para tratamentos experimentais antiparasitários, inspirando a necessidade de mais investigações para se determinar mecanismos mais específicos que levaram à eficácia e a aplicabilidade farmacológica demonstradas neste estudo. Por fim, a afinidade molecular demonstrada sugere que a ligação entre o peptídeo e os fármacos, apoiado pelos resultados biológicos, nas combinações farmacológicas do modelo estabelecido, sugerem sinergia na atividade farmacológica sobre o controle da leishmaniose cutânea.

Os resultados se tomados em conjunto, sugerem possibilidade de aplicação dessas abordagens no tratamento da infecção por *L. amazonensis*. As terapias aqui propostas devem ser experimentadas contra outras espécies de *Leishmania ssp.* com a finalidade de se determinar a eficácia, as respostas celulares, imunológicas e metabólicas à infecção. Vale ressaltar que estudos com a mesma abordagem vem sendo conduzidas a outro fármaco, a Anfotericina B que, na sua versão lipossomal (Ambissome<sup>®</sup>), é o fármaco de primeira escolha em países desenvolvidos.

Além disso, finalmente, a associação de fármacos clássicos com CTA apresenta-se como uma abordagem promissora para investigações em animais maiores e, posteriormente em seres humanos para a determinação de seus efeitos sobre a doença.

## 7 REFERÊNCIAS

AKHOUNDI, M.; DOWNING, T.; VOTÝPKA, J.; KUHLS, K.; LUKEŠ, J.; CANNET, A.; RAVEL, C.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; KASBARI, M.; GRANOULLAC, B.; GRADONI, L.; SERENO, D. **Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis** *Molecular Aspects of Medicine*, 2017. .

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

ANDERSEN, E. M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVARRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J. D. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for Peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 133–137, 2005.

ANTONIOU, T.; GOUGH, K. a. Early-onset pentamidine-associated second-degree heart block and sinus bradycardia: case report and review of the literature. **Pharmacotherapy**, v. 25, n. 6, p. 899–903, 2005.

ARINO, T.; KARAKAWA, S.; ISHIWATA, Y.; NAGATA, M.; YASUHARA, M. Effect of cimetidine on pentamidine induced hyperglycemia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 693, n. 1–3, p. 72–79, 2012.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. **Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania** *Journal of Medical Microbiology*, 2007. .

ASSAN, R.; MAYAUD, C.; PERRONNE, C.; MATHERON, S.; ASSAN, D.; ZUCMAN, D.; CHOTARD, L. Pentamidine-Induced Derangements of Glucose Homeostasis. **Diabetes care**, v. 18, n. 1, p. 47–55, 1995.

AZEVEDO, E. G.; RIBEIRO, R. R.; DA SILVA, S. M.; FERREIRA, C. S.; DE SOUZA, L. E.; FERREIRA, A. A.; DE OLIVEIRA E CASTRO, R. a; DEMICHELI, C.; REZENDE, S. a; FRÉZARD, F. Mixed formulation of conventional and pegylated liposomes as a novel drug delivery strategy for improved treatment of visceral leishmaniasis. **Expert opinion on drug delivery**, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24962630>>.

BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. **The pharmacology of leishmaniasis** *General Pharmacology*, 1998. .

BANERJEE, A.; BHATTACHARYA, P.; JOSHI, A. B.; ISMAIL, N.; DEY, R.; NAKHASI, H. L. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 2016.

BAPTISTA, C.; MIRANDA, L. de F. C.; MADEIRA, M. de F.; LEON, L. L. P.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A. de O. In Vitro Sensitivity of Paired Leishmania (Viannia) braziliensis Samples Isolated before Meglumine Antimoniate Treatment and after Treatment Failure or Reactivation of Cutaneous Leishmaniasis. **Disease markers**, v. 2015, p. 943236, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802480>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. D. N.; QUIGNARD, E.; VIEIRA, J. M. D. S.; SILVA, J. O. C.; ALBUQUERQUE, S. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: Phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 544–548, 2008.

BARROS, N. B.; MACEDO, S. R. A.; FERREIRA, A. S.; TAGLIARI, M. P.; ZANCHI, F. B.; KAYANO, A. M.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. Liposomes containing an ASP49-phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* snake venom as experimental therapy against cutaneous leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 225–231, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.025>>.

BARROS, N. B.; MIGLIACCIO, V.; FACUNDO, V. a.; CIANCAGLINI, P.; STÁBELI, R. G.; NICOLETE, R.; SILVA-JARDIM, I. Liposomal-lupane system as alternative chemotherapy against cutaneous leishmaniasis: Macrophage as target cell. **Experimental Parasitology**, v. 135, n. 2, p. 337–343, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014489413002087>>.

BECKER, S.; TERLAU, H. **Toxins from cone snails: Properties, applications and biotechnological production** *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008. .

BEN SALAH, A.; BEN MESSAOUD, N.; GUEDRI, E.; ZAATOUR, A.; BEN ALAYA, N.; BETTAIEB, J.; GHARBI, A.; BELHADJ HAMIDA, N.; BOUKTHIR, A.; CHLIF, S.; ABDELHAMID, K.; EL AHMADI, Z.; LOUZIR, H.; MOKNI, M.; MORIZOT, G.; BUFFET, P.; SMITH, P. L.; KOPYDLOWSKI, K. M.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; SMITH, K. S.; NIELSEN, C. J.; ULLMAN, D. R.; NORWOOD, J. a.; THORNE, G. D.; MCCARTHY, W. F.; ADAMS, R. C.; RICE, R. M.; TANG, D.; BERMAN, J.; RANSOM, J.; MAGILL, A. J.; GROGL, M. Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 524–532, 2013. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoal202657>>.

BERENBAUM, M. C. A method for testing for synergy with any number of agents. **The Journal of infectious diseases**, v. 137, n. 2, p. 122–30, 1978. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/627734>>.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. Van; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, p. 331–342, 1981.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984.

BERMAN, J. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 14, n. 11, p. 1337–46, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255674>>.

BHATTACHARYA, P.; DEY, R.; DAGUR, P. K.; KRUEHLAK, M.; ISMAIL, N.; DEBRABANT, A.; JOSHI, A. B.; AKUE, A.; KUKURUGA, M.; TAKEDA, K.; SELVAPANDIYAN, A.; MCCOY, J. P.; NAKHASI, H. L. Genetically Modified Live Attenuated *Leishmania donovani* Parasites Induce Innate Immunity through Classical Activation of Macrophages That Direct the Th1 Response in Mice. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 10, p. 3800–3815, 2015. Disponível em: <<http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00184-15>>.

BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, 2007.

CANTANHÊDE, L. F.; ALMEIDA, L. P.; SOARES, R. E. P.; CASTELO BRANCO, P. V. G.; PEREIRA, S. R. F. Soy isoflavones have antimutagenic activity on DNA damage induced by the antileishmanial Glucantime (meglumine antimoniate). **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 312–317, 2015.

CANZAR, S.; EL-KEBIR, M.; POOL, R.; ELBASSIONI, K.; MALDE, A. K.; MARK, A. E.; GEERKE, D. P.; STOUGIE, L.; KLAU, G. W. Charge group partitioning in biomolecular simulation. In: Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics), **Anais...2012**.

CARVALHO-GONTIJO, R.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; COSTA-SILVA, M. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; QUARESMA, P. F.; DE MOURA FREIRE, J.; DE CASTRO MORENO, E.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GONTIJO, C. M. F. Protective Profile Involving CD23/IgE-mediated NO Release is a Hallmark of Cutaneous Leishmaniasis Patients from the Xakriabá Indigenous Community in Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 81, n. 6, p. 515–524, 2015a.

CARVALHO-GONTIJO, R.; PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; COSTA-SILVA, M. F.; MARTINS-FILHO, O. A.; QUARESMA, P. F.; DE MOURA FREIRE, J.; DE CASTRO MORENO, E.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GONTIJO, C. M. F. Protective profile involving CD23/IgE-mediated NO release is a hallmark of cutaneous leishmaniasis patients from the Xakriabá indigenous community in Minas Gerais, Brazil. **Scandinavian journal of immunology**, 20 mar. 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25802003>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

CASTELLANO, L. R.; FILHO, D. C.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; PRATA, A.; DESSEIN, A.; RODRIGUES, V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- $\gamma$  production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

CATTANEO, A. G.; GORNATI, R.; SABBIONI, E.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; COBOS, E.; JENKINS, M. R.; BERNARDINI, G. Nanotechnology and human health: risks and benefits. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, n. 8, p. 730–744, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.1609>>.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrmicro1748>>.

CHEN, P.-C.; HAYASHI, M. a. F.; OLIVEIRA, E. B.; KARPEL, R. L. DNA-Interactive Properties of Crotamine, a Cell-Penetrating Polypeptide and a Potential Drug Carrier. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e48913, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0048913>>.

CHOI, C. M.; LERNER, E. a. Leishmaniasis as an emerging infection. **The journal of investigative dermatology. Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc. [and] European Society for Dermatological Research**, v. 6, n. 3, p. 175–182, 2001.



CIRILLO, C.; CAPOCCIA, E.; IUVONE, T.; CUOMO, R.; SARNELLI, G.; STEARDO, L.; ESPOSITO, G. S100B inhibitor pentamidine attenuates reactive gliosis and reduces neuronal loss in a mouse model of Alzheimer's disease. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

CORONADO, M. A.; GABDULKHAKOV, A.; GEORGIEVA, D.; SANKARAN, B.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Structure of the polypeptide crostamine from the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 69, n. 10, p. 1958–1964, 2013.

CORRAL, M. J.; SERRANO, D. R.; MORENO, I.; TORRADO, J. J.; DOMINGUEZ, M.; ALUNDA, J. M. Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 12, p. 3268–3274, 2014. Disponível em: <<http://www.jac.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jac/dku290>>.

COSTA, L. E.; MARTINS, A. M. C. C.; MARTINS, V. T.; CHA, M. A.; COELHO, E. A. F.; FERNANDES, A. P.; TAVARES, C. A. P. Antigenicity and Protective Efficacy of a *Leishmania* Amastigote-specific Protein, Member of the Super- oxygenase Family, against Visceral Leishmaniasis. v. 7, n. 3, 2013.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis— current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1471492203002484>>.

DAL MAS, C.; MOREIRA, J. T.; PINTO, S.; MONTE, G. G.; NERING, M. B.; OLIVEIRA, E. B.; GAZARINI, M. L.; MORI, M. A.; HAYASHI, M. A. F. Anthelmintic effects of a cationic toxin from a South American rattlesnake venom. **Toxicon**, v. 116, p. 49–55, 2016.

DAL MAS, C.; PINHEIRO, D. A.; CAMPEIRO, J. D.; MATTEI, B.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; MIRANDA, A.; PEREZ, K. R.; HAYASHI, M. A. F. Biophysical and biological properties of small linear peptides derived from crostamine, a cationic antimicrobial/antitumoral toxin with cell penetrating and cargo delivery abilities. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1859, n. 12, p. 2340–2349, 2017.

DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993.

DAS, V. N. R.; RANJAN, A.; PANDEY, K.; SINGH, D.; VERMA, N.; DAS, S.; LAL, C. S.; SINHA, N. K.; VERMA, R. B.; SIDDIQUI, N. A.; DAS, P. Short report: Clinical epidemiologic profile of a cohort of post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Bihar, India. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 6, p. 959–961, 2012.

DE BARROS, N. B.; ARAGÃO MACEDO, S. R.; FERREIRA, A. S.; TAGLIARI, M. P.; KAYANO, A. M.; NICOLETE, L. D. F.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. ASP49-phospholipase A2-loaded liposomes as experimental therapy in cutaneous leishmaniasis model. **International Immunopharmacology**, v. 55, p. 128–132, 2018.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147957104000232>>.

EDWARDS, K. J.; JENKINS, T. C.; NEIDLE, S. Crystal Structure of a Pentamidine-Oligonucleotide Complex: Implications for DNA-Binding Properties. **Biochemistry**, v. 31, n. 31, p. 7104–7109, 1992.

FEDERAL, U.; GERAIS, M.; CO-ORIENTADORES, M. M.; PROF, E. M. S.; CASSALI, G. D. ANA FLÁVIA DE CARVALHO RIBEIRO Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da. 2012.

FENARD, D.; LAMBEAU, G.; VALENTIN, E.; LEFEBVRE, J. C.; LAZDUNSKI, M.; DOGLIO, A. Secreted phospholipases A2, a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, n. 5, p. 611–618, 1999.

GANGULY, S.; DAS, N. K.; BARBHUIYA, J. N.; CHATTERJEE, M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis - an overview. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 8, p. 921–931, 2010a.

GANGULY, S.; MUKHOPADHYAY, D.; DAS, N. K.; CHADUVULA, M.; SADHU, S.; CHATTERJEE, U.; RAHMAN, M.; GOSWAMI, R. P.; GUHA, S. K.; MODAK, D.; MALLIK, S.; GONJU, D.; PRAMANIK, N.; BARBHUIYA, J. N.; SAHA, B.; CHATTERJEE, M. Enhanced lesional foxp3 expression and peripheral anergic lymphocytes indicate a role for regulatory T cells in indian post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 4, p. 1013–1022, 2010b.

GOSWAMI, P. K.; SAMANT, M.; SRIVASTAVA, R. S. **Snake venom, anti-snake venom & potential of snake venom** **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2014. .

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

GRIMALDI, G. J.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World Leishmania species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 37–42, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734946>>.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. **Advances in Applied Microbiology**, v. 82, p. 155–184, 2013.

HAYASHI, M. a. F.; NASCIMENTO, F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. S. Cytotoxic effects of crostamine are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 508–517, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010108004030>>.

HENAO, H. H.; OSORIO, Y.; SARAVIA, N. G.; GÓMEZ, A.; TRAVI, B. Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. **Biomédica**, v. 24, n. 4, p. 393, 2004. Disponível em: <<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1289>>.

HERBRECHT, R.; NATARAJAN-AMÉ, S.; NIVOIX, Y.; LETSCHER-BRU, V. The lipid formulations of amphotericin B. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 4, n. 8, p. 1277–1287, 2003.

HERNANDEZ-OLIVEIRA E SILVA, S.; ROSTELATO-FERREIRA, S.; ROCHA-E-SILVA, T. A. A.; RANDAZZO-MOURA, P.; DAL-BELO, C. A.; SANCHEZ, E. F.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Beneficial effect of crotamine in the treatment of myasthenic rats. **Muscle and Nerve**, v. 47, n. 4, p. 591–593, 2013.

HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A Linear Constraint Solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.

HEZARJARIBI, H. Z.; GHAFARIFAR, F.; DALIMI, A.; SHARIFI, Z. Evaluation of protective effect of IL-22 and IL-12 on cutaneous leishmaniasis in BALB / c mice. p. 940–945, 2014.

HOYOS ARGÁEZ, M. A.; ALMEIDA-SANTOS, D. S. M. A cascavel neotropical *Crotalus durissus*: uma abordagem morfológica e da historia natural em populações do Brasil. **Cirurgia**, v. Ph.D., p. 130, 2012.

HU, R. V. P. F.; STRAETEMANS, M.; KENT, A. D.; SABAJO, L. O. a.; DE VRIES, H. J. C.; LAI A FAT, R. F. M. Randomized Single-Blinded Non-inferiority Trial Of 7 mg/kg Pentamidine Isethionate Versus 4 mg/kg Pentamidine Isethionate for Cutaneous Leishmaniasis in Suriname. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. e0003592, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0003592>>.

HURDAYAL, R.; BROMBACHER, F. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 161, n. 2, p. 179–183, 2014.

III, N. J. L.; KELLY, B. L. Suppression of LPS-induced inflammatory responses in macrophages infected with *Leishmania*. p. 1–9, 2010.

IKEDA-GARCIA, F. A.; LOPES, R. S.; CIARLINI, P. C.; MARQUES, F. J.; LIMA, V. M. F.; PERRI, S. H. V.; FEITOSA, M. M. Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. **Research in Veterinary Science**, v. 83, n. 1, p. 105–108, 2007.

JOLLIFFE, D. **NEPHROTOXICITY OF PENTAVALENT ANTIMONIALS** *The Lancet*, 1985. .

KAI, G.; WU, C.; GEN, L.; ZHANG, L.; CUI, L.; NI, X. **Biosynthesis and biotechnological production of anti-cancer drug Camptothecin** *Phytochemistry Reviews*, 2015. .

KATO, K. C.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; REIS, P. G.; SILVA-BARCELLOS, N. M.; SALAÜN, P.; CAMPOS, P. P.; DIAS CORRÊA-JUNIOR, J.; RABELLO, A.; DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24189251>>.

KERKIS, A.; HAYASHI, M. a. F.; YAMANE, T.; KERKIS, I. Properties of cell penetrating peptides (CPPs). **IUBMB Life**, v. 58, n. 1, p. 7–13, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540500494508>>.

KERKIS, A.; KERKIS, I.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; OLIVEIRA, E. B.; VIANNA-MORGANTE, A. M.; PEREIRA, L. V.; YAMANE, T. Crostamine is a novel cell-penetrating protein from the venom of rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 18, n. 12, p. 1407–1409, 2004.

KERKIS, I.; HAYASHI, M. A. F.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; PEREIRA, A.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; ZAHARENKO, A. J.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, A.; YAMANE, T. **State of the art in the studies on crostamine, a cell penetrating peptide from South American rattlesnake** *BioMed Research International*, 2014. .

KERKIS, I.; SILVA, F. D. S.; PEREIRA, A.; KERKIS, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Biological versatility of crostamine - a cationic peptide from the venom of a South American rattlesnake. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, n. 12, p. 1515–1525, 2010.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. **New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review** *Dermatologic Clinics*, 2015. .

KIMA, P. E.; SOONG, L. **Interferon gamma in leishmaniasis** *Frontiers in Immunology*, 2013. .

KOTTHAUS, J.; KOTTHAUS, J.; SCHADE, D.; SCHWERING, U.; HUNGELING, H.; MÜLLER-FIELITZ, H.; RAASCH, W.; CLEMENT, B. New Prodrugs of the Antiprotozoal Drug Pentamidine. **ChemMedChem**, v. 6, n. 12, p. 2233–2242, 2011.

KOZIARA, K. B.; STROET, M.; MALDE, A. K.; MARK, A. E. Testing and validation of the Automated Topology Builder (ATB) version 2.0: Prediction of hydration free enthalpies. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 28, n. 3, p. 221–233, 2014.

KRAEMER, W. J.; HATFIELD, D. L.; COMSTOCK, B. a; FRAGALA, M. S.; DAVITT, P. M.; CORTIS, C.; WILSON, J. M.; LEE, E. C.; NEWTON, R. U.; DUNN-LEWIS, C.; HÄKKINEN, K.; SZIVAK, T. K.; HOOPER, D. R.; FLANAGAN, S. D.; LOONEY, D. P.; WHITE, M. T.; VOLEK, J. S.; MARESH, C. M. Influence of HMB Supplementation and Resistance Training on Cytokine Responses to Resistance Exercise. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 33, n. 4, 2014.

KYRIAKOU, A.; PATSATSI, A.; VYZANTIADIS, T.-A.; SOTIRIADIS, D. Serum Levels of TNF-  $\alpha$  , IL-12/23 p40, and IL-17 in Psoriatic Patients with and without Nail Psoriasis: A Cross-Sectional Study. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–5, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/508178/>>.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: **The leishmaniasis in biology and medicine. Volume I. Biology and epidemiology**. [s.l.: s.n.]p. 120.

LAKHAL-NAOUAR, I.; SLIKE, B. M.; ARONSON, N. E.; MAROVICH, M. a. The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, p. e0004178, 2015. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004178>>.

LAWN, S. D.; ARMSTRONG, M.; CHILTON, D.; WHITTY, C. J. M. Electrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 3, p. 264–269, 2006.

LEPROHON, P.; FERNANDEZ-PRADA, C.; GAZANION, É.; MONTE-NETO, R.; OUELLETTE, M. **Drug resistance analysis by next generation sequencing in Leishmania** *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 2015. .

LIMA-JUNIOR, D. S.; COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; CUNHA, L. D.; SILVA, A. L. N.; MINEO, T. W. P.; GUTIERREZ, F. R. S.; BELLIO, M.; BORTOLUCI, K. R.; FLAVELL, R. A.; BOZZA, M. T.; SILVA, J. S.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, 2013.

LIMA, M. I. S.; ARRUDA, V. O.; ALVES, E. V. C.; DE AZEVEDO, A. P. S.; MONTEIRO, S. G.; PEREIRA, S. R. F. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of Toxicology**, v. 84, n. 3, p. 227–232, 2010.

LOWE, D. Translational research: Drug discovery from the inside. **Nature Chemical Biology**, v. 11, n. 4, p. 239–239, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nchembio.1778>>.

M., T.; Y.A., D. C.; F.S., M. **Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta1 integrin- mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis** *Cancer Research*, 1994. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed3&NEWS=N&AN=1994296494>>.

MACEDO, S. R. A.; DE BARROS, N. B.; FERREIRA, A. S.; MOREIRA-DILL, L. S.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M.; NICOLETE, R. Biodegradable Microparticles Containing Crostamine Isolated from *Crotalus durissus terrificus* Display Antileishmanial Activity in vitro. **Pharmacology**, v. 95, n. 1–2, p. 78–86, 2015a. Disponível em: <<http://www.karger.com/?doi=10.1159/000371391>>.

MACEDO, S. R. A.; DE FIGUEIREDO NICOLETE, L. D.; FERREIRA, A. D. S.; DE BARROS, N. B.; NICOLETE, R. The pentavalent antimonial therapy against experimental Leishmania amazonensis infection is more effective under the inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. **International Immunopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 554–559, 2015b.

MACHADO, P. R. L.; PENNA, G. **Miltefosine and cutaneous leishmaniasis** *Current Opinion in Infectious Diseases*, 2012. .

MAHNKE, A.; MEIER, R. J.; SCHATZ, V.; HOFMANN, J.; CASTIGLIONE, K.; SCHLEICHER, U.; WOLFBEIS, O. S.; BOGDAN, C.; JANTSCH, J. Hypoxia in Leishmania major skin lesions impairs the NO-dependent leishmanicidal activity of macrophages. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 9, p. 2339–2346, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2014.121>>.

MANCIN, A. C.; SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; FAÇA, V. M.; GREENE, L. J.; ZUCCOLOTTO, S.; PELA, I. R.; GIGLIO, J. R. The analgesic activity of crostamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: A biochemical and pharmacological study. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1927–1937, 1998.

MARTINS, V. T.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; LAGE, D. P.; DUARTE, M. C.; GARDE, E.; COSTA, L. E.; GOMES, V.; OLIVEIRA, J. S.; FERREIRA, D.; MAGALH, D.; MARIA, S.; TEIXEIRA, R.; FERNANDES, A. P.; SOTO, M.; ALBERTO, C.; TAVARES, P. Antigenicity , Immunogenicity and Protective Efficacy of Three Proteins Expressed in the Promastigote and Amastigote Stages of *Leishmania infantum* against Visceral Leishmaniasis. p. 1–25, 2015.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, 2016.

MATOUSSI, N.; AMEUR, H. B.; AMOR, S. B.; FITOURI, Z.; BECHER, S. B. Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. **Medecine et maladies infectieuses**, v. 37 Suppl 3, p. S257–S259, 2007.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309–322, 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0190962209011487>>.

MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.

MOLINA, R.; GHOSH, D.; CARRILLO, E.; MONNERAT, S.; BERN, C.; MONDAL, Di.; ALVAR, J. Infectivity of Post-Kala-azar Dermal Leishmaniasis Patients to Sand Flies: Revisiting a Proof of Concept in the Context of the Kala-azar Elimination Program in the Indian Subcontinent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 65, n. 1, p. 150–153, 2017.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889–1920, 2013a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s40265-013-0132-1>>.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, v. 73, n. 17, p. 1889–920, 2013b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24170665>>.

MUKHOPADHYAY, D.; DALTON, J. E.; KAYE, P. M.; CHATTERJEE, M. **Post kala-azar dermal leishmaniasis: An unresolved mystery** **Trends in Parasitology**, 2014. .

NAHIDI, Y.; MALEKI, M.; TAFAGHODI, M.; KARIMI, G.; RAFTARI, S. Comparison of intralesional two percent zinc sulfate and glucantime injection in treatment of acute cutaneous leishmaniasis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 57, n. 2, p. 118, 2012. Disponível em: <<http://www.e-ijd.org/text.asp?2012/57/2/118/94279>>.

NASCIMENTO, F. D.; HAYASHI, M. a. F.; KERKIS, a.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; RADIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; DOS SANTOS TERSARIOL, I. L.; KERKIS, I. Crotonamine Mediates Gene Delivery into Cells through the Binding to Heparan Sulfate Proteoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 29, p. 21349–21360, 2007. Disponível em: <<http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M604876200>>.

NASCIMENTO, F. D.; SANCEY, L.; PEREIRA, A.; ROME, C.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. S.; COLL, J. L.; HAYASHI, M. A. F. The natural cell-penetrating peptide crotamine targets tumor tissue in vivo and triggers a lethal calcium-dependent pathway in cultured cells. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 211–221, 2012.

NICOLETE, R.; ARAKAWA, N. S.; RIUS, C.; NOMIZO, A.; JOSE, P. J.; DA COSTA, F. B.; SANZ, M.-J.; FACCIOLI, L. H. Budlein A from *Viguiera robusta* inhibits leukocyte-endothelial cell interactions, adhesion molecule expression and inflammatory mediators release. **Phytomedicine**, v. 16, n. 10, p. 904–915, 2009. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711309001068>>.

NILFOROUSHZADEH, M. A.; NILFOROUSHAN, Z.; JAFARI, F.; HEIDARI, A.; ANSARI, N. The skin side effects of topical glucantime in patients with cutaneous leishmaniasis. **Journal of Isfahan Medical School**, v. 33, n. 338, 2015.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; AFFONSO, R.; ZHANG, G. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 4, p. 327–331, 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ja.2011.10>>.

OLALLA, R. H.; VELEZ, N. L.; KATO, H.; HASHIGUCHI, K.; CACERES, G. A.; GOMEZ, L. E.; ZAMBRANO, C. F.; ROMERO, Á. D.; GUEVARA, E. A.; HASHIGUCHI, Y. An analysis of reported cases of leishmaniasis in the southern Ecuadorian Amazon region, 1986 - 2012. **Acta tropica**, 18 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25796313>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

OOSTENBRINK, C.; VILLA, A.; MARK, A. E.; VAN GUNSTEREN, W. F. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368764604000652>>.

P??LL, S.; ABRAHAM, M. J.; KUTZNER, C.; HESS, B.; LINDAHL, E. Tackling exascale software challenges in molecular dynamics simulations with GROMACS. In: Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics), **Anais...**2015.

PAGLIANO, P.; ASCIONE, T.; DI FLUMERI, G.; BOCCIA, G.; DE CARO, F. **Visceral leishmaniasis in immunocompromised: Diagnostic and therapeutic approach and evaluation of the recently released IDSA guidelines***Infezioni in Medicina*, 2016. .

PATRÍCIO, F. J.; COSTA, G. C.; PEREIRA, P. V. S.; ARAGÃO-FILHO, W. C.; SOUSA, S. M.; FRAZÃO, J. B.; PEREIRA, W. S.; MACIEL, M. C. G.; SILVA, L. A.; AMARAL, F. M. M.; REBÊLO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, n. 2, p. 313–319, 2008.

PEIGNEUR, S.; ORTS, D. J. B.; PRIETO DA SILVA, A. R.; OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; DE OLIVEIRA, E. B.; ZAHARENKO, A. J.; DE FREITAS, J. C.; TYTGAT, J. Crostamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 90–96, 2012. Disponível em: <<http://molpharm.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/mol.112.078188>>.

PEREIRA, A.; KERKIS, A.; HAYASHI, M. a F.; PEREIRA, A. S. P.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, E. B.; PRIETO DA SILVA, A. R. B.; YAMANE, T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crostamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 20, n. 9, p. 1189–200, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21834748>>.

PETERSEN, A. L. D. O. A.; GUEDES, C. E. S.; VERSOZA, C. L.; LIMA, J. G. B.; DE FREITAS, L. A. R.; BORGES, V. M.; VERAS, P. S. T. 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49496, 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0049496>>.

PU, X. C.; WONG, P. T. H.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1425–1431, 1995.

RÄÄGEL, H.; SÄÄLIK, P.; POOGA, M. **Peptide-mediated protein delivery-Which pathways are penetrable?** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 2010. .

RAHMAN, K. M.; ISLAM, S.; RAHMAN, M. W.; KENAH, E.; GHALIB, C. M.; ZAHID, M. M.; MAGUIRE, J.; RAHMAN, M.; HAQUE, R.; LUBY, S. P.; BERN, C. Increasing incidence of post-kala-azar dermal leishmaniasis in a population-based study in Bangladesh. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 1, p. 73–76, 2010.

REIS, C.; CAPANEMA, L. X. D. L.; DA SILVA, L. G.; BARROS, J. O.; PIERONI, J. P.; FILHO, P. L. P. Biotecnologia Para Saúde Humana: Tecnologias, Aplicações e Inserção na indústria farmacêutica. **BNDES Setorial**, v. 29, p. 359–392, 2009.

REIS, C.; PIERONI, J. P.; SOUZA, J. O. B. Biotecnologia para saúde no Brasil. **BNDS Setorial**, v. 32, p. p.193-230, 2014.

REIS, D. B.; ALBUQUERQUE, T. S.; SOARES, M. R. A. AS LEISHMANIOSES E O LIVRO DIDÁTICO: COMO AS DOENÇAS SÃO ABORDADAS NO ENSINO PÚBLICO? **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 19, n. 1, p. 91–98, 2014. Disponível em: <<https://www.if.ufrgs.br/cref/ojs/index.php/ienci/article/view/97>>.

RICARDO-CARTER, C.; FAVILA, M.; POLANDO, R. E.; COTTON, R. N.; BOGARD HORNER, K.; CONDON, D.; BALLHORN, W.; WHITCOMB, J. P.; YADAV, M.; GEISTER, R. L.; SCHOREY, J. S.; MCDOWELL, M. A. Leishmania major inhibits IL-12 in macrophages by signalling through CR3 (CD11b/CD18) and down-regulation of ETS-mediated transcription. **Parasite Immunology**, v. 35, n. 12, p. 409–420, 2013.



RUBIANO, L. C.; MIRANDA, M. C.; MUVDI ARENAS, S.; MONTERO, L. M.; RODRÍGUEZ-BARRAQUER, I.; GARCERANT, D.; PRAGER, M.; OSORIO, L.; ROJAS, M. X.; PÉREZ, M.; NICHOLLS, R. S.; SARAIVIA, N. G. Noninferiority of miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 4, p. 684–692, 2012.

SACRAMENTO, L. A.; DA COSTA, J. L.; DE LIMA, M. H. F.; SAMPAIO, P. A.; ALMEIDA, R. P.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S.; CARREGARO, V. Toll-Like Receptor 2 Is Required for Inflammatory Process Development during *Leishmania infantum* Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00262/full>>.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. **The role of host genetics in leishmaniasis** *Trends in Parasitology*, 2009. .

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. **Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis** *International Journal of Molecular Sciences*, 2017. .

SEGUEL, V.; CASTRO, L.; REIGADA, C.; CORTES, L.; DÍAZ, M. V.; MIRANDA, M. R.; PEREIRA, C. A.; LAPIER, M.; CAMPOS-ESTRADA, C.; MORELLO, A.; KEMMERLING, U.; MAYA, J. D.; LÓPEZ-MUÑOZ, R. Pentamidine antagonizes the benznidazole's effect in vitro, and lacks of synergy in vivo: Implications about the polyamine transport as an anti-*Trypanosoma cruzi* target. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 23–32, 2016.

SILVA-JARDIM, I; HORTA, M F; RAMALHO-PINTO, F. J. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta tropica**, v. 91, p. 121–130, 2004.

SOLEIMANIFARD, S.; ARJMAND, R.; SABERI, S.; SALEHI, M.; HEJAZI, S. Treatment Outcome of the Drug-resistant Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis by Glucantime. **Advanced Biomedical Research**, v. 6, n. 1, p. 17, 2017. Disponível em: <<http://www.advbiores.net/text.asp?2017/6/1/17/201329>>.

SOTO, J.; PAZ, D.; RIVERO, D.; SOTO, P.; QUISPE, J.; TOLEDO, J.; BERMAN, J. Intralesional pentamidine: A novel therapy for single lesions of Bolivian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 4, p. 852–856, 2016.

SPERRY, P. . Antimicrobial activity of AmBisome and non-liposomal amphotericin B following uptake of *Candida glabrata* by murine epidermal Langerhans cells. **Medical Mycology**, v. 35, p. 135–41, 1998.

SUNDAR, SHYAMGARWAL, D.; RAI, M.; MURRAY, H. W. for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 2, p. 504–512, 2010.

TERAPÊUTICO, E.; GLUCANTIME, C. O. M.; SAGÜIS, E. M.; INFECTADOS, J.; UMA, C. O. M.; LEISHMANIA, C. D. E. Ensaio terapêutico com glucantime em sagüis. v. 18, n. 1, p. 39–42, 1985.

THAKUR, C. P. **Sodium antimony gluconate, amphotericin, and myocardial damage** *Lancet*, 1998. .

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA,

C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. 525–532, 2011.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M. R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, v. 6, p. 750, 2017. Disponível em: <<https://f1000research.com/articles/6-750/v1>>.

TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C.; LEITE, G. B.; PRADO-FRANCESCHI, J.; CRUZ-HÖFLING, M. A. Da; RODRIGUES-SIMIONI, L. Biophysical, histopathological and pharmacological characterization of crostamine isoforms F22 and F32. **Toxicon**, v. 41, n. 4, p. 493–500, 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010102003902>>.

VAN DER MEIDE, W. F.; SABAJO, L. O. a; JENSEMA, A. J.; PEEKEL, I.; FABER, W. R.; SCHALLIG, H. D. F. H.; FAT, R. F. M. L. a. Evaluation of treatment with pentamidine for cutaneous leishmaniasis in Suriname. **International journal of dermatology**, v. 48, n. 1, p. 52–8, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19126051>>.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177–4184, 2002.

VONK, F. J.; JACKSON, K.; DOLEY, R.; MADARAS, F.; MIRTSCHIN, P. J.; VIDAL, N. Snake venom: From fieldwork to the clinic. **BioEssays**, v. 33, n. 4, p. 269–279, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/bies.201000117>>.

W. WHO | LeishmaniasisWho, 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.

WAGNER, H. Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals **Fitoterapia**, 2011. .

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, 2011.

WHO. Global Health Observatory (GHO): Data Repository. Disponível em: <<http://www.who.int/gho/database/en/%5Cnhttp://apps.who.int/gho/data/node.home>>.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **weekly epidemiological record**, n. 83, p. 285–296, 2016.

WILSON, W. D.; TANIUS, F. A.; MATHIS, A.; TEVIS, D.; HALL, J. E.; BOYKIN, D. W. Antiparasitic compounds that target DNA **Biochimie**, 2008.

YAMANE, E. S.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, E. B.; MOREIRA, J. T.; RAJABI, M.; NUNES, G. L. C.; DE SOUZA, A. O.; DA SILVA, I. D. C. G.; YAMANE, T.; KARPEL, R. L.; SILVA, P. I.; HAYASHI, M. a. F. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crostamine. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 231–240, 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090841200377X>>.

YASINZAI, M.; KHAN, M.; NADHMAN, A.; SHAHNAZ, G. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives. **Future medicinal chemistry**, v. 5, n. 15, p. 1877–88, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24144417>>.

ZAMOSHNIKOVA, A.; GROS, C. J.; SCHUSTER, S.; CHEN, K. W.; WILSON, A.; TACCHINI-COTTIER, F.; SCHRODER, K. migration but does not modulate LPS- or infection-induced NF- $\kappa$ B or. **Immunobiology**, p. 1–6, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2015.10.001>>.

ZHOU, H.; GAO, M.; SKOLNICK, J. Comprehensive prediction of drug-protein interactions and side effects for the human proteome. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11090, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/srep11090>>.

ZIEGLER, A.; LI BLATTER, X.; SEELIG, A.; SEELIG, J. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. **Biochemistry**, v. 42, n. 30, p. 9185–9194, 2003.

*ANEXOS*

## Anexo 1 - PEDIDO DE PATENTE

PE2470

1/5

## PCT REQUERIMENTO

Print Out (Original em Formato Electrónico)

0	Reservado para o Organismo receptor	
0-1	Pedido internacional No.	PCT/BR2017/050041
0-2	Data do depósito internacional	24 Fevereiro 2017 (24.02.2017)
0-3	Nome do Organismo receptor e 'Pedido internacional PCT'	RO/BR
0-4	Formulário PCT/RO/101 Requerimento PCT	
0-4-1	Preparado Utilizando	ePCT-Filing Version 3.3.017 MT/FOP 20151028/0.20.5.24
0-5	Petição O abaixo assinado solicita que o presente pedido internacional seja processado de acordo com o Tratado de Cooperação em matéria de Patentes	
0-6	Organismo receptor (especificado pelo requerente)	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil) (RO/BR)
0-7	Referência do processo de requerente ou do mandatório	PE2470
I	Título da invenção	COMBINAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA, MEDICAMENTO, MÉTODO PARA TRATAR LEISHMANIOSE, E, USO DA COMPOSIÇÃO
II	Requerente	
II-1	Esta pessoa é:	Apenas requerente
II-2	Requerente para	Todos os Estados designados
II-4	Nome	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
II-5	Endereço	Av. Brasil 4365, Manguinhos 21045-900 Rio de Janeiro, RJ Brasil
II-6	Nacionalidade (nome do Estado)	BR
II-7	Domicílio (nome do Estado)	BR
II-8	No. de telefone	(21)2113-1919
II-9	No. de fax	(21)2113-1920
II-10	Endereço de correio electrónico	mail@kasznarleonardos.com
II-10(a)	Autorização relativa ao correio electrónico O Organismo receptor deve obter junto de uma biblioteca digital e transmitir à Secretaria Internacional uma cópia autenticada do(s) pedido(s) anterior(es) assim identificado(s) no(s) ponto(s):	como notificações prévias por via electrónica seguidas de notificações em papel

PE2470

2/5

**PCT REQUERIMENTO**

Print Out (Original em Formato Eletrônico)

<b>II-1</b>	<b>Requerente e/ou inventor</b>	
II-1-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
II-1-3	Inventor para	Todos os Estados designados
II-1-4	Nome (APELIDO, nome próprio)	SILVA, João, Rafael, Valentim
II-1-5	Endereço	Rua Clara Nunes, 6231, Aponiã, Rondônia Porto Velho Brasil
<b>II-2</b>	<b>Requerente e/ou inventor</b>	
II-2-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
II-2-3	Inventor para	Todos os Estados designados
II-2-4	Nome (APELIDO, nome próprio)	NICOLETE, Roberto
II-2-5	Endereço	Rua da Paz, 100, apt 802, Mucuripe, Ceará Fortaleza Brasil
<b>II-3</b>	<b>Requerente e/ou inventor</b>	
II-3-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
II-3-3	Inventor para	Todos os Estados designados
II-3-4	Nome (APELIDO, nome próprio)	SCARES, Andreimar, Martins
II-3-5	Endereço	Rua Eng. Anysio da Rocha Compasso, 6690, Cond. Águas Vivas, Cs. 20, Aponiã, Rondônia Porto Velho Brasil
<b>II-4</b>	<b>Requerente e/ou inventor</b>	
II-4-1	Esta pessoa é:	Apenas inventor
II-4-3	Inventor para	Todos os Estados designados
II-4-4	Nome (APELIDO, nome próprio)	CALDERON, Leonardo, De Azevedo
II-4-5	Endereço	Avenida Rio Madeira, 5771, Bairro Nova Esperança, Rondônia Porto Velho Brasil

PE2470

3/5

## PCT REQUERIMENTO

Part Out (Original em Formato Electrónico)

IV-1	<b>Mandatário ou representante comum; ou endereço para a correspondência</b> A pessoa física-identificada é/for, por este meio, designada para actuar em nome do(s) requerente(s) perante as Autoridades Internacionais competentes, na qualidade de:	Mandatário
IV-1-1	Nome	KASZNAR LEONARDOS INTELLECTUAL PROPERTY
IV-1-2	Endereço	Rua Teófilo Otoni, 63 - 5th to 8th floors 20090-080 Rio de Janeiro - RJ Brasil
IV-1-3	No. de telemóvel	55 21 21131919
IV-1-4	No. de fax	55 21 21131920
IV-1-5	Endereço de correio electrónico	mail@kasznarleonardos.com
IV-1-5a )	Autorização relativa ao correio electrónico O Organismo receptor deve obter junto de uma biblioteca digital e transmitir à Secretária Internacional uma cópia autorizada do(s) pedido(s) anterior(es) acima identificado(s) no(s) ponto(s):	como notificações prévias por via electrónica seguidas de notificações em papel
V	<b>DESIGNAÇÕES</b>	
V-1	O depósito deste requerimento constitui, de acordo com a Regra 4.9.a), a designação de todos os Estados Contratantes vinculados pelo PCT na data do depósito internacional, para os fins de concessão de qualquer tipo de protecção disponível e, se for caso disso, para os fins da concessão tanto de patentes regionais como de patentes nacionais.	
VI-1	Reivindicação de prioridade	NENHUMA(S)
VI-1	Autoridade Responsável pela Pesquisa Internacional Escrita	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil) (ISA/BR)
VII	<b>Declarações</b>	Número de declarações
VII-1	Declaração relativa à identidade do inventor	-
VII-2	Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de pedir e obter um patente	-
VII-3	Declaração relativa ao direito do requerente, na data do depósito internacional, de reivindicar a prioridade do pedido anterior	-
VII-4	Declaração de autoria da invenção (apenas para os fins da designação dos Estados Unidos da América)	-
VII-5	Declaração relativa a objeções não prejudiciais na recepção à falta de novidade	-

PE2470

4/5

**PCT REQUERIMENTO**

Print Out (Original em Formato Electrónico)

IX	Lista de controle	Número de folhas	Ficheiro(s) electrónico(s) anexado(s)
IX-1	Requerimento (incluindo as folhas de dedicação)	5	✓
IX-2	Descrição	107	✓
IX-3	Restrições	2	✓
IX-4	Resumo	1	✓
IX-5	Desenhos	41	✓
IX-7	TOTAL	156	
	<b>Itens anexos</b>	<b>Documento(s) em papel anexado(s)</b>	<b>Ficheiro(s) electrónico(s) anexado(s)</b>
IX-8	Folha de cálculo das taxas	-	✓
IX-9	Procuração separada original	-	✓
IX-20	Figura dos desenhos que deve acompanhar o resumo	27	
IX-21	Língua de depósito do pedido internacional	Português	
X-1	Assinatura do requerente, do mandatário ou do representante comum		
X-1-1	Nome	KASZBAR LEONARDO'S INTELLECTUAL PROPERTY	
X-1-2	Nome de quem assina	Ricardo Cardoso Costa Boclin	
X-1-3	Qualidade (se tal qualidade não for evidente para quem ler o requerimento)	Partner	



PE2470

5/5

PCT REQUERIMENTO

Print Out (Original em Formato Eletrônico)

## RESERVADO PARA O ORGANISMO RECEPTOR

10-1	Data efectiva de recepção do alegado pedido internacional	24 Fevereiro 2017 (24.02.2017)
10-2	Desenhos:	
10-2-1	Recibida	
10-2-2	Não recebida	
10-3	Data efectiva de recepção, corrigida devido à recepção ulterior, mas dentro do prazo, de documentos ou desenhos que completam o alegado pedido internacional	
10-4	Data da recepção, dentro do prazo, das correcções exigidas de acordo com o Artigo 11.2) do PCT	
10-5	Autoridade responsável pela pesquisa internacional	ISA/BR
10-6	Transmissão da cópia de pesquisa diferida até ao pagamento da taxa de pesquisa	

## RESERVADO PARA A SECRETARIA INTERNACIONAL

11-1	Data da recepção da via original pela Secretaria Internacional	
------	--	--

## Anexo 2

## Recibo de Depósito de Patente



Instituto Nacional da Propriedade Industrial (Brasil)

## Comprovativo da submissão eletrônica

O Organismo receptor (RO/BR) acusa a recepção de um pedido internacional do PCT depositado através do ePCT-Filing. Um número de pedido e data de recepção foram atribuídos automaticamente (Instruções Administrativas, Parte 7).

Número de submissão:	060041	
Número de pedido:	PCT/BR2017/050041	
Data de recepção:	24 Fevereiro 2017	
Organismo receptor:	Instituto Nacional de Propriedade Industrial (Brasil)	
A sua referência:	PE2470	
Requerente:	FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ	
Número de requerentes:	1	
Título:	COMBINAÇÃO, COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA, MEDICAMENTO, MÉTODO PARA TRATAR LEISHMANIOSE, E, USO DA COMPOSIÇÃO	
Documentos submetidos:		
	PE2470-appb-000004.pdf (Desenhos.pdf)	906931
	PE2470-appb-000005.pdf (Relatório.pdf)	684376
	PE2470-appb.xml	944
	PE2470-fees.xml	1686
	PE2470-poat-000001.pdf (POA PCT.pdf)	567301
	PE2470-requ.xml	6012
	PE2470-vlog.xml	1787
Submetido por:	Ricardo Cardoso Costa Boclin (ID de cliente: user_BR_BOCLIN_RICARDO-CARDOSO-COSTA_0681)	
Assinado por:	KASZNAR LEONARDOS INTELLECTUAL PROPERTY	
Carimbo de hora do comprovativo:	24 Fevereiro 2017 10:39 UTC-3 (BRT)	
Sumário oficial da submissão:	AC:E4:79:93:6A:AC:7B:16:CD:E0:8F:AB:4A:AC:6A:A5:14:CD:DE:C6	

/Organismo receptor/BR/