

Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

**ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (GLUCANTIME[®])
CAUSA DANOS AO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO E
INDUZ SUPEREXPRESSÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
DEFESA ANTIOXIDANTE E REPARO DO DNA**

VANESSA RIBEIRO MOREIRA

**SÃO LUÍS
2017**

VANESSA RIBEIRO MOREIRA

**ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (GLUCANTIME®) CAUSA DANOS
AO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO E INDUZ SUPEREXPRESSION
DE GENES ENVOLVIDOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE E REPARO
DO DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira

**São Luís
2017**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Moreira, Vanessa Ribeiro.

Antimoniato de meglumina Glucantime® causa danos ao DNA por estresse oxidativo e induz superexpressão de genes envolvidos na defesa antioxidante e reparo do DNA / Vanessa Ribeiro Moreira. - 2017.

135 f.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2017.

1. Antileishmanial. 2. Defesa antioxidante. 3. Genotoxicidade. 4. Superexpressão gênica. I. Pereira, Silma Regina Ferreira. II. Título.

VANESSA RIBEIRO MOREIRA

**ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (GLUCANTIME[®]) CAUSA DANOS
AO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO E INDUZ SUPEREXPRESSION
DE GENES ENVOLVIDOS NA DEFESA ANTIOXIDANTE E REPARO
DO DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós- Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão,
como requisito parcial para obtenção do título de Doutora
em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Denise Crispim Tavares
Universidade de Franca

Profa. Dra. Ana Lúcia Abreu Silva
Universidade Estadual do Maranhão

Profa. Dra. Conceicao de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Carlos Henrique Nery Costa
Universidade Federal do Piauí

“Até aqui nos ajudou o Senhor.”

1 Sm 7, 12

Dedico
Ao meus pais, Adalberto Moreira e
Eudes Miranda Ribeiro Moreira.

AGRADECIMENTOS

- Meu **DEUS**, quero agradecer a Ti pela tua bondade e misericórdia derramada sobre mim e por guiar **SEMPRE** os meus passos. A Ti toda honra e glória hoje e sempre! **MUITO OBRIGADA!**
- Aos meus pais, **Eudes e Adalberto**, pelo amor incondicional e por todo apoio e incentivo recebido. Essa conquista é nossa! Amo vocês!
- Ao **Marcio Dias**, pela compreensão, amor e apoio concedidos quando mais precisava. Te amo!
- **Aos meus familiares e amigos**, que de perto ou de longe, torceram por mim e me fortaleceram em mais essa conquista.
- À minha querida **ORIENTADORA**, Profa. Silma, que durante esses 10 anos de convivência sempre foi exemplo de dedicação no ensino, pesquisa e extensão nesta Universidade. Obrigada pelos incentivos diários, por toda confiança, carinho e amizade!
- Ao meu querido amigo **Luis Cláudio**, que abdicou de muitos finais de semana para colaborar na execução dessa tese. Sua amizade é de grande estima pra mim!
- À Profa. **Mayara Ingrid**, pelas valiosas contribuições ao longo desse trabalho e pela disponibilidade de sempre ajudar a todos no laboratório. Obrigada pela sua amizade!
- **Perlinha, Carol, Marta, Vera e Santana** obrigada pela amizade, carinho e o apoio de **SEMPRE!**
- **A todos os amigos do LabGeM**, pelo apoio e convivência maravilhosa que temos e em especial a **Raissa, Hugo, Muryllo, Augusto, Eric, Fabrício** que muito contribuíram na preparação e realização dos experimentos.
- **Ao Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferraz Coelho (UFMG)** pelo estágio concedido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Estudo das Leishmanioses e por todo aprendizado adquirido.
- **Ao prof. Dr. Lidio Gonçalves Lima Neto** e ao **Matheus Silva** pela ajuda na padronização dos experimentos de carga parasitária.
- Ao Laboratório de Imunofisiologia, em especial, **a profa. Dra. Lucilene Amorim** pelas sugestões no início desse trabalho e **Douglas**, pela ajuda nos experimentos com *Leishmania*.

- **Ao prof. Dr. Marcus Paes** pela parceria Lefisio -LabGeM e pelas valiosas sugestões no desenvolvimento dessa tese. Em nome do Lefisio, agradeço também a **Bruno Araújo** por toda ajuda nos experimentos e análise de dados.

- **A CAPES**, pela concessão da bolsa.

- **À FAPEMA**, pelo apoio financeiro ao projeto.

- **À Universidade Federal do Maranhão**, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

- **Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade.**

RESUMO

Leishmaniose é uma doença negligenciada causada por mais de 20 espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. Antimoniais pentavalentes são os fármacos normalmente utilizados para o tratamento das leishmanioses e, dentre estes, o Glucantime[®] é a droga de primeira escolha recomendada pela Organização Mundial de Saúde. São bastante conhecidos seus efeitos tóxicos, inclusive como indutor de danos genéticos. Entretanto, o mecanismo pelo qual o fármaco exerce seu efeito genotóxico ainda não está elucidado. Nesse sentido, investigamos o mecanismo pelo qual o Glucantime[®] causa danos ao DNA em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (Leishmania) infantum*, com regime de tratamento de 20mg/kg/dia durante 20 dias. Danos ao DNA foram avaliados pelo ensaio do cometa usando leucócitos de sangue periférico e, para avaliação de danos oxidativos, o ensaio do cometa foi seguido pelo tratamento com as enzimas formamidopirimidina-DNA-glicosilase (Fpg) e endonuclease III (ENDO III), que reconhecem e retiram bases púricas e pirimídicas oxidadas do DNA. O potencial mutagênico da droga foi investigado pelo teste do micronúcleo em células de medula óssea. As consequências do processo oxidativo foram medidas pela atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Além disso, avaliamos a expressão de genes relacionados à defesa antioxidante (*GSS*, *GSTP1*, *GPx1*, *SOD1*, *SOD2* e *CAT*) e ao sistema de reparo do DNA (*OGG1* e *MTH1*). Nossos dados demonstraram que o Glucantime[®] causa danos ao DNA em células de mamíferos pela oxidação das suas bases nitrogenadas. O aumento da frequência de células micronucleadas nos animais sob tratamento com o antileishmanial revelou que a instabilidade genômica foi fixada em mutações. Além disso, o Glucantime[®] induziu a superexpressão de genes relacionados a defesa antioxidante, bem como dos genes *OGG1* e *MTH1*, que atuam no mecanismo de reparo de danos ao DNA ocasionados por oxidação de bases nitrogenadas. Os nossos dados revelaram também que a infecção por *L. infantum* e o tratamento com o antimonial aumentou significativamente a atividade enzimática no eixo SOD-CAT, enquanto que o eixo SOD-GPx foi inibido, provavelmente, pela depleção de glutathione. Assim, nossos dados sugerem que o antimonial Glucantime[®] compromete a atividade da GPx levando a saturação do sistema antioxidante e causa danos ao DNA por estresse oxidativo. Esses achados foram corroborados pela redução dos danos genéticos pelo co-tratamento com o ácido ascórbico, um potente antioxidante. Finalmente, demonstramos que o efeito estressante do Glucantime[®] dispara uma resposta molecular nas células de mamíferos, modulando positivamente a expressão de genes relacionados ao reparo do DNA e à defesa antioxidante.

Palavras chaves: Antileishmanial; Genotoxicidade; Defesa antioxidante; Superexpressão gênica

ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by more than 20 species of parasites of the *Leishmania* genus. Pentavalent antimonials are the drugs commonly used for the treatment of leishmaniasis and among them Glucantime[®] is the first choice drug recommended by the World Health Organization. Its toxic effects are well known, including as genetic damage inducing. However, the mechanism of its genotoxic effect has not been elucidated yet. Given this, we investigated the mechanism by which Glucantime[®] causes damage to DNA in BALB/c mice infected with *Leishmania (Leishmania) infantum*, treated with 20mg/kg/day during 20 days. Damage to DNA have been assessed by the comet assay using peripheral blood leukocytes and for assessment of oxidative damage, the comet assay was followed by treatment with the enzymes formamidopyrimidine-DNA-glycosylase (Fpg) and endonuclease III (ENDO III), which recognize and remove oxidized purines and pyrimidines of DNA. The mutagenic potential of the drug was investigated by the micronucleus test in bone marrow cells. The consequences of the oxidative process were measured by the activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx). In addition, we evaluated the expression of genes related to antioxidant defense (*GSS*, *GSTP1*, *GPx1*, *SOD1*, *SOD2* and *CAT*) and to the DNA repair system (*OGG1* and *MTH1*). Our data demonstrated that Glucantime[®] causes damage to DNA in mammalian cells by oxidating the nitrogenous bases. The increased frequency of micronucleated cells in animals treated with antileishmanial revealed that the genomic instability was fixed in mutations. In addition, Glucantime[®] induced overexpression of genes related to the antioxidant defense, as well as the genes *OGG1* and *MTH1*, that work in the DNA repair mechanism of damage caused by oxidation of nitrogen bases. Our data also revealed that infection by *L. infantum* and the treatment with antimonial significantly increased the enzymatic activity in the SOD-CAT axis, while the SOD-GPx axis was inhibited, probably by the depletion of glutathione. Thus, our data suggests that the antimonial pledges to GPx leading to saturation of the antioxidant system and causes damage to DNA through oxidative stress. These findings were supported by the reduction of genetic damage thought a treatment combined with ascorbic acid, a potent antioxidant. At last, we demonstrated that the stressfull effect of Glucantime[®] triggers a molecular response in mammalian cells, positively modulating the expression. Of genes related to DNA repair and antioxidant defense.

Keywords: Antileishmanial; Genotoxicity; Antioxidant defense; Genic overexpressions.

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIATURAS

8-oxoG – 8-oxiguanina

ACR2 – arsenato redutase

ALT- aspartato alanintransferase

AST- aspartato aminotransferase

ATP- adenosina trifosfato

CAT- catalase

CO- carbonil

CREDIP - Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias

DSB –quebra em fita dupla

DNA- ácido desoxirribonucléico

ENDO III- endonuclease III

Fpg- formamidopirimidina DNA- glicosilase

CG- citosina/guanina

GPx- glutationa peroxidase

GSH- glutationa

GSSG- glutationa oxidada

GTP- guanosina trifosfato

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

LC- Leishmaniose cutânea

LCM – Leishmaniose mucocutânea

LV- Leishmaniose visceral

MDA- malondialdeído

MN- micronúcleo

NCE- eritrócito normocromático

NMG- meglumina

O₂ – oxigênio

OH· – radical hidroxila

PCE- eritrócito policromático

RNS- Espécies reativas de nitrogênio

ROS – Espécies reativas de oxigênio

SOD- superóxido dismutase
SSB – quebra em fita simples
TBA- ácido tiobarbitúrico
TDR1- redutase tiol dependente
TR- tripanotona redutase
UF- unidade federativa
WHO- Worl Health Organization
AP- apurínico-apirimidínico
OGG1- 8-oxoguanina DNA glicosilase 1
MUTYH- muty DNA glicosilase
pH- potencial hidrogeniônico
8-oxo-dGMP- 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-monofosfato
8-oxo-dGTP - 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina 5'-trifosfato
NADPH- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
 O_2^- - ânion superóxido
 $NO\cdot$ - óxido nítrico
 NO_2 - dióxido de nitrogênio
 $ONOO^-$ - peroxinitrito
MnSOD- superóxido dismutase dependente de manganês
CuZnSOD- superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
FeSOD- superóxido dismutase dependente de ferro
MTH1- mutT homólogo 1

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1: Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp.....	5
FIGURA 2: Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2013.....	6
FIGURA 3: Casos de Leishmaniose Visceral por UF de infecção, Brasil, 2015.....	7
FIGURA 4: Estrutura química proposta do Glucantime® na sua forma comercial.....	11
FIGURA 5: Modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.....	13
FIGURA 6: Redução do oxigênio molecular (O ₂) na mitocôndria, até a formação de água.....	18
FIGURA 7: Integração dos sistemas de defesa enzimático.....	21
FIGURA 8: Estrutura molecular do ácido ascórbico.....	22
FIGURA 9: Estrutura molecular da vitamina E.....	22
FIGURA 10: Estrutura molecular da glutathione.....	23
FIGURA 11: Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas.....	24
FIGURA 12: Etapas da peroxidação lipídica.....	25
FIGURA 13: A base 8-oxoG formada a partir da oxidação da guanina pela ação de ROS.....	26
FIGURA 14: Vias de reparo da 8-hidroxiguanina pela ação das enzimas MTH1, OGG1 e MUTYH.....	28

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	3
2.1 Leishmaniose.....	4
2.2 Ciclo de vida do parasita	4
2.3 Leishmaniose visceral.....	5
2.3.1 Epidemiologia.....	5
2.3.2 Aspectos clínicos.....	8
2. 4 Tratamento.....	9
2.4.1 Antimoniais.....	9
2. 4. 1. 1 Processo de síntese e estrutura dos antimoniais pentavalentes.....	10
2. 4. 1. 2 Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes.....	11
2.4.1.3 Farmacocinética dos antimoniais pentavalentes.....	14
2.4.1.4 Toxicidade dos antimoniais.....	15
2. 4. 2 Não antimoniais: drogas de segunda escolha.....	16
3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	18
3.1 Defesa Antioxidante.....	19
3.1.1 Defesa antioxidante enzimática.....	20
3.1.2 Defesa antioxidante não enzimática.....	21
3.2 Danos oxidativos causados por ROS.....	23
3.2.1 Dano a proteínas.....	23
3.2.2 Dano a lipídios.....	24
3.2.3 Dano ao DNA.....	25
3.2.3.1 Mecanismo de reparo no DNA.....	27

4 ENSAIOS DE GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE.....	28
4.1 Ensaio Cometa.....	28
4.2 Teste do micronúcleo.....	30
5 HIPÓTESE.....	32
6 OBJETIVOS.....	33
6.1 Objetivo geral.....	33
6.2 Objetivos específicos.....	33
7 RESULTADOS.....	34
7.1 CAPÍTULO I – Artigo 1.....	34
7.2 CAPÍTULO II- Artigo 2.....	45
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
9 REFERÊNCIAS.....	70
ANEXOS.....	87

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida; Família Trypanosomatidae) e são consideradas como uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes no mundo (LOZANO et al., 2012; MURRAY et al., 2012, PIGOTT et al., 2014). Representam um grande problema de saúde pública em diversos países do mundo, sendo consideradas endêmicas em 98 países, com a maioria dos casos ocorrendo, principalmente, em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento (WHO, 2017).

Os sinais clínicos da doença compreendem um conjunto de manifestações viscerais ou tegumentares provocadas pela infecção de espécies e, no Brasil, é considerada uma zoonose na qual todas as espécies do gênero são transmitidas pela picada de fêmeas infectadas de dípteros da subfamília *Plebotominae*, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia*, no Novo Mundo, e *Plebotomus*, no Velho Mundo (MONTEIRO et al., 2005).

Os medicamentos disponíveis para o tratamento da leishmaniose são limitados, sendo atualmente restrito a duas linhas de medicamentos: os antimoniais (estibogluconato de sódio ou Pentostam[®] e o antimoniato de meglumina ou Glucantime[®]) e os não-antimoniais (pentamidina, anfotericina B, paromomicina e miltefosine). Os antimoniais são a primeira escolha no tratamento das leishmanioses há mais de sete décadas, sendo o esquema terapêutico composto por doses de 20 mg/Kg/dia por injeções intramusculares em ciclos de 20 a 30 dias (BRASIL, 2014).

Diversos são os efeitos colaterais associados ao uso dos antimoniais, a saber: urticária, dores abdominais, letargia, náuseas além de cardiotoxicidade, pancreatite, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (GUERIN et al., 2002; CROFT et al., 2006; LLANOS-CUENTAS et al., 2008; SADEGHIAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, Lima et al. (2010) relataram atividade genotóxica *in vivo* mas o mecanismo de ação do fármaco ainda é desconhecido. Tem sido sugerido que Sb^V atue como pró-fármaco, sendo reduzido a sua forma mais ativa e tóxica, Sb^{III} (BRAHMACHARI et al., 1924; SERENO et al., 1998). Acredita-se ainda que o Sb^{III} forma complexos estáveis com os principais tióis intracelulares e atua inibindo a ação de enzimas, tais como a tripanotona redutase, essencial na regulação do

equilíbrio de tiol, bem como na defesa contra o estresse oxidativo (YAN et al., 2003; WYLLIE et al., 2004). Trabalho realizado por Cantanhêde et al. (2015) demonstrou que compostos antioxidantes, as isoflavonas, conseguiram reverter o dano ao DNA, sugerindo a oxidação como um dos mecanismos de ação da droga sobre o material genético. Nesse sentido, neste trabalho propomos investigar se a geração de espécies de oxigênio estava envolvida na indução de instabilidade genômica e mutações, bem como entender como as células de animais infectados por *Leishmania infantum* e tratados com o antileishmanial respondiam a esses agentes estressores.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Leishmaniose

Leishmaniose é uma das seis doenças tropicais negligenciadas mais importantes do mundo, com estimativa de 700.000 a 1 milhão de novos casos diagnosticados e 20.000 a 30.000 mortes por ano. É considerada endêmica em mais de 98 países ocorrendo principalmente em regiões tropicais e subtropicais menos favorecidas, tais como África, Ásia e América Latina (PIGOTT et al., 2014; WHO, 2017). É causada pelo protozoário *Leishmania*, que se multiplica em certos vertebrados que funcionam como reservatórios. O parasita é transmitido aos seres humanos através da picada de fêmeas de flebotomíneos que realizaram repasto sanguíneo em um reservatório infectado. As manifestações clínicas da doença, no entanto, dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro (HALDAR et al., 2011).

São reconhecidas três formas clínicas de leishmaniose: 1) a forma mais comum chamada leishmaniose cutânea ou tegumentar (LC) que causa lesões ulcerosas na pele, e os pacientes respondem bem ao tratamento; 2) leishmaniose mucosa ou mucocutânea (LCM), que leva a destruição parcial ou total das mucosas do nariz, boca e garganta, produzindo lesões ulcerativas e desfigurantes e, 3) leishmaniose visceral (LV) ou calazar, que é a forma mais grave e acomete o sistema fagocítico mononuclear, comprometendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo do paciente sendo invariavelmente fatal, quando não tratada (REITHINGER et al., 2007; DAHER et al., 2009; WHO, 2017).

Existem cerca de 30 espécies conhecidas de *Leishmania*, das quais aproximadamente 21 infectam o homem, podendo ocasionar doenças. As espécies de *Leishmania* encontradas nas Américas pertencem a dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. No subgênero *Leishmania*, estão representadas as espécies que são responsáveis pela forma cutânea - *Leishmania (L.) mexicana* e *Leishmania (L.) amazonensis* e pela forma visceral- *Leishmania (L.) infantum*. Por sua vez, o subgênero *Viannia* compreende as espécies *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) lainsoni*, *Leishmania (V.) panamensis* responsáveis por causar lesões cutâneas e mucosas (SHAW, 1994; MARCILI et al., 2014).

Os insetos vetores são dípteros da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, na Europa, Ásia e África, e *Lutzomyia*, nas Américas. No Brasil, são popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira e flebótomo. Estes insetos são pequenos, medindo cerca de 2 a 4mm de comprimento, possuem o corpo coberto de pêlos finos e são de coloração clara. São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento, ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Estes insetos, na fase adulta, estão adaptados a diversos ambientes, porém na fase larvária desenvolvem-se em ambientes terrestres úmidos e ricos em matéria orgânica e de baixa incidência luminosa. Ambos os sexos necessitam de carboidratos como fonte energética e além disso, as fêmeas alimentam-se de sangue para o desenvolvimento dos ovos (NEUBER, 2008; BRASIL, 2014).

2.2 Ciclo de vida do parasito

Os parasitos do gênero *Leishmania*, são heteroxênicos, necessitando de um hospedeiro vertebrado e outro invertebrado para completar o seu ciclo biológico. Possuem duas formas evolutivas: a promastigota, presente no hospedeiro invertebrado, e a forma amastigota, de desenvolvimento intracelular obrigatório nos hospedeiros vertebrados (BATES, 2008; ALCOLEA et al., 2010).

As amastigotas são formas intracelulares arredondadas, com aproximadamente 10µm diâmetro, núcleo oval grande e excêntrico e vivem nos macrófagos dos hospedeiros vertebrados. As promastigotas, por sua vez, são formas extracelulares, alongadas e móveis encontradas no trato digestivo do inseto vetor. Todas as formas apresentam uma organela chamada cinetoplasto (kDNA) e multiplicam-se por divisão binária (AWASTHI et al., 2004; BESTEIRO et al., 2007).

O ciclo biológico inicia-se quando as formas infectantes (promastigotas metacíclicas) inoculadas na pele do hospedeiro, durante o repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneo infectadas, são internalizadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear. Dentro do fagolisossomo, transformam-se em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária. Após intensa multiplicação, ocorre o rompimento das células infectadas e subsequente infecção de outras células fagocíticas. Durante o repasto sanguíneo, um novo vetor flebotomíneo, ainda

não infectado, pode ingerir células infectadas do hospedeiro mamífero contaminado e que contenham formas amastigotas do parasito. No trato digestivo médio do inseto ocorre o rompimento dos macrófagos e liberação destas formas, que se diferenciam em promastigotas em aproximadamente 13 a 15 horas. As formas promastigotas multiplicam-se por divisão binária e transformam-se em paramastigotas que colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo até se diferenciarem em formas infectantes - promastigotas metacíclicas, reiniciando assim o ciclo (BESTEIRO et al., 2007; CHAPPUIS et al., 2007) (Figura 1).

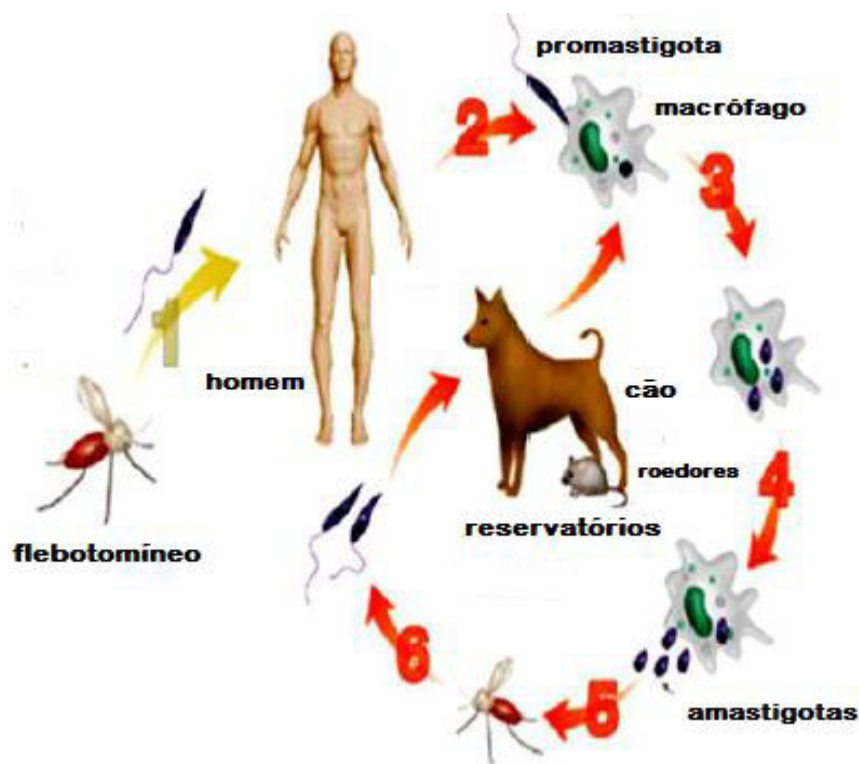


Figura 1: Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Fonte: Kumar e Engwerda, 2014 (com adaptações).

2.3 Leishmaniose visceral

2.3.1 Epidemiologia

Leishmaniose visceral é uma doença endêmica em diversos países (Figura 2), com casos humanos relatados em regiões tropicais e subtropicais. A incidência anual estimada é cerca de 500.000 novos casos de LV em cada ano em todo o mundo e mais de 90% dos casos de LV ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul, Sudão, Quênia e Somália (WHO, 2017).

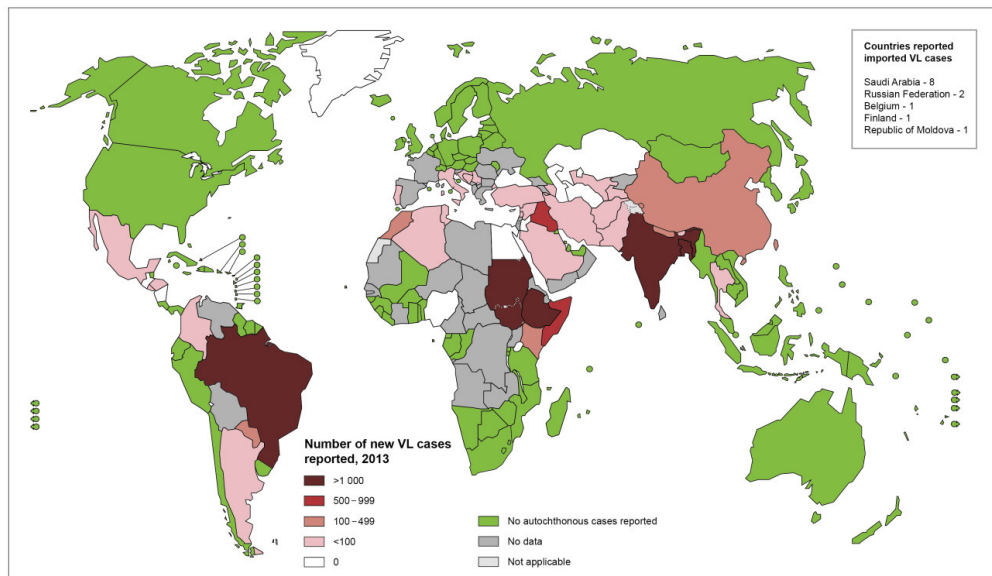


Figura 2: Distribuição mundial da leishmaniose visceral, 2013. Fonte: WHO, 2017.

O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone identificou o parasito em material de necropsia de paciente oriundo do município de Boa Esperanca, atual estado do Mato Grosso do Sul. Em 1934, com os estudos de Penna, confirmou-se que a doença era autóctone e de alta prevalências nas Américas. Dois anos depois, Evandro Chagas realizou, por meio de punção esplênica, o primeiro diagnóstico *in vivo* da doença em humanos, classificando *Leishmania chagasi* como uma nova espécie do gênero *Leishmania* (CHAGAS et al., 1937).

A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém com maior frequência em crianças até 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de cinco anos. A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular associado com maiores taxas de deficiência nutricional, comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (BRASIL, 2013).

De acordo com o Ministério da Saúde, dos 27 estados brasileiros, 22 já notificaram casos autóctones da enfermidade em humanos, principalmente nas regiões norte, sudeste e nordeste, com mais de 1.600 municípios apresentando casos da doença. Tem-se que em 26 anos de notificação (1990-2015), os casos de LV somaram 81.722 casos, sendo que 52,3% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí (Figura 3) (BRASIL, 2017).

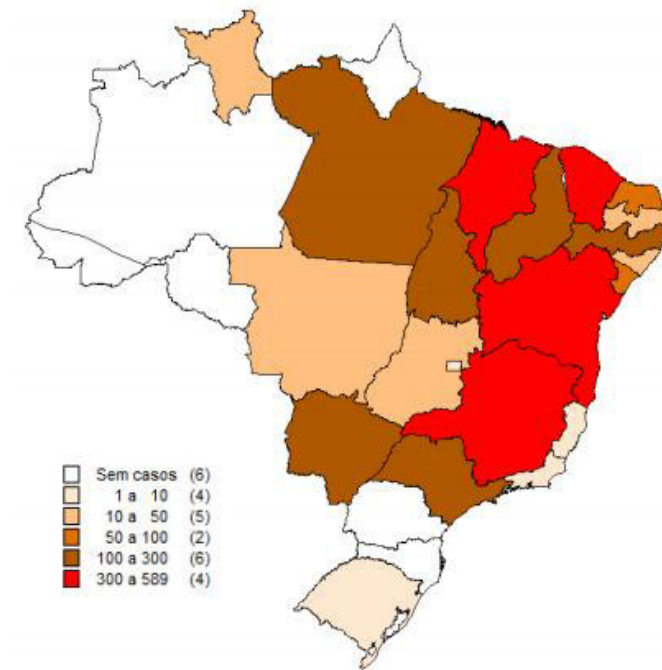


Figura 3: Casos de Leishmaniose Visceral por UF de infecção, Brasil, 2015. Fonte: SVS/MS

Considerando o Nordeste do Brasil, o Maranhão apresenta-se como um estado endêmico de leishmaniose visceral. O primeiro caso da doença no Maranhão foi diagnosticado no ano de 1934 e desde o ano de 1982, no qual quatro crianças de uma mesma família residente na periferia de São Luís foram diagnosticadas com a doença, instalou-se uma situação epidêmica com expansão da doença para outras áreas da ilha de São Luís, tais como Paço do Lumiar e São José de Ribamar (COSTA et al., 1995).

No trabalho realizado por Coutinho et al. (2012), verificou-se que a LV está presente em todas as mesorregiões do Estado do Maranhão e é elevado o número de municípios que são classificados como de transmissão intensa. Dessa forma, o Maranhão ainda se constitui

como o Estado com o maior número de casos confirmados de leishmaniose visceral, tendo como municípios de maior notificação: Imperatriz, Timon, Caxias e Codó.

Em relação ao número de óbitos por leishmaniose visceral no período de 2000 a 2015, foram notificados ao Sistema Nacional de Agravos Notificáveis (SINAN) 3690 óbitos no país. Destes, 1850 (50,1%) na região Nordeste, e o Maranhão apresentou 452, o que representa 24,4% do total de óbitos na região, colocando o estado do Maranhão na primeira posição dentre os estados da região Nordeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

De acordo com o levantamento realizado por Silva et al. (2015), foram atendidas no Centro de Referência em Doenças Infecciosas e Parasitárias (CREDIP) no ano de 2012, 27 casos de LV ocorridos na Ilha de São Luís, sendo assim distribuídos: 17 no município de São Luís, 5 em São José de Ribamar, 3 em Paço do Lumiar e 2 no município de Raposa. Observou-se um aumento na ocorrência de LV no ano seguinte, no qual foi notificado a ocorrência de 60 casos, sendo 35 em São Luís, 14 em São José de Ribamar, 8 em Paço do Lumiar e 3, em Raposa. Em ambos os anos, a faixa etária que apresentou maior representatividade foi 0-23 meses, com 33,3% e 31,6% em 2012 e 2013, respectivamente.

2.3.2 Aspectos clínicos

A sintomatologia da LV é caracterizada por um conjunto de manifestações clínicas que podem levar à morte, caso o paciente não seja tratado. A evolução clínica é um processo contínuo que pode ser dividido em três períodos: período inicial, de estado e final. O período inicial, também chamada de “agudo”, corresponde ao início da sintomatologia, que varia de acordo com cada paciente, mas geralmente inclui palidez cutâneo-mucosa, hepatoesplenomegalia e febre com duração inferior a quatro semanas, sendo este o sintoma mais presente nessa fase da doença. No período de estado o quadro clínico apresenta-se comprometido, geralmente com mais de dois meses de evolução, caracterizado por febre irregular, geralmente associada a emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia (PASTORINO et al., 2002; BRASIL, 2014).

A doença evolui progressivamente para o período final, caso não seja feito o diagnóstico e tratamento. Os pacientes apresentam febre contínua e comprometimento mais

intenso do estado geral. Nesta fase, instala-se a desnutrição (cabelos quebradiços, cílios alongados e pele seca) com edema dos membros inferiores. Outras manifestações importantes incluem hemorragias (epistaxe, gengivorragia e petéquias), icterícia e ascite. Nestes pacientes, o óbito geralmente é determinado por infecções bacterianas (principalmente *Stafilococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) e/ou sangramentos sendo as crianças mais suscetíveis a episódios de pneumonia (BRASIL, 2014).

2.4 Tratamento

2.4.1 Antimoniais

Os medicamentos de primeira escolha utilizados no tratamento das leishmanioses são constituídos a base de antimônio e, embora conhecidos desde a Antiguidade, os antimoniais foram utilizados para uso clínico em 1912, quando o médico brasileiro Gaspar Vianna, pesquisador pioneiro em doença de Chagas e leishmaniose, obteve pela primeira vez, sucesso com tratamento da leishmaniose cutânea, usando o tártaro emético (antimônio trivalente) (RATH et al., 2003; AMATO, 1998).

O tártaro emético foi por muitos anos eficaz no tratamento de todos os tipos de leishmaniose. No entanto, apresentava elevada toxicidade, graves efeitos colaterais, tais como intolerância gastrintestinal e efeitos cardiotoxicos, além de ter difícil administração e recidivas recorrentes. Assim, a partir da década de 40, os antimoniais trivalentes foram substituídos por compostos menos tóxicos, os complexos de antimônio pentavalente, que são considerados 10 vezes menos tóxicos que os trivalentes (MARSDEN, 1985; RATH et al., 2003; MAYRINK et al., 2006).

O primeiro composto pentavalente foi desenvolvido por Brahmachari em 1920, a uréia estibamina. Ano depois, em 1936, Schmidt introduziu um antimonial pentavalente mais estável, o estibogluconato de sódio conhecido comercialmente como Solustibosan® (Bayer) ou Pentostam® (Glaxo Wellcome), enquanto o antimoniato de meglumina, comercializado como Glucantime®, surgiu na França como medicamento alternativo, em 1945, durante a segunda guerra mundial (CROFT e YARDLEY, 2002; RATH et al., 2003).

Atualmente, os fármacos disponíveis para tratamento da leishmaniose incluem os antimoniais estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina

(Glucantime[®]). Apenas este último é comercializado no Brasil e é considerado pela Organização Mundial de Saúde, a droga de primeira escolha no tratamento há mais de sete décadas, apresentando alta eficácia em todos os tipos de leishmanioses (LLANOS-CUENTAS et al., 2008; FRÉZARD et al., 2009).

No Brasil, a droga é fornecida pelo Ministério da Saúde e apresenta-se em ampolas de 5mL contendo 1.5g de antimoniato de N-metil glucamina, equivalentes a 405mg (81mg/mL) de antimônio pentavalente (Sb^V). O esquema terapêutico é composto por doses de 20 mg Sb^V /Kg/dia ministrado por injeções intramusculares ou intravenosas para a forma visceral. Para a forma cutânea, é recomendada a dose variando entre 10 e 20mg Sb^V /kg/dia, sugerindo-se 15mg Sb^{+5} /kg/dia, tanto para adultos quanto para crianças, durante 20 dias seguidos. Na forma mucocutânea, a dose recomendada é de 20mg Sb^V /Kg/dia durante 30 dias seguidos, preferencialmente em ambiente hospitalar (BRASIL, 2014).

2.4.1.1 Processo de síntese e estrutura dos antimoniais pentavalentes

O Glucantime[®] é patentiado pela empresa francesa Rhône Poulenc e o seu processo de síntese ocorre a partir de $SbCl_3$ ou $SbCl_5$. Este último é dissolvido em clorofórmio a baixa temperatura e a fase orgânica é então misturada com a solução aquosa do ligante; enquanto para produção de $SbCl_3$, ocorre primeiro a oxidação por H_2O_2 e o produto Sb^V é misturado com N-metil-D-glucamina (RATH et al., 2003).

Outros novos processos sintéticos têm sido desenvolvidos para a obtenção do antimoniato de meglumina. Dois desses métodos, utilizam hexahidroxiantimoniato de potássio ($KSb(OH)_6$) como fonte de antimônio pentavalente e um, pentacloroeto de antimônio ($SbCl_5$) em uma mistura de clorofórmio:água e base orgânica a frio. Estes produtos obtidos de forma sintética vêm sendo aplicados em diferentes estudos, uma vez que a análise dos mesmos mostrou similaridade com o fármaco comercial (Glucantime[®]), facilitando estudos acadêmicos mais extensos sobre o antimoniato de meglumina e colaborando com a aceleração e desenvolvimento de novas terapias alternativas (DEMICHELI, 1999; DEMICHELI et al., 2003; DEMICHELI e FRÉZARD, 2005).

Em relação à sua estrutura química, Headley et al. (1995) propuseram que o antimoniato de meglumina corresponde a duas moléculas de meglumina (NMG) coordenada

por um átomo de antimônio. Roberts et al. (1998) sugeriram a existência de uma mistura de estruturas oligoméricas de fórmula geral (NMG-Sb) n -NMG. Demicheli et al. (1999), por sua vez, sugeriram que o antimônio se liga na N- metil- D-glucamina através do oxigênio do carbono C-3.

De acordo com Demicheli et al. (2003) as moléculas de N-metil-D-glucamina ligam-se ao Sb por dois diferentes modos, sugerindo a existência de, no mínimo, dois complexos diferentes ou a existência de um complexo maior em que duas moléculas de N-metil- D-glucamina são ligadas com Sb em uma geometria assimétrica. Em um trabalho realizado por Frézard et al. (2013) utilizando espectrometria de massas e medidas de osmolaridade, foi observado que 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, 2:3 (Figura 4).

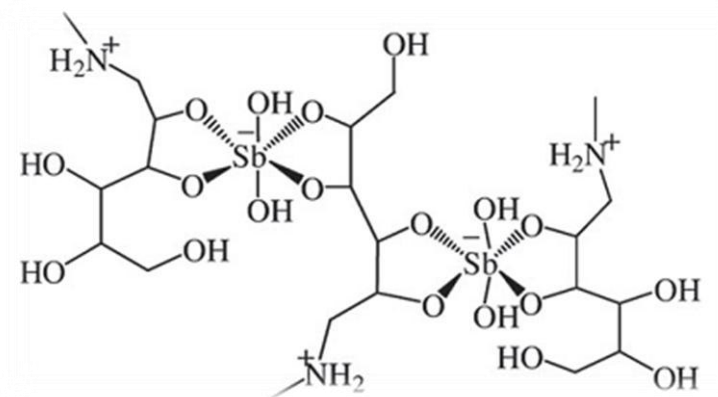


Figura 4: Estrutura química proposta do Glucantime[®] na sua forma comercial (FRÉZARD et al., 2013)

2.4.1.2 Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes

Apesar de ser usado por mais de sete décadas na terapia contra as leishmanioses, o mecanismo de ação desses compostos ainda não está totalmente elucidado (HALDAR et al., 2011; KATO et al., 2014). Os estudos iniciais sugeriram que Sb^V podia interferir no processo de β -oxidação de ácidos graxos e inibição da via da glicólise levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular nos parasitos (BERMAN et al., 1985; BERMAN et al., 1987).

Acredita-se ainda que há uma atividade intrínseca do antimônio contra a *Leishmania*, onde o mecanismo de ação do fármaco pode estar associado à formação de complexos estáveis entre Sb^{V} e ribonucleosídeo guanosina [Sb^{V} -G], que podem atuar como inibidores dos transportadores de purinas na *Leishmania* levando conseqüentemente, o parasito à morte (DEMICHELI et al., 2002).

Tem sido sugerido também que Sb^{V} é uma pró-droga, sendo convertido a Sb^{III} para exercer a sua atividade leishmanicida. Esta conversão foi inicialmente sugerida por Brahmachari et al. (1924), em um trabalho pioneiro realizado em humanos onde demonstraram que a uréia estibamina Sb^{V} era convertida no interior do corpo para sua forma Sb^{III} . A redução de Sb^{V} para Sb^{III} foi posteriormente confirmada em experimentos analíticos por Goodwin e Page (1943) e por Sereno et al. (1998), que detectaram 15 a 25% de compostos com antimônio trivalente em soro de pacientes tratados com Glucantime®. Corroborando com essa hipótese, LIMA et al. (2010), cujo trabalho demonstraram que o Glucantime® é um pró-mutágeno que necessita ser metabolizado para exercer sua atividade mutagênica. No entanto, o local desta redução (amastigota ou macrófago) e o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) permanecem controversos, pois alguns trabalhos demonstraram que a redução ocorre no interior dos macrófagos (FRÉZARD et al., 2001; SERENO et al., 2001) enquanto outros sugerem que a redução ocorra dentro do próprio parasita (EPHROS et al., 1999; SHAKED-MISHAN et al., 2001).

Em relação ao mecanismo de redução, estudos sugerem a participação de duas enzimas: redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2). A TDR1 utiliza glutathiona (GSH) como redutor e é mais expressa na forma amastigota. ACR2, por sua vez, apresenta atividade redutora tanto para arsenato pentavalente (As^{V}) como para o Sb^{V} , necessitando de GSH e glutaredoxina como co-fatores (DENTON et al, 2004; ZHOU et al, 2004). Por outro lado, tem-se que quatro diferentes tióis podem agir como agentes redutores na conversão não enzimática: GSH, tiol predominante no citosol de células de mamíferos; cisteína e cisteinil-glicina, os principais tióis presentes em lisossomos, e a tripanotona, predominante no citosol de *Leishmania* e na presença desses tióis a redução ocorre de forma mais rápida em temperatura elevada (37°C) e pH ácido (pH 5) (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; YAN et al., 2003).

Além disso, há relatos que Sb^{III} tem a capacidade de alterar o potencial redox da célula diminuindo a concentração de tióis intracelulares mediante o efluxo de formas conjugadas com o Sb^{III} e inibindo a enzima tripanotona redutase (TR) (FRÉZARD et al., 2001; FERREIRA et al., 2003; WYLLIE et al., 2004). Assim, acredita-se que Sb^{III} induza a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e/ou nitrogênio (RNS) e, conseqüentemente, o aumento do estresse oxidativo, levando ao desequilíbrio do sistema antioxidante celular (WYLLIE e FAIRLAMB, 2006; CUNNINGHAM e FAIRLAMB, 2008; BAIOTTO et al., 2009).

Outra hipótese propõe ativação do sistema imune do hospedeiro pelo Sb^{V} pois na infecção do macrófago, *in vitro*, o antimônio pentavalente age como leishmanicida. No entanto, em modelo animal, a ação do antimônio depende de citocinas e de subtipos de células T (MURRAY, 2001). Outras evidências sugerem ainda que o antimônio mata os parasitos através da indução de apoptose, envolvendo fragmentação do DNA e transporte de fosfatidilserina para o lado externo da membrana celular (SERENO et al., 2001; LEE et al., 2002; SUDHANDIRAN et al., 2003).

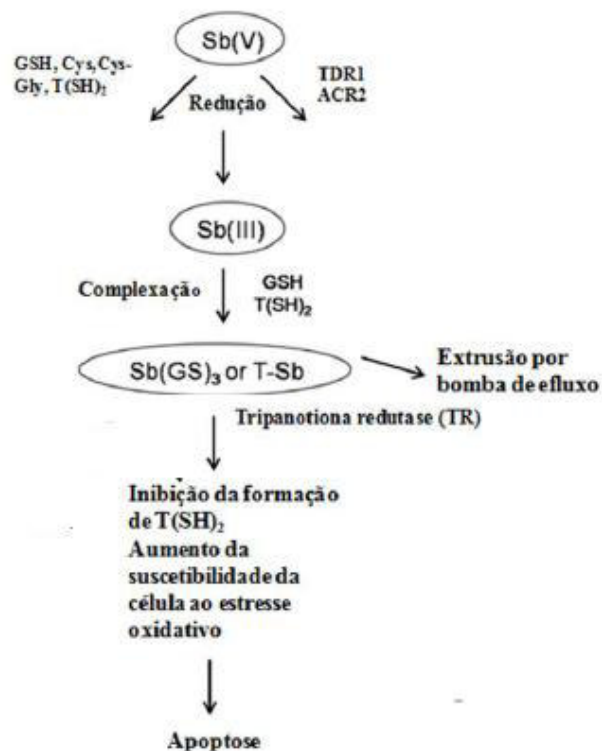


Figura 5: Modelo proposto para o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. Adaptada FRÉZARD et al., 2009.

2.4.1.3 Farmacocinética dos antimoniais pentavalentes

A farmacocinética se caracteriza, entre outros aspectos, pela construção de modelos que representam um sistema de compartimentos no organismo e nos quais se supõe que se distribui o fármaco depois de administrado. Nesse sentido, o modelo que melhor descreve a farmacocinética dos antimoniais é o modelo de dois compartimentos no qual, o primeiro é representado por um compartimento central, que inclui sangue e plasma, dentro do qual se absorve o fármaco após a aplicação e a partir do qual se excreta tanto o fármaco quanto os seus metabólitos na urina; o segundo, seria um compartimento periférico no qual o fármaco é distribuído e haveria conversão de Sb^{V} a Sb^{III} (CHULAY et al., 1988).

A farmacocinética de antimoniais pentavalentes administrados via intramuscular pode ser dividida em três fases, sendo a fase inicial de absorção com meia vida de 0,85h, seguida por uma fase de eliminação rápida com meia vida de 2,02h e finalmente, uma fase de eliminação mais lenta com meia vida de cerca de 76 h. Nesta última fase, acredita-se que ocorra a conversão da forma pentavalente para a trivalente, que é a responsável pelo efeito terapêutico e toxicidade do fármaco (CHULAY et al., 1988; VALLADARES et al., 1996; VALLADARES et al., 1998). Por outro lado, quando administrado intravenosamente, cerca de 80% do antimonial pentavalente é eliminado em até 8h e praticamente 90%, em 48 horas, tendo como principal via de eliminação a renal, principalmente por filtração glomerular. Por conseguinte, recomendam-se aplicações de doses elevadas e contínuas da medicação para que haja alto nível de antimônio tecidual na tentativa de se garantir a eficácia do tratamento (RATH et al., 2003; GIL et al., 2007).

Miekeley et al. (2002) observaram em um estudo comparando as taxas de antimônio total, Sb^{V} e Sb^{III} em diferentes fases do tratamento, que o antimônio é rapidamente eliminado do compartimento central (sangue e plasma) após descontinuação do tratamento e que, durante essa fase rápida, apenas uma pequena conversão da droga em suas espécies iônicas Sb^{V} e Sb^{III} parece ocorrer. Relatam ainda que a concentração de Sb^{III} era maior, porém, em amostras coletadas durante a fase lenta de eliminação da droga, reforçando a hipótese de que essa forma trivalente pode ser responsável pela toxicidade a longo prazo observada e pela sua ação terapêutica.

De acordo com Rath et al. (2003), o antimônio acumula-se principalmente no sangue, em órgãos vascularizados como rins e baço, sendo descrita importante afinidade do antimônio trivalente pelo eritrócito. Outros estudos têm evidenciado o acúmulo de antimônio em pele, baço e fígado de cães, coelhos e hamsters tratados com estibogluconato de sódio (BERMAN; GROGL, 1988; VALLADARES et al., 1996). Em cães tratados com Glucantime[®] por via intravenosa foi constatado o acúmulo de antimônio no fígado, baço e medula óssea (SCHETTINI et al., 2006). Poon e colaboradores (1998) mostraram que ratos expostos ao antimônio trivalente apresentaram níveis detectáveis de antimônio no baço, no fígado, nos rins, no cérebro e na gordura abdominal.

2.4.1.4 Toxicidade dos antimoniais

Em termos de toxicidade, as reações adversas mais comuns na terapia com antimoniais são mialgias e artralguas, náuseas, vômitos, febre, fraqueza, dores abdominais, cefaléia, dor no local de aplicação, tontura, palpitações, nervosismo, choque pirogênico e edema (RATH et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; SINGH; SIVAKUMAR, 2004).

Um dos efeitos tóxicos mais relevantes do Glucantime[®] é decorrente de sua ação sobre o aparelho cardiovascular. Este efeito é dose e tempo dependentes e se traduz por distúrbios de repolarização (inversão e achatamento da onda T e aumento do intervalo QTC). Após o 20.º dia de tratamento, sugere-se realizar eletrocardiograma semanal e uma cuidadosa ausculta cardíaca, diariamente, até o término do mesmo, sempre antes de cada infusão, com o objetivo de se detectar arritmias (BRASIL, 2014).

Além dos efeitos cardiotóxicos, os antimoniais podem causar também insuficiência renal aguda ou elevação dos níveis séricos de uréia e creatinina e/ou outras manifestações de nefrotoxicidade (CUCÉ et al., 1990; BALSAN; FENECH, 1992; SAMPAIO et al., 1997; DIAMENT et al., 2003). Efeitos hepatotóxicos foram relatados nos trabalhos de Lawn et al. (2005) e Lima et al. (2007) em pacientes que fizeram uso de compostos antimoniais. Em animais tratados com antimoniais, esse efeito foi observado pelo aumento no nível das enzimas hepáticas fosfatase alcalina, aspartato aminotransferase (AST) e aspartato alanintransferase (ALT) (ALKHAWAJAH et al., 1992; KATO et al., 2014).

Aumento nos níveis das enzimas pancreáticas amilase e lipase são relatadas como principais sinais de mais um efeito colateral associado ao tratamento com os antimoniais, a pancreatite (BLUM et al., 2004; LAWN et al., 2005). A anemia, a leucopenia e a plaquetopenia são reações hematológicas também descritas em pacientes tratados com antimoniais (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; NAME et al., 2005).

Atividade embriotóxica do Glucantime[®] têm sido relatada por Alkhawajah et al. (1997), que encontraram efeitos embriofetotóxicos após tratamento via intramuscular nas doses de 30, 100 ou 300 mg/Sb^V/kg. Além disso, foi relatado por Paumgarten e Chahoud (2001) o efeito embriotóxico em ratas após administração de 300 mg/Sb^V/kg. Corroborando com esse estudo, Miranda et al. (2006) também observaram o mesmo efeito desse antimonial em ratas tratadas com 150 mg Sb^V/kg por via subcutânea.

Efeitos genotóxicos foram observados com os antimoniais. No trabalho realizado por Hantson et al. (1996) linfócitos de sangue periférico de pacientes com leishmaniose visceral foram tratados com uma dose total de 42,5g de Glucantime[®] por 15 dias e analisados quanto à presença de aberrações cromossômicas do tipo trocas de cromátides irmãs e presença de micronúcleos. Observou-se que houve um aumento de 8 a 9 vezes de células micronucleadas quando comparadas ao controle negativo. Asakura et al. (2009) observaram que o antimônio apresentou-se genotóxico quando avaliado pelos testes Ames e aberração cromossômica. Lima et al. (2010) evidenciaram que o Glucantime[®] induz danos ao DNA quando avaliados em sistema *in vivo*. Lopez (2015) demonstrou que o Glucantime[®] foi capaz de causar danos ao DNA de leucócitos nas concentrações 30, 40 e 50µg/mL quando avaliados por 72 horas.

2.4.2 Não antimoniais: drogas de segunda escolha

Os graves efeitos tóxicos, a ocorrência de recidiva e resistência ou até mesmo impossibilidade de uso do antimoniato de meglumina reforça a necessidade da utilização de outras drogas com ação leishmanicida (RODRIGUES et al., 2006). Nesse sentido, o tratamento passa a ser realizado pelas drogas de segunda escolha tais como, a anfotericina B, pentamidina, paramomicina, miltefosine.

Anfotericina B desoxicolato é um antibiótico poliênico que vem sendo utilizado desde a década de 60 como tratamento de segunda escolha para leishmanioses. É usada

predominantemente como uma droga antifúngica, mas apresenta alta eficácia em cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais e em casos de leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral que não respondem ao tratamento com antimoniais (RATH et al., 2003; CROFT et al., 2006; ORDÓNEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007).

No entanto, a anfotericina B apresenta desvantagens, como administração parenteral lenta, baixa capacidade de absorção gastrointestinal e característica hidrofóbica, podendo também interagir em vias celulares de mamíferos, causando disfunções e apresenta elevada toxicidade associada com graves efeitos adversos (febre e calafrios durante a infusão, hipocalemia e queda do nível de hemoglobina) sendo seu principal efeito colateral a nefrotoxicidade. É contra-indicada em pacientes cardiopatas, hepatopatas e principalmente nefropatas mas é a droga de primeira escolha no tratamento de gestantes (MOTTA; SAMPAIO, 2012; ROY et al., 2012; BRASIL, 2014).

A pentamidina é uma diamina aromática que tem sido usada no tratamento de leishmanioses há mais de 40 anos principalmente para casos que não respondem ao tratamento com os antimoniais. A administração é por via endovenosa três vezes por semana e apresenta alta toxicidade, com relatos de morte repentina. Dentre os principais efeitos adversos ou colaterais, estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade, dor de cabeça, vômitos, náuseas diabetes (BECKER et al., 1999; ANDERSEN et al., 2005; ALMEIDA et al., 2007).

A Paromomicina é um aminoglicosídeo extraído de *Streptomyces rimosus* usado no tratamento de doenças bacterianas e quando injetado em associação com Pentostam® mostrou resultados satisfatórios no tratamento de leishmaniose visceral. Porém, a administração parenteral não apresentou resultados satisfatórios no tratamento de leishmaniose cutânea (SINGH e SIVAKUMAR, 2004), no entanto sua utilização em formulação tópica no tratamento de leishmaniose cutânea apresentou boa eficácia (SUNDAR; RAI, 2002).

Um grande avanço no tratamento da leishmaniose foi o desenvolvimento do miltefosine (ImpavidoTM), que foi aprovada em 2002 como o primeiro medicamento leishmanicida utilizado por via oral na Índia (MALTEZOU, 2010; DORLO et al., 2012). O miltefosine, um alquifosfolípídeo, foi originalmente desenvolvido como uma droga para o tratamento do câncer (CROFT e COOMBS, 2003) e sua ação contra leishmaniose foi

rapidamente reconhecida. Sua toxicidade não é tão elevada, no entanto, é extremamente teratogênica e em mulheres o tratamento é realizado em não grávidas que aceitem tomar anticoncepcionais durante e três meses após o término do tratamento (SOTO et al., 2004; SUNDAR et al., 2012).

3. ESTRESSE OXIDATIVO

Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes ocorre um desequilíbrio na homeostase celular resultando no estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; RIBEIRO et al., 2008).

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias, onde 1-2% do oxigênio é consumido e a sua completa redução à molécula de água -H₂O gera diferentes tipos de radicais livres, que são átomos ou moléculas altamente reativos que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada de valência (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; CIRCU; AW, 2010) (Figura 6).

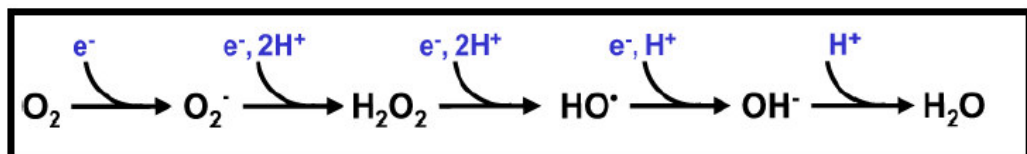


Figura 6: Redução do oxigênio molecular (O₂) na mitocôndria, até a formação de água.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) englobam uma série de espécies radicalares, tais como o ânion superóxido (O₂⁻) ou não radicalares (peróxido de hidrogênio -H₂O₂) derivadas tanto do metabolismo de oxigênio (ROS) como também do nitrogênio (RNS), representadas pelo óxido nítrico (NO·), dióxido de nitrogênio (NO₂) e peroxinitrito (ONOO⁻) e podem ser produzidas a partir de fontes endógenas e exógenas, tais como raios ultravioletas, radiações ionizantes, quimioterápicos e xenobióticos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS et al., 2007).

O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é formado pela redução do oxigênio por um único elétron, ao contrário da maioria dos radicais livres tem baixa reatividade e a partir dele outros ROS são formados. Sua reação principal é a dismutação, na qual se produz uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de oxigênio (BARREIROS et al., 2006). Tem importância vital para as células de defesa sendo gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Por sua vez, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido após a reação de dismutação do ânion superóxido é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{+2} ou Cu^{+2}), conhecida como reação de Fenton, o H_2O_2 gera o radical hidroxila ($OH\cdot$), que é altamente reativo podendo causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA e não apresenta defesa enzimática especializada. O radical hidroxila pode também ser formado pela interação do peróxido de hidrogênio com o radical superóxido através da reação de Haber-Weiss (ANDRADE JR et al., 2005; BARBOSA et al., 2010).

3.1 Defesa antioxidante

Defesas antioxidantes protegem a célula de danos causados pelas espécies reativas. Assim, o termo antioxidante pode ser considerado como qualquer substância que atrase, previna ou remova o dano oxidativo de uma molécula-alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Tais ações podem ser alcançadas por meio de três diferentes mecanismos de ação: sistemas de prevenção, impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicais; sistemas varredores, que impedem a ação dos radicais livres formados e sistemas de reparo, que atuam favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (CLARKSON; THOMPSON, 2000; KOURY; DONANGELO, 2003).

A defesa antioxidante é constituída pelos sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático compreende as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx), enquanto que os não enzimáticos incluem as

vitaminas (A, C e E) e a glutathiona (MA et al., 2008; LESGARDS et al., 2011; RAY et al., 2012).

3.1.1 Defesa antioxidante enzimática

A SOD tem papel fundamental na defesa do organismo contra ROS eliminando os radicais superóxidos gerados constantemente pela respiração aeróbia, convertendo-os em O_2 e H_2O_2 . Possui três isoformas, uma ligada aos íons cobre e zinco (CuZnSOD) presente no citoplasma; a outra, ligada aos íons mangânes (MnSOD) encontrada nas mitocôndrias e a terceira, ligada ao íon ferro, FeSOD exclusiva de tripanossomatídeos (KINNULA; CRAPO, 2004; SCANDALIOS, 2005).

A catalase está presente na maioria das células aeróbias e se encontra principalmente nos peroxissomos, sendo mais ativa nos eritrócitos, fígado, rins e músculo. É formada por quatro subunidades, onde cada uma possui um grupo heme contendo ferro em seu sítio ativo. Tem por função principal realizar a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2 (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; HERMES-LIMA, 2004).

Por sua vez, a glutathiona peroxidase catalisa a redução de hidroperóxidos, sendo conhecida duas classes distintas dessa enzima, a saber: GPx selênio dependente, que é capaz de reduzir peróxido de hidrogênio e uma variedade de outros hidroperóxidos e a GPx selênio independente, que está apta a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, exceto o peróxido de hidrogênio e são chamadas de glutathiona S-transferase. A ação da GPx na redução do peróxido de hidrogênio à água ocorre através da conversão da glutathiona reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A recuperação da GSH ocorre mediante atuação de outra enzima, a glutathiona redutase, que catalisa a conversão de GSSG a GSH, utilizando o poder de redução do NADPH, para que o co-substrato possa ser novamente utilizado pela GPx (ARTUR, 2000; DAUN; AKESSON, 2004; STAGSTED, 2006), conforme Figura 7.

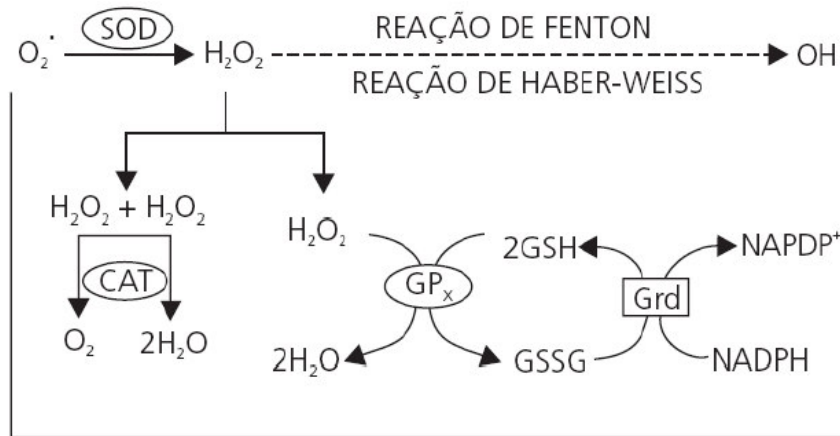


Figura 7: Integração dos sistemas de defesa enzimático. Adaptado de Barbosa et al., 2010. SOD- superóxido dismutase; CAT- catalase; GP_x - glutationa peroxidase; GSH- glutationa; GSSG- glutationa oxidada; Grd- glutationa redutase.

3.1.2 Defesa antioxidante não enzimática

O sistema antioxidante não-enzimático, inclui especialmente, os compostos antioxidantes de origem dietética tais como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) que são considerados excelentes antioxidantes capazes de seqüestrar os radicais livres com grande eficiência; e os de origem endógena, a glutationa (GSH) (BERRA et al., 2006; VALKO et al., 2006).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel obtida por meio da dieta, comumente encontrado em nosso organismo na forma de ascorbato e desempenha papéis fundamentais no organismo humano, tais como atuar no metabolismo da tirosina, ácido fólico e triptofano; síntese de carnitina, formação de neurotransmissores e absorção de ferro (Figura 8) (IQBAL et al., 2004; DUARTE; LUNEC, 2005). Além disso, o ácido ascórbico é um poderoso agente redutor e a excepcional facilidade com que essa vitamina é oxidada faz com que ela funcione como um bom antioxidante sendo capaz de proteger outras espécies químicas de possíveis oxidações (FIORUCCI et al., 2003).

Propriedades pró-oxidantes também tem sido relacionada ao ácido ascórbico, visto que na presença de íons Fe^{2+} e Cu^{1+} reagem com o peróxido de hidrogênio gerando o radical hidroxila. Indiretamente, o ascorbato pode induzir as reações de radicais livres. Porém, em situação normal, o ferro encontra-se, na maior parte do tempo, ligado a proteínas de transporte

ou armazenamento, como a ferritina e transferrinae por isso, as propriedades antioxidantes do ácido ascórbico superam suas propriedades pró-oxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; DUARTE; LUNEC, 2005).



Figura 8: Estrutura molecular do ácido ascórbico. Adaptado de Fiorucci et al., 2003.

A vitamina E (α – tocoferol) é classificada como lipossolúvel e está presente nas membranas biológicas (Figura 9). Contém em sua estrutura um grupo hidroxila através do qual reage com elétrons desemparelhados e tem como principal função conferir proteção à membrana celular por atuar como quelante dos oxidantes produzidos durante a lipoperoxidação. É um *scavenger* de radicais peroxil, sendo o mais importante inibidor de radicais livres nas reações de lipoperoxidação em animais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

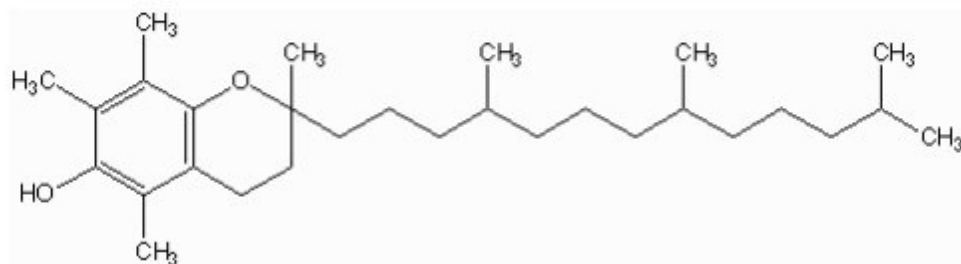


Figura 9: Estrutura molecular da vitamina E. Adaptada de Bjorneboe et al., 1990.

A glutathiona (GSH) é um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina presente em todos os mamíferos, sendo considerado o principal tiól intracelular não protéico e

atua na detoxificação dos peróxidos de hidrogênio, peróxidos orgânicos e radicais livres, na homeostase tiólica, na manutenção do balanço redox da célula (Figura 10) (REISCHL et al., 2007; HUBER et al., 2008). Além disso, a GSH é um dos principais participantes na detoxificação de xenobióticos através da sua conjugação com agentes eletrofílicos, uma reação catalisada pela enzima glutationa S-transferase (GST) e também é capaz de regenerar às suas formas reduzidas os antioxidantes, vitamina C e E (RINALDI et al., 2002).

A função antioxidante da GSH depende primariamente do seu papel como um componente das vias enzimáticas que a célula possui contra ROS, sendo substrato para a enzima glutationa peroxidase (GPx) na detoxificação de peróxidos orgânicos e de hidrogênio e pode ser encontrada no interior da célula em duas formas: oxidada (GSSG) ou reduzida (GSH), sendo que a manutenção da razão GSH:GSSG é um dos fatores determinantes do estado redox intracelular. Em situações normais a GSSG representa apenas uma pequena fração da glutationa total (menos de 10%) (JONES, 2002; TOWNSEND et al., 2003).

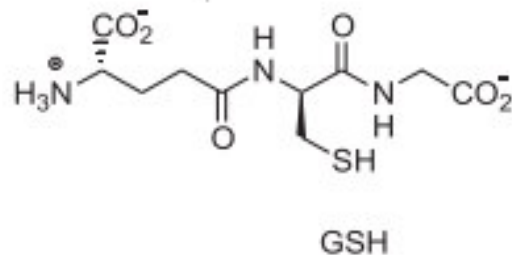


Figura 10: Estrutura molecular da glutationa. Adaptada de Huber et al., 2008.

3.2 Danos oxidativos causados pelas ROS

3.2.1 Dano a proteínas

Carbonilação é uma modificação protéica irreversível e não enzimática, na qual grupos carbonila são introduzidos nas proteínas causando mudanças conformacionais, levando a degradação dessas moléculas ou ainda conduzindo-as à apoptose. Proteínas carboniladas atuam como biomarcadores de dano oxidativo em proteínas (Figura 11) (STADTMAN; LEVINE, 2003; DALLE-DONNE et al., 2003).

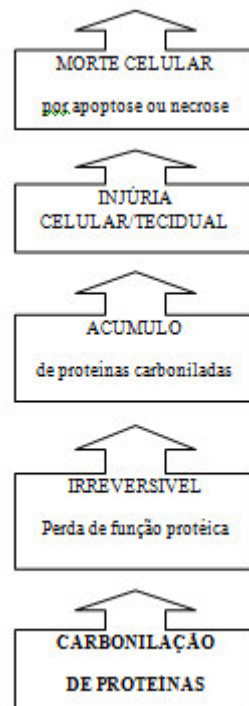


Figura 11: Possíveis efeitos da carbonilação de proteínas. Adaptada de Dalle-Donne et al., 2006.

Os grupos carbonil (CO) são produzidos nas proteínas pela oxidação da cadeia lateral de diversos aminoácidos, especialmente prolina, arginina, lisina e treonina; pela clivagem oxidativa das proteínas tanto por α amidação quanto por oxidação das cadeias laterais do glutamato e também pela reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de cisteína, histidina e lisina com aldeídos produzidos na lipoperoxidação (DALLE-DONNE et al., 2003; RUTKOWSKA et al., 2005).

As proteínas carboniladas possuem uma grande vantagem sobre a peroxidação lipídica como biomarcadores de estresse oxidativo por serem geralmente mais estáveis. Elas podem circular no sangue por períodos de tempo mais longo, quando comparada com a glutatona dissulfeto (GSSH) e malondialdeído (PANTKE et al., 1999).

3.2.2 Dano a lipídios

A lipoperoxidação é o processo pelo qual as ROS atacam os ácidos graxos poliinsaturados das membranas provocando assim alterações na sua estrutura e

permeabilidade, como perda de seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo das organelas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A espécie iniciadora mais importante da lipoperoxidação é o radical hidroxila, que interage com ácido graxo insaturado da membrana e sequestra um átomo de hidrogênio de um grupo metileno resultando na formação de um radical lipídico (L^{\bullet}) que pode reagir rapidamente com o oxigênio e formar um radical lipídico peroxila (LOO^{\bullet}) (GUARATINI et al., 2007).

Após essa etapa, tem início a fase de propagação na qual o radical lipídico peroxila sequestra um novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, formando novamente o (L^{\bullet}) (LIMA e ABDALLA, 2001). A terceira e última etapa da lipoperoxidação, a fase de terminação, ocorre quando os radicais livres (L^{\bullet} e LOO^{\bullet}) produzidos se combinam e formam um composto estável ou existe a ação de antioxidantes sobre eles (Figura 12) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

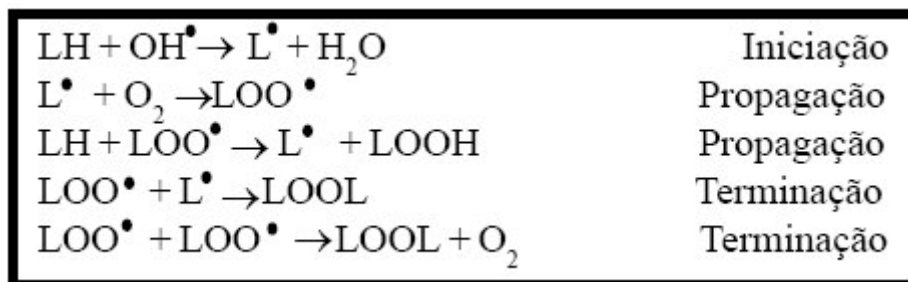


Figura 12: Etapas da peroxidação lipídica. Fonte: Ferreira e Matsubara, 1997.

Tem-se que um dos produtos mais bem conhecidos da lipoperoxidação é o malondialdeído (MDA), um composto estável que é utilizado como marcador direto de estresse oxidativo. O principal método utilizado é a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA), formando um complexo colorido que pode ser quantificado por espectrofotometria ou por cromatografia líquida de alta eficiência (CARVALHO et al., 2012).

3.2.3 Dano ao DNA

A indução de danos oxidativos nas bases do DNA ocorre a partir da sua reação com ROS. O dano oxidativo provocado pelos radicais livres no DNA pode ocorrer de forma direta, pela oxidação específica das bases nitrogenadas ou por quebras em uma das cadeias do DNA

3.2.3.1 Mecanismo de reparo no DNA

A célula apresenta diferentes mecanismos de reparo para evitar a fixação dos danos no DNA e dentre estes, o reparo por excisão de bases (Base Excision Repair - BER) é a via de reparo para lesões ao DNA por agentes oxidativos. Esta via pode ser resumida em quatro etapas: reconhecimento e remoção da base modificada ou mal-pareada, excisão do sítio abásico (apurínico-apirimidinico, AP), preenchimento do *gap* de DNA e religamento da fita reparada (ROBERTSON et al., 2009).

O reconhecimento e remoção da base danificada é catalisado por uma enzima chamada DNA glicosilase, específica para a base modificada a ser reparada. A segunda etapa é a formação do sítio abásico AP (apurínico/apirimidínico) pela ação de uma AP endonuclease ou AP liase, visto que as enzimas DNA glicosilases podem ser monofuncional, atuando apenas na remoção da base modificada e deixando um sítio AP ou bifuncional, que possui além da sua atividade de glicosilase, a atividade de liase. O *gap* gerado é re-sintetizado pela incorporação de nucleotídeos pela enzima DNA polimerase e em seguida, a ligação de novos nucleotídeos na molécula de DNA é realizado pela DNA ligase (SLUPPHAUG et al., 2003; BAUTE; DEPICKER, 2008, WILSON III et al., 2011).

A via de reparo a 8-oxoG em eucariotos é composta pelas enzimas OGG1, MUTYH e MTH1. A enzima 8-oxoguanina glicosilase (OGG1), é uma DNA glicosilase bifuncional que reconhece e remove especificamente a lesão 8-oxoG quando pareada a citosina. Contudo, se o DNA se replicar antes do reparo, a adenina poderá ser incorporada frente a 8-oxoG e nessa etapa, a MUTYH, atua removendo adenina incorporada de forma errônea na fita de DNA recém –sintetizada. Os passos subsequentes do processamento seguem como já descritos anteriormente. A enzima MTH1, previne a incorporação de 8-oxoG na fita de DNA recém sintetizada, pois são capazes de hidrolisar o nucleotídeo mutagênico- 8-oxodGTP- a 8-oxodGMP e dessa forma, não pode ser incorporado na síntese de DNA e nem sofrer uma nova fosforilação (Figura 14) (BARNES; LINDAHL, 2004; DAVID et al., 2007).

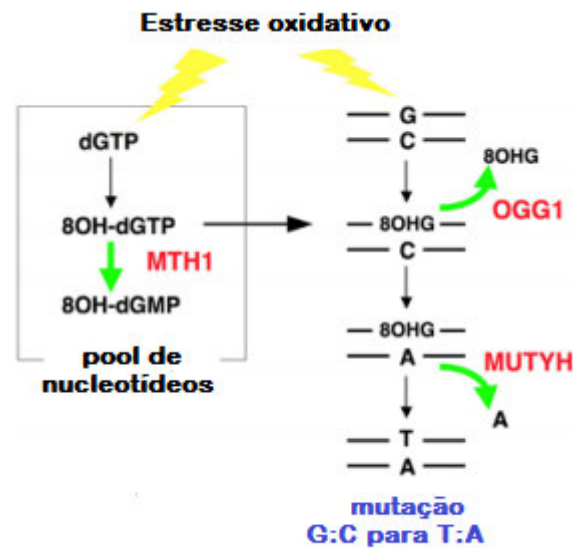


Figura 14: Vias de reparo da 8-hidroxi guanina pela ação das enzimas MTH1, OGG1 e MUTYH. Fonte: Adaptada de Shinmura et al., 2012.

4. Ensaio de Genotoxicidade e mutagenicidade

Os radicais livres, assim como diversos compostos naturais ou medicamentos, podem interagir com o DNA causando danos. Os danos podem ser eliminados pelo sistema de reparo do DNA ou podem persistir, havendo fixação de mutações. Para acessar os efeitos genotóxicos e mutagênicos de inúmeros compostos, os testes do cometa e do micronúcleo estão bem estabelecidos e indicam a extensão e gravidade da interação dos compostos estudados com DNA (WONG et al., 2005; ASARE et al., 2012).

4.1 Ensaio Cometa

O ensaio detecta alterações primárias no DNA ainda possíveis de serem eliminadas pelo sistema de reparo. Essas alterações, chamadas de danos genotóxicos, podem ou não ser fixadas no DNA resultando em uma mutação. O ensaio tem sido utilizado com sucesso na avaliação das interações entre antioxidantes e compostos genotóxicos (GROTO et al., 2009; ANGELI et al., 2010).

Basicamente existem dois protocolos principais para a execução do teste: a versão neutra, conforme o método original aprimorado por Ostling e Johanson em 1984, no qual se utiliza eletroforese em tampão de pH entre 7 e 8 para detecção de quebras duplas nas fitas de DNA e ligações cruzadas DNA-DNA, DNA-proteína, DNA-xenobiótico (OSTLING; JOHANSON, 1984); e a versão alcalina, que realiza eletroforese em pH maior que 13, desnaturando o DNA, podendo detectar quebras de fita dupla, fita simples, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletas, danos oxidativos em bases do DNA, crosslinks em DNA-DNA, DNA-proteína e DNA-xenobiótico (BOLOGNESI et al., 2004; WITTE et al., 2007).

O princípio desse interessante ensaio leva em conta o comportamento do DNA em células individualizadas e sua organização no núcleo celular. Para a realização do ensaio, as células são embebidas em agarose, suas membranas são rompidas com uso de detergentes em pH alcalino e as proteínas nucleares são removidas com uso de altas concentrações salinas. Dessa maneira, em lâmina resta apenas o nucleóide que permanece íntegro. Quando a lâmina é submetida ao campo elétrico, o DNA do nucleóide migra no gel de acordo com seu tamanho. Os fragmentos pequenos migram com uma velocidade maior que a matriz nuclear. Assim, as células com DNA danificado formam, após a migração, um aspecto de um cometa e a extensão da migração correlaciona-se diretamente com a quantidade de dano ocorrido (Figura 15) (TICE et al., 2000; LEE; STEINERT, 2003; COLLINS, 2004; BURLINSON et al., 2007).

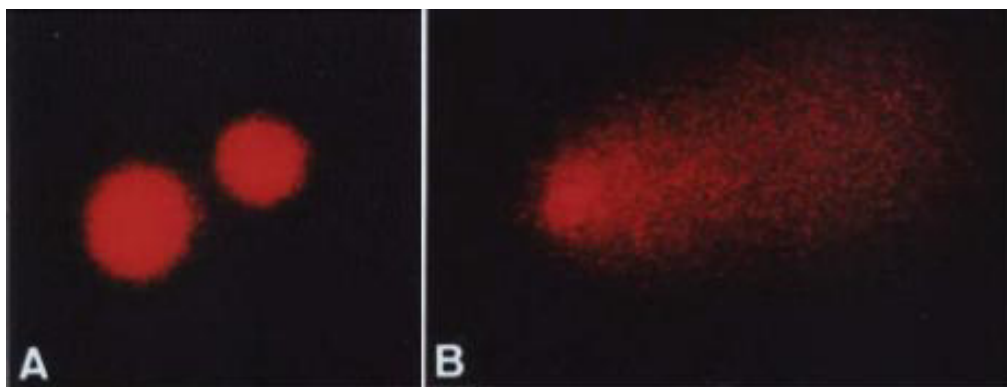


Figura 15: Fotomicrografia obtidas de células de sangue periférico de camundongo em análise em microscópio de fluorescência. A- nucleóides sem migração do DNA; B- nucleóide com cauda. Fonte: Arquivo Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM).

O ensaio cometa fornece uma informação um pouco limitada a respeito do dano ao DNA, uma vez que não é possível distinguir entre os efeitos diretos do agente genotóxicos e os efeitos indiretos, como o dano oxidativo. Entretanto, nesse caso, o tratamento dos nucleíodes com enzimas de reparação de DNA antes da eletroforese permite a identificação do tipo de dano específico causado, o que torna esse ensaio uma poderosa ferramenta na elucidação dos mecanismos genotóxicos (SAUVAIGO et al., 2002; GIONAVELLI et al., 2003). As enzimas mais empregadas estão envolvidas na remoção de danos oxidativos, como a endonuclease III (Endo III) e a formamidopirimidina DNA- glicosilase (Fpg), que detectam pirimidinas e purinas oxidadas, respectivamente (MEDINA et al., 2008; VIAU et al., 2009).

O ensaio cometa pode ser realizado tanto *in vitro* como *in vivo* e as suas vantagens incluem a aplicabilidade em diferentes órgãos, sensibilidade na detecção de baixos níveis de lesões, análise de pequeno número de células por amostra, fácil execução, curto período para conclusão dos experimentos e custo relativamente baixo (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

4.2 Teste do micronúcleo

Entre os mais bem estabelecidos ensaios citogenéticos destaca-se o teste do micronúcleo, sendo internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendados para avaliação do potencial mutagênico, para o registro de novos produtos químicos que entram no mercado mundial (FENECH, 2000; RESENDE et al., 2007).

Micronúcleos são estruturas que medem de 1/3 a 1/5 do tamanho do núcleo, contidas por envoltório nuclear e que apresentam material cromatídico distribuído de forma similar ao do núcleo. São formados durante a telófase da mitose, quando o envelope nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal. Assim, o micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural (fragmento) ou dano no aparelho mitótico revelando, portanto, a ação de agentes clastogênicos e aneugênicos (SCHMID, 1975; FENECH, 2000).

É importante ressaltar que os micronúcleos são formados durante a mitose, independentemente do tipo de dano ocorrido durante o ciclo. Por isso, os danos no DNA causados, por exemplo, pela exposição a agentes mutagênicos, somente são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular, sendo dependentes da proporção de células que estão se dividindo (FENECH et al., 1999).

Este teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos e a presença de (MN) é analisada em eritrócitos policromáticos (PCE, eritrócitos jovens) de medula óssea, mas pode, também, ser analisada em eritrócitos normocromáticos (NCE, eritrócitos maduros). Os animais são expostos à substância teste pela via mais adequada e sacrificados em tempos apropriados após o tratamento, para a coleta da medula óssea. As preparações celulares são coradas com Giemsa e analisadas para a presença de micronúcleos (Figura 16) (RIBEIRO et al., 2003).



Figura 16: Eritrócito normocromático (1) e eritrócito policromático micronucleado (2). Fonte: Arquivo Laboratório de Genética e Biologia Molecular (LabGeM).

5 HIPÓTESE

O antileishmanial Glucantime[®] induz danos ao DNA de células de mamíferos infectados por *Leishmania* por meio da geração de espécies de oxigênio, os quais disparam mecanismos moleculares de resposta celular ao estresse oxidativo.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo geral

Investigar o mecanismo pelo qual o antileishmanial Antimoniato de Meglumina (Glucantime[®]) causa danos ao DNA em células de animais infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

6.2 Objetivos específicos

- Determinar se o potencial genotóxico do Glucantime[®] está relacionado com a oxidação de bases púricas e pirimídicas do DNA.
- Analisar os efeitos do antimonial Glucantime[®] sobre a atividade de enzimas de defesa antioxidante.
- Avaliar o potencial mutagênico do Glucantime[®] em camundongos infectados.
- Avaliar a resposta celular ao tratamento com o Glucantime[®] no que diz respeito ao sistema de reparo do DNA.
- Avaliar a resposta celular ao tratamento com o Glucantime[®] no que diz respeito ao sistema de defesa antioxidante.
- Avaliar o efeito modular do ácido ascórbico sobre os danos genéticos induzidos pelo Glucantime[®].

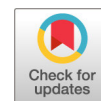
7 RESULTADOS

7.1 CAPÍTULO I: Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*

Artigo publicado na revista ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY

Qualis Medicina 1: A1

Fator de impacto: 4.415



Meglumine Antimoniate (Glucantime) Causes Oxidative Stress-Derived DNA Damage in BALB/c Mice Infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*

Vanessa Ribeiro Moreira,^{a,b} Luís Cláudio Lima de Jesus,^a
Rossy-Eric Pereira Soares,^{a,b} Luis Douglas Miranda Silva,^b
Bruno Araújo Serra Pinto,^{b,c} Maria Norma Melo,^d
Antonio Marcus de Andrade Paes,^c Silma Regina Ferreira Pereira^a

Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil; Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil^b; Laboratório de Fisiologia Experimental, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil^c; Departamento de Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil^d

ABSTRACT Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by >20 species of the protozoan parasite *Leishmania*. Meglumine antimoniate (Glucantime) is the first-choice drug recommended by the World Health Organization for the treatment of all types of leishmaniasis. However, the mechanisms of action and toxicity of pentavalent antimonials, including genotoxic effects, remain unclear. Therefore, the mechanism by which meglumine antimoniate causes DNA damage was investigated for BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* and treated with meglumine antimoniate (20 mg/kg for 20 days). DNA damage was analyzed by a comet assay using mouse leukocytes. Furthermore, comet assays were followed by treatment with formamidopyrimidine-DNA glycosylase and endonuclease III, which remove oxidized DNA bases. In addition, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) in the animals' sera were assessed. To investigate mutagenicity, we carried out a micronucleus test. Our data demonstrate that meglumine antimoniate, as well as *L. infantum* infection, induces DNA damage in mammalian cells by the oxidation of nitrogenous bases. Additionally, the antileishmanial increased the frequency of micronucleated cells, confirming its mutagenic potential. According to our data, both meglumine antimoniate treatment and *L. infantum* infection promote oxidative stress-derived DNA damage, which promotes overactivation of the SOD-CAT axis, whereas the SOD-GPx axis is inhibited as a probable consequence of glutathione (GSH) depletion. Finally, our data enable us to suggest that a meglumine antimoniate regimen, as recommended by the World Health Organization, would compromise GPx activity, leading to the saturation of antioxidant defense systems that use thiol groups, and might be harmful to patients under treatment.

KEYWORDS antileishmanial, antimony, genotoxicity, mutagenicity, antioxidant enzymes

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by >20 species of the protozoan parasite *Leishmania (Trypanosomatidae)*, which are transmitted by infected female phlebotomine sandflies. Wild and domesticated animals, and humans themselves, can act as reservoirs of infection. There are three main forms of the disease: (i) cutaneous leishmaniasis (CL), the most common form, which causes skin lesions; (ii) mucocutaneous leishmaniasis (MCL), which leads to partial or total destruction of mucous

Received 3 November 2016 Returned for modification 6 January 2017 Accepted 27 February 2017

Accepted manuscript posted online 20 March 2017

Citation Moreira VR, de Jesus LCL, Soares R-EP, Silva LDM, Pinto BAS, Melo MN, Paes AM, Pereira SRF. 2017. Meglumine antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. Antimicrob Agents Chemother 61:e02360-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02360-16>.

Copyright © 2017 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Silma Regina Ferreira Pereira, silma.pereira@ufma.br.

membranes; and (iii) visceral leishmaniasis (VL), which is fatal if not treated appropriately. It is characterized by irregular fever, weight loss, enlargement of the spleen and liver, and anemia (1).

In 2014, >90% of new leishmaniasis cases occurred in six countries: Brazil, Ethiopia, India, Somalia, South Sudan, and Sudan. In fact, visceral leishmaniasis is widely distributed around the world and is a public health problem in 88 countries. Moreover, 310 million people are at risk of infection in six countries that report >90% of VL cases worldwide. Recent epidemiological data show that of the 25 countries with high leishmaniasis burdens, 13 have high burdens of VL only, 11 have high burdens of CL only, and 1 (Brazil) has high burdens of both VL and CL. Although many people have asymptomatic infections in areas of VL endemicity, the risk of developing active infection is dramatically increased for HIV-positive patients (2).

Meglumine antimoniate (Glucantime) is a pentavalent antimony (Sb^V) recommended by the World Health Organization as the first-choice drug for the treatment of all types of leishmaniasis; the maximum dose recommended is 20 mg/kg of body weight/day via the intramuscular route, although many side effects are still reported. The most frequently reported clinical adverse effects are musculoskeletal pain, nausea, vomiting, diarrhea, abdominal pain, headache, anorexia, asthenia, fatigue, fever, exanthema, erythema, and urticaria. Moreover, patients may develop cardiac, liver, and kidney complications, usually at the end of the treatment (3). Recently, the occurrence of patients with drug resistance has been reported more often, and death by bleeding in northeastern Brazil (e.g., in Maranhão State) has been reported (unpublished data).

Although pentavalent antimonials have been used for >6 decades, the pharmacological and toxicological mechanisms involved in their action remain unclear. Berman et al. (4) and Demicheli et al. (5) proposed that this drug interferes with the bioenergetic process of *Leishmania* amastigotes, forming stable complexes with ribonucleosides, which interfere with the parasite's fatty acid β -oxidation and glycolysis, promoting the depletion of intracellular ATP levels. Another hypothesis suggests that Sb^V acts as a prodrug that is transformed into the more toxic trivalent form (Sb^{III}) to exert its antileishmanial activity (6–9). In fact, some studies indicate that Sb^{III} production *in vivo* is responsible for both therapeutic activity and antimony toxicity (10–12). Furthermore, we have confirmed this hypothesis by showing that meglumine antimoniate causes DNA damage *in vivo* but not *in vitro*. This suggests that Sb^V is a promutagen that requires metabolization to exert its mutagenic action (13).

There is evidence that Sb^{III} has the ability to change the cellular redox potential, leading to intracellular thiol efflux and trypanothione reductase inhibition (8, 9, 14). Furthermore, studies have shown that antimonial compounds increase levels of reactive oxygen species (ROS)/reactive nitrogen species (RNS), altering enzyme activities related to the antioxidant defense system (15–17).

Considering our previous reports that demonstrated the capacity of meglumine antimoniate to induce mutations *in vivo* (13), the frequency of which was reduced by antioxidant isoflavones (18), in the present study we investigated whether the mutagenic effect of meglumine antimoniate is related to its ability to promote oxidation in DNA nitrogenous bases by oxidative stress.

RESULTS

Leishmania infection and meglumine antimoniate cause genomic damage by the oxidation of DNA bases. Figure 1A and B present the frequencies of nucleoid classes observed in peripheral blood leukocytes from BALB/c mice infected with *Leishmania infantum* and/or treated with meglumine antimoniate, as determined by conventional comet assays and by comet assays followed by digestion with formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III). The distribution of nucleoids in all experimental groups, infected or uninfected, receiving meglumine antimoniate differed from that in the negative-control group such that classes with higher damage scores appeared. This new distribution of damage classes is reflected in the DNA damage scores (Fig. 1C). In the conventional comet assay (Fig. 1A), G1 animals, which were infected

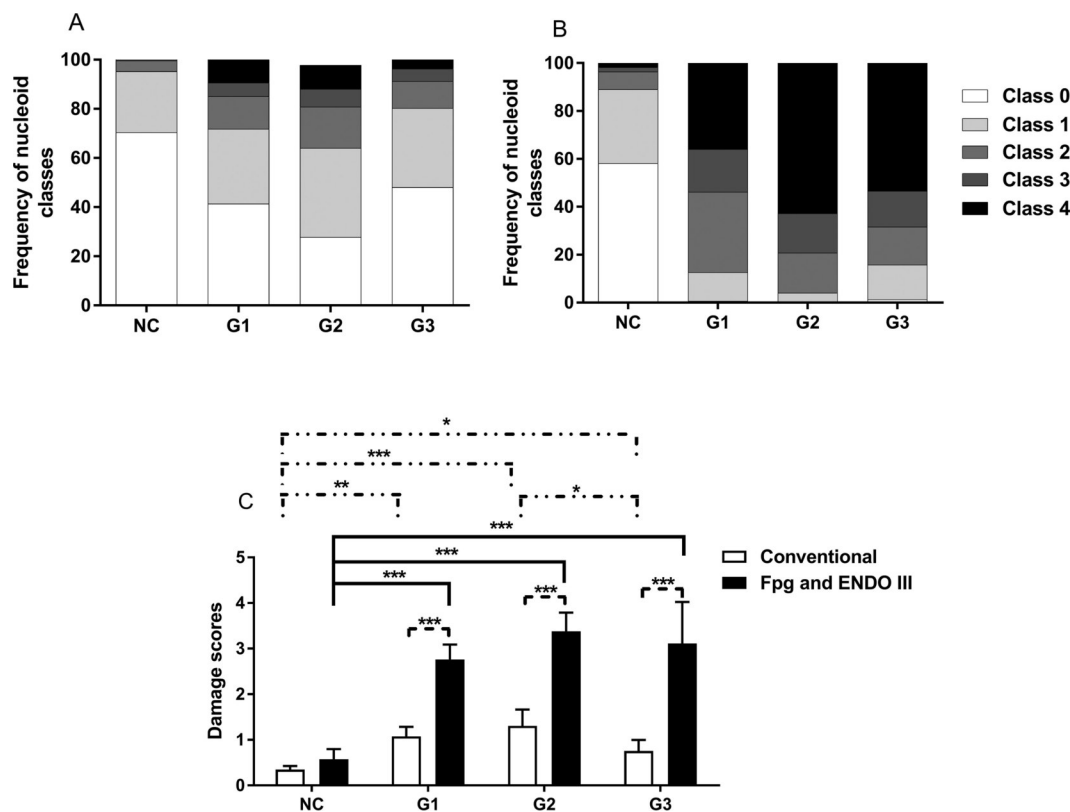


FIG 1 (A and B) Frequencies of nucleoid classes in peripheral blood leukocytes from different groups of BALB/c mice infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* and treated with meglumine antimoniate (*n*, 5 per group), observed by use of a conventional comet assay (A) or by a comet assay followed by Fpg and Endo III digestion (B). (C) DNA damage scores (means + standard deviations) for different groups. NC, negative control (saline); G1, animals infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* for 65 days; G2, uninfected animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day); G3, infected animals receiving meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day). Asterisks indicate statistical differences (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.001; ***, *P* < 0.0001) by ANOVA followed by a Tukey test.

but not treated with the antimonial, presented a higher damage score (1.08 ± 0.21) than negative-control animals (0.35 ± 0.08) (*P* < 0.01), showing that infection *per se* was capable of causing DNA damage. Similarly, G2 animals, which were not infected but received meglumine antimoniate at 20 mg/kg/day for 20 days (the same prescription recommended for humans), showed significant increases in genomic lesions (1.31 ± 0.36) over the negative-control group (*P* < 0.01), confirming the genotoxic effect of meglumine antimoniate. In addition, score data showed that infection and meglumine antimoniate cause similar levels of DNA damage (*P* > 0.05). Moreover, infected animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (G3) also presented a damage score (0.84 ± 0.17) significantly different from that of negative-control animals (*P* < 0.05). However, G3 animals presented DNA damage scores lower than those of uninfected animals receiving meglumine antimoniate. On the other hand, their damage scores did not differ from those of G1 animals, which had only *Leishmania* infection.

After enzymatic digestion, no class 0 nucleoids were observed in any of the experimental groups (Fig. 1B). Moreover, the frequencies of the higher-damage classes (classes 3 and 4) increased dramatically (Fig. 1B), revealing higher damage scores than those obtained by the conventional comet assay (Fig. 1C). This increase in DNA damage after the action of Fpg and Endo III enzymes suggests that *Leishmania* infection *per se*, as well as meglumine antimoniate, causes genomic damage by the oxidation of DNA bases.

Meglumine antimoniate increases the frequency of mutations. Cytotoxicity was determined by calculating the ratio of polychromatic erythrocytes (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE) using 1,000 erythrocytes per animal. None of the groups treated with meglumine antimoniate showed any difference in cytotoxicity from the

TABLE 1 Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes and PCE/NCE ratio in the bone marrow of BALB/c mice infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*

Group ^a	% MnPCE (mean no. per animal) ^b	PCE/NCE ratio ^c
NC	23 (3.0) A	1.04
G1	76 (9.2) AB	0.94 (NS)
G2	104 (15.2) B	1.09 (NS)
G3	105 (15.0) B	1.07 (NS)

^aNC, negative control (saline); G1, animals infected with *L. infantum* for 65 days; G2, uninfected animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day); G3, infected animals receiving meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day).

^bMnPCE, micronucleated polychromatic erythrocytes detected per group. There were 5 animals per group, and 2,000 erythrocytes per animal were tested, for a total of 10,000 erythrocytes per group. Different letters indicate statistical differences by the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's test ($H = 13.9055$; $P = 0.0030$).

^cPCE, polychromatic erythrocytes; NCE, normochromatic erythrocytes; NS, not significant (there is no difference from the result for the negative control).

negative-control group (Table 1). With regard to mutagenicity, there was no difference between the infected group (G1) and the negative-control group, indicating that the infection *per se* is not capable of causing mutations. On the other hand, all groups receiving meglumine antimoniate (G2 and G3) presented a higher frequency of micronucleated cells than did the negative-control group. In addition, there was no difference between uninfected (G2) and infected (G3) animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (Table 1).

Meglumine antimoniate interferes with the activities of antioxidant enzymes.

To further assess the animals' serum antioxidant defense statuses, the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx) were determined. *Leishmania* infection (G1) increased the level of SOD activity over that in negative-control mice, and this effect was potentiated by meglumine antimoniate treatment (G2 and G3) (Fig. 2A). Similarly, in all experimental groups, CAT activity was

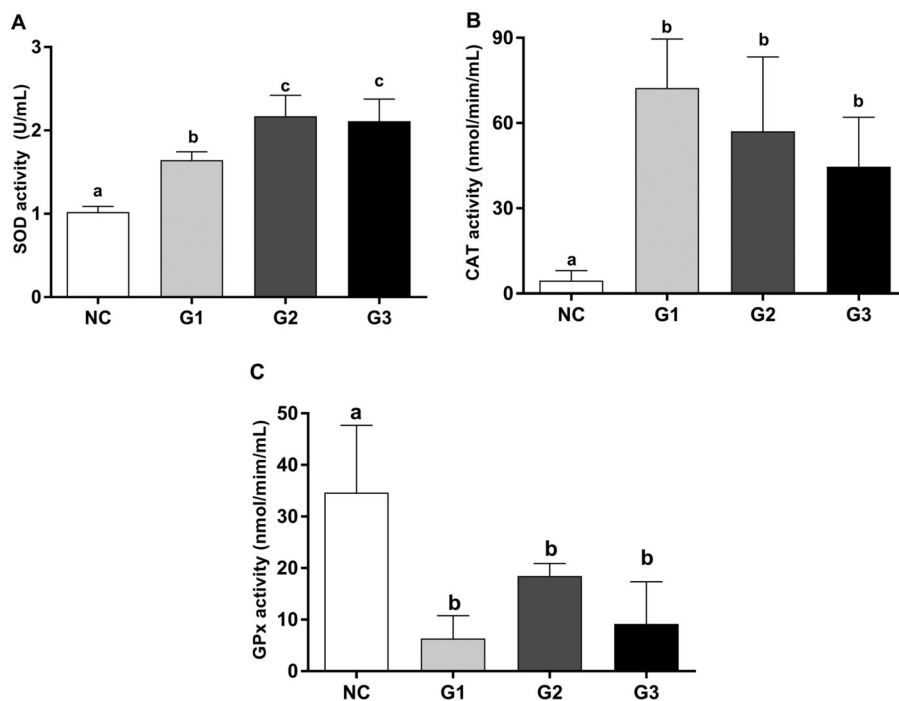


FIG 2 Activities of the antioxidant enzymes (means + standard deviations) superoxide dismutase (A), catalase (B), and glutathione peroxidase (C). NC, negative control (saline); G1, animals infected with *L. infantum* for 65 days; G2, uninfected animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day); G3, infected animals receiving meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day). Different letters above the bars indicate statistical differences ($P < 0.05$) determined by ANOVA followed by a Newman-Keuls test.

significantly increased over that for the negative control, but no difference was found among experimental groups (Fig. 2B). On the other hand, GPx activity was significantly reduced in all experimental groups from that in the negative-control group (Fig. 2C). In this case, meglumine antimoniate *per se* (G2) apparently caused less of a reduction in GPx activity than infection (G1). Hence, this set of data emphasizes that both *Leishmania* infection and meglumine antimoniate treatment disturb the serum redox balance, which, in turn, distinctly modulates the activity of antioxidant enzymes.

DISCUSSION

Previously, our group demonstrated the genotoxic effects of meglumine antimoniate on the DNA of uninfected Swiss mice receiving a single dose of the drug (13), as well as the ability of antioxidants to prevent these effects (18). Based on those findings, this study was conducted on BALB/c mice infected with *Leishmania (Leishmania) infantum* in order to investigate the mechanism by which meglumine antimoniate causes DNA lesions.

Our results, presented here, demonstrated the ability of meglumine antimoniate (20 mg/kg/day) given for 20 days to cause DNA damage in mice, confirming the results obtained by Lima et al. (13), who demonstrated that meglumine antimoniate induces genomic instability *in vivo* but not *in vitro*, suggesting that meglumine antimoniate is a promutagen. These data support the “prodrug model of antimony action” proposed by Goodwin and Page (19), who firstly suggested that the pentavalent antimony is converted into the more toxic trivalent form to exert its antileishmanial activity. Sereno et al. (20) also demonstrated the ability of Sb^{III} at low concentrations to induce DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes.

To elucidate how meglumine antimoniate interacts with DNA, we carried out a comet assay followed by enzymatic digestion. This assay is based on the fact that the bacterial enzymes formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) recognize different types of oxidative damage. Fpg is specific for oxidized purines, including 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua), and 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FaPyAde) and other ring-opened purines. Endo III recognizes oxidized pyrimidines, including thymine glycol and uracil glycol. Consequently, both enzymes have been used as biomarkers of DNA damage caused by oxidative stress (21–24). Our results showed that enzymatic digestion further increased genomic lesions caused by meglumine antimoniate, suggesting that DNA damage was induced by the oxidation of the nitrogenous bases of DNA. This result is consistent with the fact that Sb^{III} is a borderline metal ion with a high affinity for nitrogen- and sulfhydryl-containing ligands (25). Our results also support the findings of Cantanhêde et al. (18), who showed that soybean isoflavone, a potent antioxidant, was able to reduce the genetic damage caused by meglumine antimoniate.

ROS/RNS cause damage to cell macromolecules, including lipids, proteins, and DNA. Cavallo et al. (26) demonstrated the occurrence of oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. It was also shown that Sb^{III} increases OH⁻ and H₂O₂ levels, inducing apoptosis through an increase in ROS levels (27, 28). Other studies suggest that both arsenic and antimony are responsible for inducing oxidative stress through the depletion of reducing agents, such as glutathione (GSH) (29, 30). More recently, Bento et al. (17) demonstrated that meglumine antimoniate causes protein carbonylation in the heart, spleen, and brain, besides lipid peroxidation in the livers and brains of CF-1 mice. Additionally, Kato et al. (31) reported higher peroxidase enzyme activity in animals treated with meglumine antimoniate. Hence, our data support the idea that the toxicity of antimonials is related to the production of reactive oxygen species.

Our data also revealed that *L. infantum* infection *per se* induces genomic lesions. Other studies reported that parasites such as *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, and *Opisthorchis viverrini* also induce DNA damage (32–35). Our results are also consistent with those of Kocyigit et al. (36) and de Oliveira et al. (37), who observed DNA

damage in patients with cutaneous leishmaniasis and in mice infected by *Leishmania chagasi*, respectively. These authors related the genotoxic effect to elevated NO generation during the control of *Leishmania* infection through the process known as the "oxidative burst," causing DNA damage in host cells by nitrate and oxidative lesions. Our data confirmed this hypothesis once we demonstrated that infection with *L. infantum* causes genomic instability through the oxidation of DNA bases.

Considering that the comet assay detects genomic lesions, we carried out a micronucleus test to determine whether these primary lesions caused by oxidative damage would be fixed through DNA repair mechanisms. Our data showed that *Leishmania* infection itself was not able to increase the frequency of micronucleated cells over that for the negative control, revealing that although the infection has genotoxic action, it does not induce mutations. Accordingly, the DNA repair system was able to remove oxidized bases induced by *Leishmania* infection. On the other hand, there was a higher frequency of micronucleated cells in animals treated with meglumine antimoniate. These data are consistent with those of Gebel (38) and Gurnani et al. (39), who reported that high antimony levels induced higher frequencies of micronuclei, DNA double-strand breaks, and chromosomal aberrations in mice. Additionally, Hei et al. (40) reported that arsenic, which has chemical and toxicological characteristics similar to those of antimony, caused mutations in mammalian cells mediated by ROS generation. More recently, Lima et al. (13) described the mutagenic effect of meglumine antimoniate in Swiss mice receiving acute doses of the drug. Additionally, Cantanhêde et al. (18) reported the ability of antioxidants to reduce the mutagenic effect of meglumine antimoniate.

The antioxidant defense system, which plays an important role in redox homeostasis maintenance, is composed of three main antioxidant enzymes, i.e., superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), whose ability to remove reactive oxygen intermediates is crucial to maintaining redox balance. SOD rapidly dismutates $O_2^{\cdot-}$ into H_2O_2 , which is further reduced to H_2O by both CAT and GPx, besides peroxiredoxins. Otherwise, in the presence of Fe^{2+} , H_2O_2 undergoes the Fenton reaction to generate the superoxidizing hydroxyl radical (OH^{\cdot}) (41, 42).

Taking this into account, we assessed the activities of SOD, CAT, and GPx in the sera of animals from groups G1, G2, and G3. Our results demonstrated that *Leishmania* infection itself increased SOD activity, possibly as an attempt to compensate for $O_2^{\cdot-}$ overproduction. These data are consistent with those of Britti et al. (43) and Souza et al. (44), who observed higher SOD activity in *Leishmania infantum*-infected dogs. Similarly, Khouri et al. (45) described increased SOD activity in patients presenting with cutaneous leishmaniasis. These authors considered SOD1 plasma levels a useful tool for distinguishing clinical status and predicting the failure of Sb^V treatment. On the other hand, they reported a decrease in plasma SOD1 levels after antimony therapy (20 mg/kg/day for 20 days). Britti et al. (46) observed no significant difference in SOD activity in dogs with leishmaniasis upon similar therapy. It is noteworthy that our results also showed an increase in SOD activity for animals receiving only meglumine antimoniate, suggesting that this antileishmanial increases SOD activity regardless of infection. These data confirm the results of López et al. (47), who found increased SOD activity in red blood cells exposed to pentavalent antimony *in vitro*.

In accordance with the SOD activity data, either *Leishmania* infection or meglumine antimoniate also increased CAT activity. Previous reports have found high CAT levels in *Leishmania*-infected animals (48), while others found lower enzymatic activity (47). Notwithstanding, Bento et al. (17), studying uninfected animals receiving meglumine antimoniate, observed that CAT activity differs according to the organ evaluated. Once again, according to our data, *Leishmania* infection and meglumine antimoniate seem to independently promote oxidative stress, probably by acting on the same pathway, since there was no difference in the enzymes' activities when both conditions were present concomitantly.

Our data showed that serum GPx activity in all groups decreased from that for the negative control. These data are consistent with those of Souza et al. (44), who observed lower GPx activity in blood and plasma from *Leishmania infantum*-infected

dogs. On the other hand, Britti et al. (46) observed no difference in GPx activity in infected dogs after 60 days of therapy with *N*-methylglucamine antimoniate. Besides, it has been shown that GPx activity is directly proportional to free GSH concentrations (49). According to Singh et al. (50), high ROS production, such as that observed in the oxidative burst, may lead to saturation of this antioxidant pathway due to the large consumption of GSH by GPx. These observations are in line with our results, especially because it has been shown that Sb^{III} is able to impair the redox balance by promoting intracellular GSH depletion and glutathione reductase inhibition, thereby preventing GSH regeneration (14–18).

With regard to the bench-to-bedside relevance of our data, we must consider that dose extrapolation among species depends on characteristics such as the animal's anatomy, physiology, and biochemical processes, as well as drug pharmacokinetics, for proper allometric scaling (51). It should be noted that the animal dose used in this work was equivalent to approximately 1.5 mg/kg/day in humans, much lower than the regimen recommended by the WHO for humans, i.e., 20 mg/kg/day for 20 days (52). Nevertheless, the dose we used was able to cause oxidative stress-derived DNA damage, corroborating previous studies that demonstrated lipid peroxidation and protein carbonylation in animals receiving 20, 60, or 120 mg/kg/day of meglumine antimoniate for 3 days, with no difference in the resultant oxidative damage among doses (17).

Considering that the regimen of treatment used in this study is below the WHO's guidelines (according to the animal equivalent dose calculation), the genomic instability might be deeper when higher doses are used, as in the human therapy. In addition, considering the correlation between mutagenicity and carcinogenicity (53), exposure of humans to mutagens should be avoided whenever possible. Therefore, studies for estimating the risk to patients under treatment must be performed.

In summary, the data presented here confirm the mutagenic effect of meglumine antimoniate, previously reported in uninfected animals by our group (13). Moreover, to the best of our knowledge, this work reports for the first time that meglumine antimoniate *per se*, as well as *Leishmania infantum* infection, is a DNA stressor, causing oxidation of the nitrogenous bases of DNA. Nevertheless, the mechanisms of action of *Leishmania (Leishmania) infantum* infection and meglumine antimoniate do not seem to be associative, since the concomitant presence of both stressors did not enhance DNA damage. According to our data, these stressors promote oxidative stress-derived DNA damage, which caused overactivation of the SOD-CAT axis, whereas the GPx branch was inhibited as a probable consequence of GSH depletion.

MATERIALS AND METHODS

Animals. BALB/c mice were kept for many generations in the Animal Breeding Unit of the University of Campinas (Sao Paulo, Brazil) under standard conditions. They were kept in a well cross-ventilated room at 26 ± 2°C with a relative humidity of 44 to 56% and light-dark cycles of 12 h. The animals had free access to sterilized food and water. Five 8-week-old male mice weighing 30 g were used for each experimental group. All international, national, and/or institutional guidelines that were applicable for the care and use of animals were followed. All procedures were in accordance with the requirements of COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation). The project was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (CEUA), with protocol number 23115.012909-2013-41.

Parasites. *Leishmania (Leishmania) infantum* promastigotes (MHOM/BR/1970/BH46) were grown to stationary phase using Schneider medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Gibco). The parasites were maintained at 27°C until injection into animals.

Infection and treatment. *Leishmania (Leishmania) infantum* stationary-phase promastigotes (10⁷/50 μl of saline) were subcutaneously injected into the right hind footpad. The infection was maintained for 65 days in all experimental groups. On the 66th day, treatments were carried out for the following groups: NC, negative control (saline); G1, infection control (infected animals with no further treatment); G2, uninfected animals treated with meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day); G3, infected animals receiving meglumine antimoniate for 20 days (20 mg/kg/day). The drug was obtained from the Brazilian Ministry of Health (meglumine antimoniate, batch 246888; Sanofi-Aventis, São Paulo, Brazil) and was administered intraperitoneally in volumes of 0.1 ml/10 g of body weight. The dose was determined by considering data reported by Bento and collaborators (17), as well as the regimen recommended by the WHO for treating leishmaniasis patients, i.e., 20 mg Sb^V/kg/day for 20 days (52).

Comet assay. The comet assay was based on the work of Singh et al. (54) and Tice et al. (55). On the 21st day from the beginning of treatment, peripheral blood leukocytes were obtained by excising the end of the tail of each animal. The cell pellet was added to 200 μl of low-melting-point agarose (0.5%),

which was distributed in pregelated slides with normal-melting-point agarose. After cooling for 10 min, slides were immersed in a lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% dimethyl sulfoxide, 1% Triton X-100 [pH 10.0]) and were refrigerated at 4°C overnight. Slides were incubated for 20 min in an alkaline buffer (10 M NaOH, 0.2 M EDTA, and distilled water [pH 13]), followed by electrophoresis at 25 V and 300 mA for 25 min. Slides were neutralized (0.4 M Tris-HCl [pH 7.5]) for 15 min, dried at room temperature, and fixed in 100% ethanol. They were stained with ethidium bromide (20 µg/ml) and were analyzed under an Olympus BX51/BX52 fluorescence microscope (516- to 560-nm filter; 590-nm barrier filter; 40× lens). One hundred nucleoids were analyzed by treatment, taking into account both the size and the amount of DNA in the comet tail. DNA damage was classified into 5 levels: class 0, no damage (<5%); class 1, a low level of damage (5 to 20%); class 2, a medium level of damage (21 to 40%); class 3, a high level of damage (41 to 94%); class 4, total damage (>95%). Damage scores were calculated by multiplying the number of nucleoids in each class by the respective class value (56).

Comet assay followed by Fpg and Endo III digestion. In order to assess DNA oxidative damage, a comet assay modified for the detection of oxidized bases using the repair endonucleases Endo III (endonuclease III) and Fpg (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase) was performed to detect oxidized pyrimidines and purines, respectively (57). Briefly, after the lysis step, slides were soaked in 1× FLARE (fragment length analysis using repair enzymes) buffer (Trevigen) for 30 min. Then each slide was treated with 150 µl of a solution containing Fpg and Endo III enzymes, covered with coverslips, and incubated at 37°C for 45 min in a humid chamber. After the incubation period, coverslips were carefully removed, and electrophoresis, neutralization, fixing, staining, and data analysis were conducted as described above.

Micronucleus test. The micronucleus test was conducted according to the method of Schmid (58). Animals were sacrificed by anesthetic overdose (1 ml/kg xylazine and 0.1 ml/kg ketamine), and the bone marrow of one femur was extracted using 500 µl fetal bovine serum and was centrifuged at 1,000 rpm for 5 min. The supernatant was discarded, and cell pellet smearing was conducted. The material was dried at room temperature, and cells were stained using a fast hematologic dye (Panotic; Laborclin). The resulting color distinguishes between polychromatic erythrocytes (PCE), which stain light purplish blue, and normochromatic erythrocytes (NCE), which stain light red.

The frequency of micronucleated cells was determined with 2,000 polychromatic erythrocytes per animal, while toxicity was established by the PCE/NCE ratio in 1,000 erythrocytes per animal.

SOD activity. Total superoxide dismutase (SOD) activity was determined by use of a superoxide dismutase assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) in serum (10 µl) according to the manufacturer's instructions. On a 96-well plate, the reaction was initiated by adding 20 µl of xanthine oxidase in 10 µl of serum. The plate was incubated on a shaker at room temperature for 20 min, and absorbance was measured at 450 nm using a plate reader (Synergy H1; BioTek).

CAT activity. The catalase (CAT) assay was carried out by use of a catalase assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. On a 96-well plate, the reaction was initiated by the addition of 20 µl hydrogen peroxide in 20 µl of serum, with subsequent incubation on a shaker at room temperature for 20 min. Then 30 µl potassium hydroxide was added to complete the reaction. Thirty microliters of catalase was added, and the solution was incubated again on a shaker at room temperature for 10 min. Subsequently, 10 µl potassium periodate catalase was added to each well, and the solution was incubated for 5 min at room temperature. Absorbance was measured at 540 nm using a plate reader (Synergy H1; BioTek).

GPx activity. Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using a glutathione peroxidase assay kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's instructions. In order to conduct the assay, 20 µl serum was used. On a 96-well plate, 20 µl cumene hydroperoxide was added in 20 µl serum, and the mixture (cumene hydroperoxide and serum) was carefully homogenized for 5 min. Absorbance was measured at 340 nm using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) plate reader (Synergy H1; BioTek).

Statistical analysis. Data normality was assessed by a Kolmogorov-Smirnov test. The parametric one-way analysis of variance (ANOVA) test was applied, followed by the Tukey test, for the comet assay. The ANOVA test was followed by the Newman-Keuls test for enzyme activities ($P < 0.05$). Results that did not have a normal distribution were assessed by a Kruskal-Wallis test, followed by a Student-Newman-Keuls test. Graphs were made using GraphPad Prism, version 6.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão). We are grateful to CAPES (Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior) and FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão) for financial support.

We thank Lucas Martins França for technical assistance.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Haldar AK, Sen P, Roy S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int* 2011: 1–23. <https://doi.org/10.4061/2011/571242>.
- World Health Organization. 2016. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec* 22:287–296.

3. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, Andrade CA. 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 118: 87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.
4. Berman JD, Gallalee JV, Best JM. 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol* 36:197–201.
5. Demicheli C, Frézard F, Lecouvey M, Garnier-Suillerot A. 2002. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 1570:192–198. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00198-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00198-8).
6. Sereno D, Cavaleira M, Zemzoumi K, Maquaire S, Ouaisi A, Lemesre JL. 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an *in vitro* model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* 42:3097–3102.
7. Miekeley N, Mortari SR, Schubach AO. 2002. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Anal Bioanal Chem* 372:495–502. <https://doi.org/10.1007/s00216-001-1213-7>.
8. Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA. 2001. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* 45:913–916. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.3.913-916.2001>.
9. Ferreira CDS, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. 2003. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals* 16:441–446. <https://doi.org/10.1023/A:1022823605068>.
10. Frézard F, Schettini DA, Rocha OGF, Demicheli C. 2005. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Quim Nova* 28:511–518. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300025>.
11. de Lima EB, Porto C, da Motta JOC, Sampaio RNR. 2007. Treatment of American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol* 82:111–124. (In Portuguese.) <https://doi.org/10.1590/S0365-05962007000200002>.
12. Friedrich K, Vieira FA, Porrozzi R, Marchevsky RS, Miekeley N, Grimaldi GJR, Paumgarten FJ. 2012. Disposition of antimony in rhesus monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and treated with meglumine antimoniate. *J Toxicol Environ Health A* 75:63–75. <https://doi.org/10.1080/15287394.2012.624826>.
13. Lima MIS, Arruda VO, Alves EV, de Azevedo AP, Monteiro SG, Pereira SR. 2010. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Arch Toxicol* 84:227–232. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0485-0>.
14. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH. 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279:39925–39932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405635200>.
15. Rais S, Perianin A, Lenoir M, Sadak A, Rivollet D, Paul M, Deniau M. 2000. Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2406–2410. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.9.2406-2410.2000>.
16. Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S. 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* 50:1788–1797. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1788-1797.2006>.
17. Bento DB, de Souza B, Steckert AV, Dias RO, Leffa DD, Moreno SE, Petronilho F, de Andrade VM, Dal-Pizzol F, Romão PR. 2013. Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. *Res Vet Sci* 95:1134–1141. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.08.004>.
18. Cantanhêde LF, Almeida LP, Soares RE, Castelo Branco PV, Pereira SRF. 2015. Soy isoflavones have antimutagenic activity on DNA damage induced by the antileishmanial Glucantime (meglumine antimoniate). *Drug Chem Toxicol* 38:312–317. <https://doi.org/10.3109/01480545.2014.963599>.
19. Goodwin LG, Page JE. 1943. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J* 37:198–209. <https://doi.org/10.1042/bj0370198>.
20. Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre J. 2001. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 45:2064–2069. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2064-2069.2001>.
21. Bjelland S, Seeberg E. 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531(1–2):37–80. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002>.
22. Wilson DM, Bohr VA. 2007. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair* 6:544–559. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.10.017>.
23. Oyagbemi AA, Azeez OI, Saba AB. 2009. Interactions between reactive oxygen species and cancer: the roles of natural dietary antioxidants and their molecular mechanisms of action. *Asian Pac J Cancer Prev* 10: 535–544.
24. Cafueri G, Parodi F, Pistório A, Bertolotto M, Ventura F, Gambini C, Bianco P, Dallegri F, Pistaia V, Pezzolo A, Palombo D. 2012. Endothelial and smooth muscle cells from abdominal aortic aneurysm have increased oxidative stress and telomere attrition. *PLoS One* 7:e35312. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035312>.
25. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. 2009. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14:2317–2336. <https://doi.org/10.3390/molecules14072317>.
26. Cavallo D, Iavicoli I, Setini A, Marinaccio A, Perniconi B, Carelli G, Iavicoli S. 2002. Genotoxic risk and oxidative DNA damage in workers exposed to antimony trioxide. *Environ Mol Mutagen* 40:184–189. <https://doi.org/10.1002/em.10102>.
27. Wyllie S, Fairlamb AH. 2006. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. *Biochem Pharmacol* 71:257–267. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2005.10.043>.
28. Pulido MD, Parrish AR. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res* 533:227–241. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.015>.
29. Tirmenstein MA, Mathias PI, Snawder JE, Wey HE, Toraason M. 1997. Antimony-induced alterations in thiol homeostasis and adenine nucleotide status in cultured cardiac myocytes. *Toxicology* 119:203–211. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(97\)03628-7](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(97)03628-7).
30. Li Y, Sun X, Wang L, Zhou Z, Kang YJ. 2002. Myocardial toxicity of arsenic trioxide in a mouse model. *Cardiovasc Toxicol* 2:63–73. <https://doi.org/10.1385/CT:2:1:63>.
31. Kato KC, Morais-Teixeira E, Reis PG, Silva-Barcellos NM, Salaün P, Campos PP, Corrêa-Junior JD, Rabello A, Demicheli C, Frézard F. 2014. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb(III) and protective effect of ascorbic acid. *Antimicrob Agents Chemother* 58:481–488. <https://doi.org/10.1128/AAC.01499-13>.
32. Ribeiro DA, Pereira PC, Machado JM, Silva SB, Pessoa AW, Salvadori DM. 2004. Does toxoplasmosis cause DNA damage? An evaluation in isogenic mice under normal diet or dietary restriction. *Mutat Res* 559: 169–176. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.01.007>.
33. Kitasato A, Tajima Y, Kuroki T, Tsutsumi R, Adachi T, Mishima T, Kanematsu T. 2007. Inflammatory cytokines promote inducible nitric oxide synthase-mediated DNA damage in hamster gallbladder epithelial cells. *World J Gastroenterol* 21:6379–6384. <https://doi.org/10.3748/wjg.v13.i47.6379>.
34. Ribeiro DA, Calvi AS, Picka MM, Peresi E, De Carvalho TB, Caetano PK, Nagoshi LR, Lima CR, Machado JM, Salvadori DM. 2007. DNA damage and nitric oxide synthesis in experimentally infected BALB/c mice with *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 116:296–301. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2006.12.007>.
35. Prakobwong S, Yongvanit P, Hiraku Y, Pairojkul C, Sithithaworn P, Pinlaor P, Pinlaor S. 2010. Involvement of MMP-9 in peribiliary fibrosis and cholangiocarcinogenesis via Rac1-dependent DNA damage in a hamster model. *Int J Cancer* 127:2576–2587. <https://doi.org/10.1002/ijc.25266>.
36. Kocyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O. 2005. Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis. *Mutat Res* 585:71–78. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2005.04.012>.
37. de Oliveira LR, Cezário GA, de Lima CR, Nicolette VC, Peresi E, de Sábio MT, Picka MC, Calvi SA. 2011. DNA damage and nitric oxide production in mice following infection with *L. chagasi*. *Mutat Res* 723:177–181. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.04.009>.
38. Gebel T. 1997. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* 107:131–144. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(97\)00087-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(97)00087-2).
39. Gurnani N, Sharma A, Talukder G. 1992. Cytotoxic effects of antimony trichloride on mice *in vivo*. *Cytobios* 70:131–136.
40. Hei TK, Liu SX, Waldren C. 1998. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells:

- role of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8103–8107. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.8103>.
41. Belozerskaia TA, Gessler NN. 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 43:565–575. (In Russian.)
 42. Van Assche T, Deschacht M, Da Luz RAI, Maes L, Cos P. 2011. Leishmania–macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51:337–351. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.011>.
 43. Britti D, Sconza S, Morittu VM, Santori D, Boari A. 2008. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in the blood of dogs with leishmaniasis. *Vet Res Commun* 32:251–254. <https://doi.org/10.1007/s11259-008-9121-3>.
 44. Souza CC, Barreto TDO, Silva SM, Pinto AWJ, Figueiredo MM, Rocha OGF, Cangussú S, Tafuri WL. 2014. A potential link among antioxidant enzymes, histopathology and trace elements in canine visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol* 95:260–270. <https://doi.org/10.1111/iep.12080>.
 45. Khouri R, Santos GS, Soares G, Costa JM, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. 2014. SOD1 plasma level as a biomarker for therapeutic failure in cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 210:306–310. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu087>.
 46. Britti D, Sconza S, Massimini G, Civitella C, Luciani A, Lavecchia L. 2012. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in dogs with leishmaniasis following antimonial therapy, p 71–77. *In Pugliese A, Gaiti A, Boiti C (ed), Veterinary science: current aspects in biology, animal pathology clinic and food hygiene*. Springer, Berlin, Germany. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23271-8_12.
 47. López S, Aguilar L, Mercado L, Bravo M, Quiroz W. 2015. Sb(V) reactivity with human blood components: redox effects. *PLoS One* 10:e0114796. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114796>.
 48. Jafari M, Shirbazou S, Norozi M. 2014. Induction of oxidative stress in skin and lung of infected BALB/c mice with Iranian strain of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). *Iran J Parasitol* 9:60–69.
 49. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 15:1957–1997. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3586>.
 50. Singh SK, Dimri U, Sharma MC, Swarup D, Sharma B. 2011. Determination of oxidative status and apoptosis in peripheral blood of dogs with sarcoptic mange. *Vet Parasitol* 178:330–338. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.036>.
 51. Nair AB, Jacob S. 2016. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm* 7:27–31. <https://doi.org/10.4103/0976-0105.177703>.
 52. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brazil. 2014. Guia de vigilância em saúde. Ministério da Saúde, Brasília, Brazil.
 53. Petkov PI, Schultz TW, Donner EM, Honma M, Morita T, Hamada S, Wakata A, Mishima M, Maniwa J, Todorov M, Kaloyanova E, Kotov S, Mekenyan OG. 2016. Integrated approach to testing and assessment for predicting rodent genotoxic carcinogenicity. *J Appl Toxicol* 36:1536–1550. <https://doi.org/10.1002/jat.3338>.
 54. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
 55. Tice RR, Agureel E, Anderson D, Burlison B, Hartmann A, Kobayashi H. 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
 56. Speit G, Hartmann A. 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10:555–559. <https://doi.org/10.1093/mutage/10.6.555>.
 57. Collins A, Duthie S, Dobson V. 1993. Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14:1733–1735. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.9.1733>.
 58. Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res* 31:9–15. [https://doi.org/10.1016/0165-1161\(75\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0165-1161(75)90058-8).

7.2 CAPÍTULO II: Antimoniato de Meglumina (Glucantime®) induz superexpressão de genes de defesa antioxidante e reparo de DNA em camundongos infectados.

Artigo a ser publicado na revista: Mutagenesis

Qualis Medicina 1: B1

Fator de impacto: 2.297

ANTIMONIATO DE MEGLUMINA (GLUCANTIME[®]) INDUZ SUPEREXPRESSION DE GENES DE DEFESA ANTIOXIDANTE E REPARO DE DNA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Vanessa Ribeiro Moreira^{1,2}; Raissa Lacerda Pontes¹; Mayara Ingrid Sousa Lima¹; Silma Regina Ferreira Pereira^{1,2*}

¹ Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Departamento de Biologia; Universidade Federal do Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, Av. Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil.

² Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde; Universidade Federal do Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, Av. Portugueses, 1966, Bacanga, São Luís, Maranhão, Brasil

*Correspondente: silma.pereira@ufma.br; (98) 32728543

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania* sendo considerada endêmica e negligenciada em diversos países, dentre estes, o Brasil. Em relação ao tratamento, o antimonio de meglumina (Glucantime[®]) é a droga de primeira escolha recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Apesar de ser eficaz para todos os tipos de leishmaniose, o antimonio de meglumina apresenta alta toxicidade e é capaz de causar danos genéticos em mamíferos. O mecanismo pelo qual o fármaco exerce seu efeito genotóxico está relacionado à oxidação das bases nitrogenadas do DNA. Para melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular ao dano oxidativo causado pelo antileishmanial, avaliamos a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo (*GSS*, *GSTP1*, *GPx1*, *SOD1*, *SOD2* e *CAT*) e genes envolvidos no mecanismo de reparo do DNA (*OGG1* e *MTH1*) em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania infantum* e tratados com o antimonial pentavalente na dose de 20mg/kg/dia por 20 dias. Alterações na expressão de m-RNA foram analisadas pelo sistema Taqman qRT-PCR. Todas as reações foram feitas em triplicata e a média do Ct usada para avaliação da expressão relativa dos genes foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os genes que apresentaram $-2 \leq \text{fold change} \leq 2$ foram considerados diferencialmente expressos. Além disso, avaliamos pelo Ensaio do cometa, a capacidade do ácido ascórbico, reconhecido antioxidante, de reduzir os danos ao DNA causados pelo antimonio de meglumina. Os dados revelaram que o antileishmanial induziu a superexpressão de genes relacionados a defesa antioxidante, bem como dos genes *OGG1* e *MTH1*, que atuam no mecanismo de reparo de danos ao DNA ocasionados por oxidação de bases nitrogenadas. Adicionalmente, nossos resultados mostraram que o ácido ascórbico foi capaz de reduzir os danos genéticos causados pelo antimonio de meglumina, reforçando a hipótese de que a geração de espécies reativas de oxigênio é um dos mecanismos que leva a instabilidade genômica nas células expostas ao fármaco. Demostramos também, pela primeira vez, que as células respondem ao estresse oxidativo induzido pelo antileishmanial, modulando positivamente a expressão de genes relacionados ao reparo do DNA e defesa antioxidante.

Palavras chaves: Leishmaniose. Estresse oxidativo. Expressão gênica.

Introdução

Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania* e, de acordo com a espécie infectante e o estado imunológico do hospedeiro, a infecção pode resultar em três manifestações clínicas principais: leishmaniose mucosa, mucocutânea e visceral. Dentre estas, a leishmaniose visceral é a forma mais grave, sendo caracterizada por febre, perda de peso, anemia e hepatoesplenomegalia. No aspecto epidemiológico, cerca de 90% dos novos casos são reportados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (1-2).

Por mais de sete décadas, os antimoniais pentavalentes têm sido utilizados no tratamento das vários tipos de leishmaniose. Antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) é considerado pela Organização Mundial de Saúde, a droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. No entanto, este fármaco apresenta alta toxicidade, com relatos de cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e genotoxicidade (3-5). Ainda que o modo exato do mecanismo de ação dos antimoniais não esteja claro, acredita-se que Sb^V seja uma pró-droga, necessitando da conversão para a forma trivalente Sb^{III} , para assim exercer a sua atividade leishmanicida e genotóxica (6-7,4).

O mecanismo pelo qual o antimoniato de meglumina exerce seu efeito genotóxico foi relatado por Moreira et al (8), no qual revelaram que os danos causados ao DNA são decorrentes do estresse oxidativo gerado pela oxidação de suas bases nitrogenadas. Sabe-se que o estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre o excesso de oxidantes gerados e/ou a deficiência no sistema antioxidante, podendo causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (9).

A defesa antioxidante é constituída pelos sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático compreende as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), enquanto que os não enzimáticos incluem as vitaminas (A, C e E) e a glutathione (10). O ácido ascórbico (vitamina C) age como antioxidante devido ao seu poder fortemente redutor, diminuindo a ação dos radicais livres. Muitos trabalhos reforçam o potencial do ácido ascórbico como depletor de radicais livres acarretando assim a redução do estresse oxidativo (11-14).

Em resposta ao estresse oxidativo causado em biomoléculas como o DNA, a célula pode também atuar induzindo a expressão de genes relacionados às enzimas antioxidantes, bem como genes de reparo que agem evitando ou corrigindo os danos oxidativos ao DNA. O aumento dos níveis RNAm de enzimas antioxidantes pode estar relacionada com a exacerbação do dano oxidativo, apoiando uma correlação positiva existente entre estresse oxidativo e expressão de RNAm de enzimas antioxidantes (15).

Considerando que o antimoniato de meglumina causa estresse oxidativo por meio da oxidação de bases do DNA e altera a atividade de enzimas antioxidantes, conforme relatado por nosso grupo (8), este trabalho tem como principal objetivo compreender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular aos danos induzidos pelo antileishmanial. Para isso, foi avaliada a expressão diferencial de genes relacionados a defesa antioxidante e ao mecanismo de reparo do DNA em animais BALB/c infectados por *Leishmania (Leishmania) infantum*.

Material e métodos

Infecção de BALB/c por Leishmania (Leishmania) infantum

Camundongos machos BALB/c oriundos do Biotério da Unicamp pesando cerca 25 e 30 gramas com cerca de 60 dias foram mantidos em caixa de polipropileno durante o período de tratamento, com água e alimento *ad libitum* e mantidos a temperatura constante de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e um ciclo de luz 12h claro/12h escuro. Os parasitos (*L. infantum*) foram cultivados em meio Schneider (Sigma, St Louis, MO, USA), o qual foi suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (GIBCO) e acondicionadas à 27°C . A infecção foi feita por inoculação pela via subcutânea no coxim plantar direito com 10^7 promastigotas em fase estacionária de crescimento de *L. infantum* (MOM/BR/1970/BH46) e após 45 dias de infecção, foi iniciado o tratamento dos animais com o antileishmanial.

Tratamento

Os animais foram divididos em 8 grupos (n=5 animais/grupo): Grupo 1: Controle negativo (animais não infectados que receberam salina); Grupo 2: Controle da Infecção (animais infectados sem nenhum tratamento adicional); Grupo 3: animais não infectados tratados com ácido ascórbico (60mg/kg/dia) por 20 dias; Grupo 4: animais infectados tratados

diariamente com ácido ascórbico (60mg/kg/dia) por 20 dias; Grupo 5: animais não infectados tratados diariamente com antimoniato de meglumina (20mg/kg) por 20 dias; Grupo 6: animais não infectados tratados diariamente com antimoniato de meglumina (20mg/kg) e após 15 minutos co-tratados com ácido ascórbico (60mg/kg/dia) por 20 dias; Grupo 7: animais infectados tratados diariamente com antimoniato de meglumina (20mg/kg) por 20 dias e Grupo 8: animais infectados tratados diariamente com antimoniato de meglumina (20mg/kg) e após 15 minutos co-tratados com ácido ascórbico (60mg/kg/dia) por 20 dias. Todos os tratamentos foram feitos por via intraperitoneal.

Após o período de tratamento, procedeu-se a avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do Cometa (16-17). Para isso, os leucócitos de sangue periférico foram obtidos por meio de excisão da extremidade da cauda de cada animal. Em seguida, os animais foram eutanasiados por alta dosagem anestésica (Xilazina-1mL/kg e Cetamina -0,1mL/kg). Amostras de medula óssea foram obtidas para avaliação de mutagenicidade pelo ensaio do micronúcleo (18). Amostras de fígado foram armazenadas em RNA Later para análise de expressão gênica pelo sistema Taqman[®] qRT-PCR. Linfonodo poplíteo foi coletado para avaliação da carga parasitária por quantificação absoluta utilizando SYBR[®] Green.

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimental Animal da Universidade Federal do Maranhão sob o número de protocolo 23115.012909-2013-41.

Ensaio do Cometa

Os leucócitos de sangue periférico (10 a 20 μ L) foram obtidos por meio de excisão da extremidade da cauda de cada animal (16). O sedimento celular foi adicionado a 200 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e distribuídos em lâminas pré-gelificadas com agarose de ponto de fusão normal. Após refrigeração por dez minutos, as lâminas foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% de dimetilsulfóxido, 1% Triton X-100, pH 10,0) e refrigeradas a 4°C overnight. As lâminas foram incubadas por 20 minutos em tampão alcalino (10M NaOH, 0,2 M EDTA e água destilada, pH 13), seguida por eletroforese a 25 V e 300 mA, por 25 minutos. As lâminas foram neutralizadas (Tris/HClO, 4M pH 7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e fixadas em etanol 100%, coradas com brometo de etídio (20 μ g/mL) e analisadas em

microscópio de fluorescência (BX51/BX52-Olympus; filtro 516-560nm; barreira de filtro de 590nm, objetiva de 40x). Cem nucleóides foram analisados, por animal, levando-se em consideração tanto o tamanho quanto a quantidade de DNA presente na cauda do cometa. O dano no DNA foi classificado em 5 níveis: Classe 0- sem danos (<5%); Classe 1- baixo nível de danos (5-20%); Classe 2- médio nível de danos (21-40%); Classe 3- alto nível de danos (41 – 94%); Classe 4- dano total (>95%). Com a obtenção das classes, foi calculado o escore de danos multiplicando-se o número de nucleóides em cada classe pelo valor da respectiva classe.

Teste do Micronúcleo

Após eutanásia dos animais, a medula óssea de um dos fêmures foi extraída utilizando-se 500µL de soro bovino fetal e centrifugado por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi feito esfregaço do sedimento celular. O material foi seco a temperatura ambiente e as células foram coradas utilizando-se o corante hematológico rápido-PANÓTICO (Laborclin). A coloração diferencia eritrócitos policromáticos (PCEs), que se coram em azul arroxeadado claro e eritrócitos normocromáticos (NCEs), que se coram em vermelho claro. A frequência de células micronucleadas foi determinada em 2000 eritrócitos policromáticos, por animal, enquanto a toxicidade foi estabelecida pela razão PCE/NCE em 1000 eritrócitos por animal.

Extração de DNA e construção da curva padrão para PCR em tempo real

O DNA do linfonodo foi extraído pelo protocolo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (19). Para construção da curva padrão foi feito uma PCR convencional utilizando os primers 150 e 152, específicos para o gênero *Leishmania* (20). O produto da PCR foi purificado por meio do kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) e quantificado. O amplicon foi inserido no vetor de clonagem pGEM T-Easy (PROMEGA), na razão de 5:1 (DNA:vetor). Em seguida foi realizada transformação em bactérias *E. coli* (JM109 Competent Cells), seguindo protocolo do fornecedor (PROMEGA). O DNA plasmidial foi extraído utilizando-se o kit PureYield™ Plasmid Midiprep System (PROMEGA) e digerido pela enzima de restrição EcoRI (PROMEGA) para liberação do inserto. O número de cópias do plasmídeo foi determinado de acordo com a fórmula $(X \text{ g}/\mu\text{L DNA}/[\text{tamanho do plasmídeo em pares de base} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} \times \text{número de cópias do}$

plasmídeo/ μL (21). Foram realizadas diluições seriadas na base de 10, sendo que aquelas contendo 10^8 a 10^2 moléculas foram utilizadas no ensaio de quantificação absoluta.

Quantificação da carga parasitária por PCR em tempo real (qPCR)

A reação de qPCR foi feita com um volume final de $12,5 \mu\text{L}$, contendo $2 \mu\text{L}$ (100 ng) de DNA extraído, $1,25 \mu\text{M}$ de cada iniciador e $6,05 \mu\text{L}$ de SYBR[®] Green PCR Master Mix (2X) (Applied Biosystems) e as reações realizadas na plataforma ABI 7500fast (Applied Biosystems).

A quantificação do parasito foi feita em linfonodo dos animais dos grupos G2, G7 e G8, onde cada amostra foi analisada em triplicata. O número de cópias de cada amostra foi determinado a partir da comparação com a curva padrão que apresenta uma quantidade de DNA alvo conhecida. Para isso, comparou-se o Ct (Cycle Threshold) de cada amostra com a curva padrão utilizando um modelo de regressão linear. A análise foi feita utilizando-se o software SDS 7500fast (Applied Biosystems).

Extração de RNA e Transcrição reversa (cDNA)

O RNA total do fígado dos animais dos grupos G1, G2, G5 e G7 foi extraído pelo método do Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração do RNA total foi detectada no equipamento NanoDrop (NanoDrop 2000 Spectrophotometer, Unisciense). A transcrição reversa foi realizada utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit[™] da empresa ThermoFisher[™]. A reação foi feita de acordo com a especificação do fabricante. O cDNA obtido foi diluído em água deionizada estéril na razão 1:5.

Expressão gênica por PCR em tempo real

As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas em sistema TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). Todas as reações foram feitas em triplicata. Utilizou-se como amostra de referência, em cada ensaio de expressão, o *pool* de DNA dos cinco animais do grupo controle, visto que não houve diferença superior a um Ct da média do grupo controle quando analisados os cinco animais individualmente. Os dados foram normalizados com o gene gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (GAPDH) amplificado

em cada ensaio. A expressão relativa foi calculada de acordo com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (22). Os genes que apresentaram $-2 \leq \text{fold change} \leq 2$ foram considerados diferencialmente expressos.

Análise estatística

A normalidade dos dados foi analisada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e de acordo com a natureza dos dados, foi realizado o teste paramétrico ANOVA, seguido do pós-teste Tukey. Para os dados que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido de comparações múltiplas de Dunn, ambos adotando $p < 0,05$. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando-se o software Prism® da GraphPad versão 6.00.

Resultados

Ácido ascórbico reduz danos ao DNA causados pelo antileishmanial antimoniato de meglumina

A Figura 1 mostra os resultados referentes a capacidade do ácido ascórbico em reduzir os escores de danos causados pela infecção por *Leishmania* e/ou pelo antimoniato de meglumina. Na Figura 1B, observa-se que o ácido ascórbico foi capaz de reverter a instabilidade genômica induzida pelo antimonial nos animais não-infectados ($1,50 \pm 0,3$). Por outro lado, o antioxidante não se mostrou capaz de reverter os danos genéticos induzidos apenas pela infecção (Figura 1A). A Figura C traz o efeito do ácido ascórbico em animais infectados e tratados com o antileishmanial ($0,67 \pm 0,23$) comparado ao grupo que não recebeu o antioxidante ($0,76 \pm 0,24$). Observa-se que o efeito modulador do ácido ascórbico não é mais detectado quando os animais são submetidos aos dois agentes estressores, infecção e antileishmanial ($p > 0,05$).

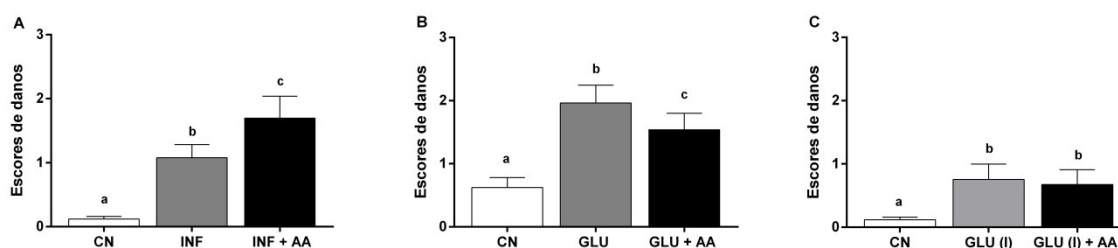


Fig 1: Escores de danos ao DNA observados pelo teste do cometa em sangue periférico de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* (n = 5 animais por grupo).

CN: animais não infectados tratados com ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias; INF: animais infectados com *L. infantum*; INF+AA: animais infectados com *L. infantum* e tratados com ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias; GLU: animais não infectados tratados com antimoniato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia); GLU+AA: animais não infectados tratados com antimoniato de meglumina (20mg/kg/dia) e ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias; GLU (I): animais infectados e tratados com antimoniato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia) e GLU (I) + AA: animais infectados e tratados com antimoniato de meglumina (20mg/kg/dia) e ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias. Letras diferentes ($p < 0,05$) por ANOVA seguido por Tukey.

Visto que o antimoniato de meglumina na dose de 20mg/kg foi capaz de causar danos ao DNA do hospedeiro, buscamos investigar o efeito dessa dose frente à infecção por *L. infantum* e ainda verificar o efeito do ácido ascórbico sobre a atividade antileishmanial do antimoniato de meglumina. Observamos na figura 2 que o antimoniato de meglumina na dose utilizada nesse trabalho não foi capaz de reduzir a carga parasitária no órgão analisado no grupo dos animais infectados. Além disso, o grupo de animais infectados que receberam co-tratamento com antimoniato de meglumina e ácido ascórbico também não apresentou diferença significativa em relação à carga parasitária dos animais infectados sem tratamento, evidenciando que o ácido ascórbico não interferiu na atividade do antimonial no linfonodo.

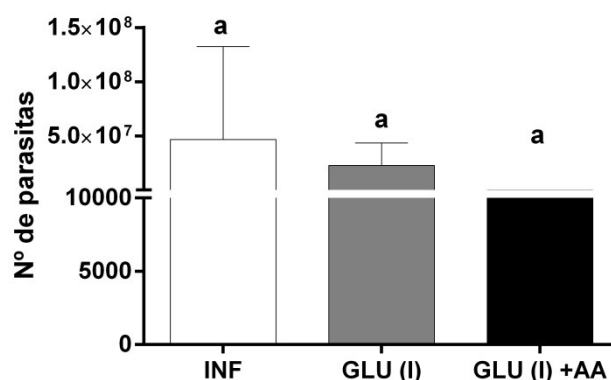


Fig 2: Carga parasitária no linfonodo de camundongos BALB/c infectados com *L. (Leishmania) infantum* após tratamento com antimoniato de meglumina em associação ou não com ácido ascórbico.

INF: animais infectados com *L. (Leishmania) infantum*; GLU (I): animais infectados e tratados antimoniato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia) e GLU (I) + AA: animais infectados e tratados antimoniato de meglumina (20mg/kg/dia) e ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias.

Ácido ascórbico não apresenta atividade antimutagênica em co-tratamento com antimoniato de meglumina

Observamos que não houve diferença na frequência de micronúcleos entre os grupos

de animais infectados tratados ou não com ácido ascórbico, demonstrando que esse antioxidante não exerce efeito antimutagênico em animais infectados por *L. infantum* (Figura 3A). Na figura 3B, reiteramos que o antimoniato de meglumina é capaz de causar mutações no DNA de células de mamíferos, porém observamos que não houve diferença na frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo que recebeu co-tratamento com ácido ascórbico.

Na figura 3C verificamos que o ácido ascórbico administrado concomitantemente ao antimoniato de meglumina em animais infectados não foi capaz de reduzir a frequência de micronúcleos quando comparado aos animais infectados tratados com o antimonial.

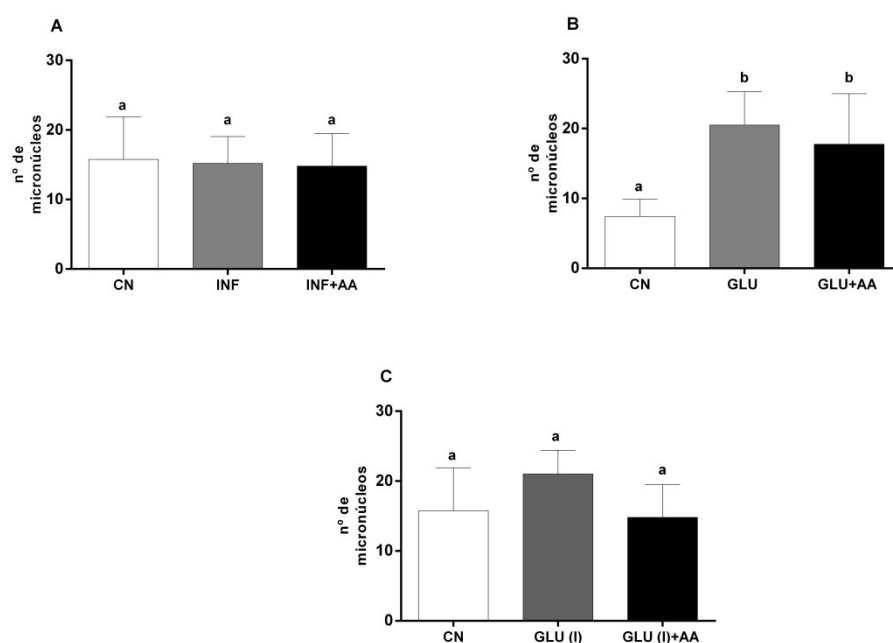


Fig 3: Frequência de células micronucleadas na medula óssea de camundongos BALB/c infectados com *L. infantum* (n = 5 animais por grupo; 2000 eritrócitos analisados por animal).

CN: animais não infectados tratados com ácido ascórbico 60mg/kg por 20 dias; INF: animais infectados com *L. infantum*; INF+AA: animais infectados com *L. infantum* tratados com ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias; GLU: animais não infectados tratados com antimoniato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia); GLU+AA: animais não infectados tratados com antimoniato de meglumina (20mg/kg/dia) e ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias; GLU (I): animais infectados e tratados antimoniato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia) e GLU (I) + AA: animais infectados e tratados antimoniato de meglumina (20mg/kg/dia) e ácido ascórbico (60mg/kg) por 20 dias. Letras diferentes (p < 0.05) por ANOVA seguido do teste de Tukey.

Antimoniato de meglumina induz superexpressão de genes do sistema antioxidante

Os mecanismos moleculares envolvidos na resposta celular aos danos causados pelo antileishmanial foram avaliados por meio da expressão diferencial de genes relacionados a defesa antioxidante, quais sejam, glutathiona S-transferase pi 1 (*GSTP1*), glutathiona sintetase (*GSS*), superóxido dismutase (*SOD1* e *SOD2*), catalase (*CAT*) e glutathiona peroxidase 1 (*GPx1*). Além disso, foram medidas alterações na expressão de m-RNA de genes relacionados ao mecanismo de reparo do DNA: 8-oxoguanina DNA glycosylase 1 (*OGG1*) e MutT homólogo 1 (*MTH1*).

Nossos resultados revelaram que todos os genes avaliados estavam super expressos (*upregulation*) em resposta aos fatores estressantes, quer seja o antimoníato de meglumina, infecção ou ambos. O gene *GSTP1* revelou aumento nos níveis de expressão na ordem de 182, 266 e 37,7 vezes maior nos animais infectados com *L. infantum* (G2), nos animais não infectados tratados com antimoníato de meglumina (G3) e nos animais infectados e tratados com antimoníato de meglumina (G4), respectivamente, havendo diferença significativa entre os grupos G2 e G4, assim como entre G3 e G4. Resultados semelhantes no aumento na expressão também foram observados para o gene *GSS*, com níveis de expressão de 28,5; 18 e 25,4 vezes para os grupos G2, G3 e G4, respectivamente, em relação ao grupo controle. Não foram observadas diferenças significativas na expressão desse gene entre os grupos G2, G3 e G4 (Figura 4).

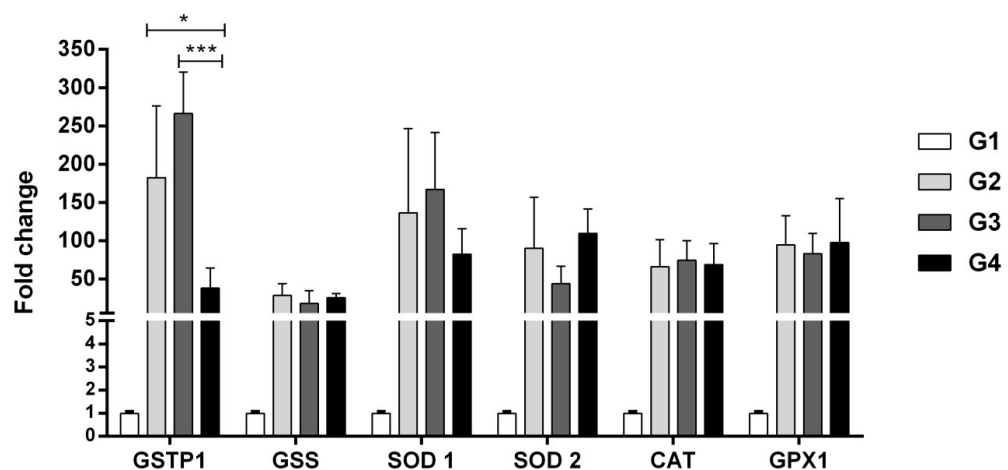


Fig 4: Nível de expressão dos genes *GSTP1*, *GSS*, *SOD 1*, *SOD 2*, *CAT* e *GPX1* relacionados a defesa antioxidante em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e tratados com antimoníato de meglumina (n=5).

G1: controle negativo (salina); G2: animais infectados por *L. infantum* por 65 dias; G3: animais não infectados tratados com antimoníato de meglumina por 20 dias e G4: animais infectados e tratados com antimoníato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia).

A análise de *SOD1* revelou também aumento na expressão desse gene em todos os grupos experimentais (G2, G3 e G4), com níveis de expressão de 246; 166,8 e 92,2 vezes, respectivamente. No entanto, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Da mesma forma, o gene *SOD2* apresentou-se 90 vezes mais expresso no grupo G2; 43,8 em G3 e 109,5 no grupo G4.

Observamos ainda que o gene *CAT* apresentou níveis de expressão de 65,8, 74,6 e 68,4 vezes, respectivamente, para os grupos G2, G3 e G4 e, por sua vez, o gene *GPX1* apresentou-se superexpresso na ordem de 94,5, 83 e 97,8 vezes respectivamente, para os grupos G2, G3 e G4 quando comparado ao controle negativo (Figura 4).

Os genes relacionados ao mecanismo de reparo avaliados nesse trabalho também mostraram aumento na quantidade de m-RNA produzida em resposta aos agentes estressores, como média de aumento para *OGG1* de 15,8; 20,2 e 2,9 vezes para os grupos de animais infectados (G2), para aquele apenas tratado com o fármaco (G3) e para o grupo exposto aos dois agentes (G4), respectivamente. Foi observada diferença significativa na expressão do gene *OGG1* entre os grupos G2 e G3 em relação ao grupo G4. Da mesma forma, houve aumento significativo na expressão do gene *MTH1* em todos os grupos analisados, no entanto com valores inferiores aos observados para o gene *OGG1* (Figura 5).

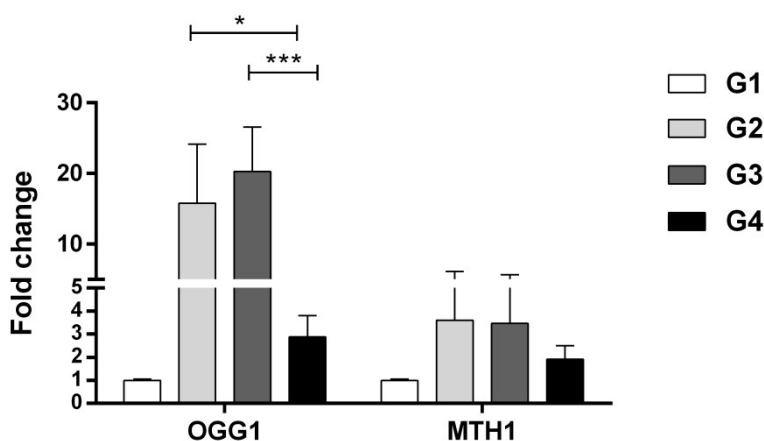


Fig 5: Nível de expressão dos genes *OGG1* e *MTH1*, relacionados ao mecanismo de reparo do DNA em camundongos BALB/c infectados por *L. infantum* e tratados com antimoníato de meglumina (n=5).

G1: controle negativo (salina); G2: animais infectados com *L.infantum* por 65 dias; G3: animais não infectados, mas tratados com antimoníato de meglumina por 20 dias e G4: animais infectados e tratados com antimoníato de meglumina por 20 dias (20mg/kg/dia).

Discussão

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação do sistema de defesa, que é formado pelas enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase) além de compostos não-enzimáticos, que são principalmente obtidos por meio da alimentação, tais como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A), entre outros (23). O ácido ascórbico, além de atuar como co-fator para enzimas e ser importante regulador na redução do ferro, é considerado o antioxidante extracelular mais importante por ser um potente redutor na presença de radicais livres (24-25).

De acordo com Moreira et al (8), o antimoníato de meglumina causa danos ao DNA pela oxidação de suas bases nitrogenadas. Outros autores relataram também a capacidade do antimoníato de meglumina em gerar espécies reativas de oxigênio, causando peroxidação lipídica e hepatotoxicidade (26,5). Considerando-se pois a propriedade antioxidante do ácido ascórbico e a capacidade do Glucantime em induzir danos genéticos por oxidação, este trabalho buscou verificar a capacidade do ácido ascórbico de reduzir os danos genéticos causados pelo antimoníato de meglumina.

Nossos dados revelaram que o antioxidante foi capaz de reduzir a instabilidade genômica causada pelo antileishmanial em animais infectados e sob tratamento por 20 dias. Esses dados corroboram alguns estudos que evidenciaram o efeito modulador do ácido ascórbico. Roy et al. (27) evidenciaram que a administração oral de vitamina C (500 mg/kg) foi capaz de diminuir a frequência de aberrações cromossômicas e danos ao DNA causados pelo trióxido de arsênio (4mg/kg) e fluoreto de sódio (8mg/kg). Farghaly e Abo-Zeid (28) demonstraram pelo ensaio do cometa e análise citogenética, que a administração simultânea de vitamina C (20mg/kg) foi capaz de inibir os danos ao DNA e aberrações cromossômicas induzidas por TMT (Trimethyltin). Konopacka (29) sugere que o ácido ascórbico é capaz de reduzir os danos genéticos pela modulação da expressão de genes envolvidos na detoxificação de ROS.

Observamos ainda que o ácido ascórbico não foi capaz de reduzir os danos genéticos

causados pela infecção. Sabe-se que após a infecção, macrófagos são ativados e aumentam a concentração de várias citocinas tais como IFN- γ e TNF- α , produzindo óxido nítrico (NO) pela ação da enzima iNOS, um mecanismo relacionado com o controle da replicação do parasita. Assim sugerimos que a elevada produção de NO durante os 65 dias de infecção pode ter causado danos a células do hospedeiro e induzido alterações no DNA, pois o NO reage com ânion superóxido formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que é altamente reativo e interage com a guanina gerando lesões no DNA, tais como 8-nitroguanina (30-31). Dessa forma, inferimos que a capacidade antioxidante do ácido ascórbico não foi eficaz em modular os danos causados ao DNA, pela infecção, devido a essas vias de estresse desencadeadas pelo parasita.

Na avaliação de mutagenicidade pelo ensaio do micronúcleo, observamos que a infecção não foi capaz de aumentar a frequência de micronúcleos, demonstrando assim que os danos causados ao DNA evidenciados pelo ensaio do cometa foram reparados, corroborando com o aumento da expressão dos genes *OGG1* e *MTH1* envolvidos no mecanismo de reparo de danos ao DNA mostrados neste trabalho. Além disso, confirma os resultados obtidos no trabalho de Moreira et al (8).

Por sua vez, os animais que receberam tratamento com o antimonial apresentaram frequência maior de células micronucleadas reforçando o potencial mutagênico desse fármaco já evidenciado por Moreira et al (8) e Lima et al (4), em camundongos infectados ou não, respectivamente. Destacamos que mesmo diante da superexpressão de genes de reparo e tratamento com ácido ascórbico, forte antioxidante, não houve modulação do efeito mutagênico do antimoniato de meglumina.

De acordo com equivalência de doses entre camundongos e humanos sugerida por Nair e Jacob (32), a dose utilizada nesse trabalho foi cerca de treze vezes menor (1,5mg/kg/dia) quando se compara a dose recomendada para o tratamento em humanos (20 mg/kg/dia) e isso reforça o fato do antileishmanial não ter reduzido a carga parasitária no linfonodo. No entanto, ressaltamos que apesar da dose de 20mg/kg não ter reduzido a carga parasitária nos animais infectados foi capaz de causar danos ao DNA do hospedeiro conforme demonstrado pelo ensaio do cometa.

Neste trabalho também analisamos a expressão de genes relacionados à defesa

antioxidante, tais como *GSS*, *GSTP1*, *GPX1*, *SOD 1*, *SOD 2* e *CAT*. Sabe-se que o gene *GSS* é responsável pela produção da enzima glutatona sintetase, importante por catalisar a reação da L-glicina com o dipeptídeo γ - glutamilcisteína na segunda etapa de formação da glutatona (GSH) (33-34). Os resultados aqui apresentados indicam que a infecção por *Leishmania (Leishmania) infantum*, o antimoníaco de meglumina e a infecção conjuntamente com o tratamento foram capazes de alterar a expressão do gene *GSS*, mostrando modulação positiva na expressão desse gene envolvido na via de biossíntese da glutatona.

Estudos têm demonstrado aumento na expressão de outros genes envolvidos nas vias de síntese de glutatona, tal como o trabalho de Grondin et al (35), no qual relataram que o aumento na expressão de *GSH1*, enzima que participa da primeira reação de biossíntese de GSH, está associado com aumento significativo dos níveis de GSH. Da mesma forma, El Fadili et al (36) revelaram superexpressão de glutamato cisteína ligase (*GCLC*), gene que codifica a enzima que atua na primeira reação para formação de GSH, em macrófagos tratados com Sb^V .

A glutatona é o principal tiol intracelular de mamíferos e tem função importante no metabolismo dos antimoniais pois induz a redução de Sb^V para a Sb^{III} , sendo essa redução favorecida em pH ácido e temperatura de 37°C (37-38). Outros tióis também podem atuar nessa conversão, tais como, cisteína, cisteína-glicina, tripanotona (39). Assim, nos grupos de animais tratados com o antimonial o aumento na expressão de *GSS* favorece a redução para a forma trivalente, que tem ação leishmanicida e também é responsável pela toxicidade causada por esse fármaco.

Outra função desempenhada pela GSH é a biotransformação e eliminação de xenobióticos por meio do processo de detoxificação, que ocorre principalmente em duas fases: I e II. Na fase I, as reações são mediadas pelas enzimas citocromo P450, que atuam principalmente na oxidação, redução e hidrólise desses xenobióticos. Na fase II ocorre reação de conjugação do grupo sulfidríla da GSH com grupos eletrofílicos dos xenobióticos, tornando-os menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a sua excreção mediada por transportadores (40-41).

As glutatona S-transferases correspondem a uma família de enzimas detoxificantes de fase II que protegem a célula por meio da conjugação da GSH com diferentes compostos

eletrofilicos. São divididas em 8 classes gênicas e dentre essas, temos que o gene *GSTP1*, localizado no cromossomo 11q13 codifica a isoenzima P1 (42). Leslie et al (43) relatam a formação de complexos de arsênio (As), elemento químico semelhante ao antimônio, com moléculas de GSH-As (GS)₃ para o efluxo por meio do transportador MRP1 e a enzima GSTP1 tem papel sinérgico importante nesse processo.

Sun et al. (44) demonstraram por espectrometria de massa que o Sb^{III} forma um composto estável com GSH com a estequiometria Sb(GSH)₃. Wyllie et al (45) reforçam que o Sb^{III} age diretamente sobre o parasita perturbando o balanço redox pela diminuição da concentração de tióis intracelulares mediante o efluxo ao formar conjugados com o Sb^{III} e pela inibição da tripanotona redutase, enzima responsável pela manutenção do estado reduzido dos tióis intracelulares. Baiocco et al (46) reafirmam que Sb^{III} interfere o potencial tiol redox da célula por inibir a atividade da enzima tripanotona redutase, resultando na acumulação de formas de dissulfureto de tripanotona e glutatona e posterior exposição dos parasitas ao dano oxidativo causado pelo ROS produzidos pelos macrófagos do hospedeiro.

Por sua vez, López et al. (38) relatam que o Sb^{III} forma complexo com GSH e que a diminuição da proporção de GSH livre pode ser pela formação do complexo Sb(GSH)₃ gerando um desequilíbrio redox e aumentando assim a atividade de ROS. Dessa forma, em nosso trabalho o aumento na expressão de *GSTP1* nos grupos analisados sugere que essa isoenzima codificada por esse gene pode estar atuando na detoxificação formando conjugados de Sb com GSH/T(SH)₂.

Ressalta-se ainda que as enzimas GSTs atuam de forma integrada e que a eficiência deste sistema depende da ação combinada de outras enzimas, como a γ - glutamilcisteína sintase (γ GluCysS) e a glutatona sintetase (GSS), no sentido de fornecer glutatona, assim como, de transportadores que facilitem o efluxo dos conjugados de GSH (41). Os nossos resultados corroboram com esses dados, visto que o aumento da expressão de *GSTP1* esteve associado com aumento na expressão de GSS.

O sistema antioxidante celular é constituído principalmente pela ação das enzimas glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (9). Glutatona peroxidases (GPxs) são enzimas responsáveis por catalisar a redução de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos em água ou alcoóis, respectivamente, utilizando a GSH como co-

fator. Dentre essa família de enzimas, a mais abundante e encontrada nos mais variados tipos celulares é a glutatona peroxidase citosólica (GPx1), classificada como a principal enzima contra o estresse oxidativo (47).

Neste trabalho, observamos superexpressão de *GPx1* nos grupos de animais infectados e sob tratamento com o antimonial. No entanto, Moreira et al (8), observaram atividade reduzida da enzima GPx em condições experimentais semelhantes. Sabe-se que a GSH é utilizada na redução de Sb^V para Sb^{III} além de ser um dos componentes da molécula de tripanotona nos tripanosomatídeos, por isso a atividade reduzida da enzima pode estar relacionada com a menor disponibilidade de GSH para atuar como co-fator para a GPx1, pois de acordo com Lubos et al (48), a atividade da GPx é diretamente proporcional a concentração de GSH livre. Por outro lado, Adinehbeigi et al (49) não encontraram diferença significativa na atividade da enzima GPx em macrófagos infectados sem tratamento e em macrófagos tratados com antimoniato de meglumina.

Além da GPx, outras duas enzimas fazem parte do sistema de defesa antioxidante da célula. A primeira delas é a superóxido dismutase, que catalisa a reação de dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos diversos compartimentos celulares. Os mamíferos apresentam três isoformas dessa enzima: SOD1 ou CuZnSOD localizada no citosol; SOD2 ou MnSOD presente nas mitocôndrias e SOD3 ou FeSOD presente no meio extracelular (50-51).

A atividade da SOD é complementada pela ação da catalase, que é uma hemoproteína citoplasmática que tem como função converter H_2O_2 em H_2O e O_2 . Mediante o estresse oxidativo sofrido pela célula, as enzimas antioxidantes respondem de maneira adaptativa elevando suas atividades nos tecidos ou ainda, aumentando os níveis de RNAm a fim de superar o estresse oxidativo (15, 23).

Observamos que em todos os grupos avaliados houve superexpressão dos genes *SOD1*, *SOD2* e *CAT* corroborando com os dados de Moreira et al (8) que evidenciaram aumento significativo na atividade total dessas enzimas quando comparado ao controle negativo, demonstrando assim o esforço da célula em tentar reverter o estresse oxidativo causado tanto pela infecção quanto pelo antimonial. Rais et al (52) sugeriram que Sb^V prepara os macrófagos para produzir ROS e aumenta a atividade da enzima NADPH-oxidase, que

atua na produção de ânion superóxido. Por sua vez, Mookerjee basu et al (53) revelam que o Sb^V induz a formação principalmente de H_2O_2 em macrófagos infectados por *Leishmania donovani* por meio da fosforilação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs).

O peróxido de hidrogênio produzido pela ação dos antimoniais ou pela resposta do hospedeiro frente à infecção apresenta baixa reatividade, porém tem um papel importante na produção de danos oxidativos, pois na presença de metais, tais como o Fe^{2+} (reação de Fenton) produz radicais hidroxila ($OH\cdot$), que são altamente reativos e podem causar danos em todos os tipos de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e DNA (54).

O dano oxidativo provocado pelos radicais livres no DNA pode ocorrer de forma direta, pela oxidação específica das bases nitrogenadas ou por quebras em uma das cadeias do DNA (SSB “single strand break”) ou quebras duplas (DSB “Double strand break”) (55-56). De acordo com David et al (57) a oxidação da guanina (8-oxoG) é a mais abundante e caracterizada lesão no DNA ocasionada por ROS visto que a guanina apresenta o menor potencial de oxidação dentre as bases nitrogenadas.

A via de reparo da 8-oxoG é composta principalmente pelas enzimas OGG1, MUTYH e MTH1. As glicosilases OGG1 e MUTYH atuam no mecanismo de reparo por excisão de bases no qual, a OGG1 é responsável pelo reconhecimento e excisão de 8-oxoG do pareamento errado com citosina e MUTYH remove resíduos de adenina pareados erroneamente com a 8-oxoG (58). A enzima MTH1, por sua vez, previne a incorporação de 8-oxodGTP no DNA, hidrolisando o trifosfato oxidado (8-oxodGTP) a monofosfato (8-oxodGMP) impedindo assim que esses nucleotídeos sejam incorporados ao DNA (59-60).

Neste trabalho demonstramos que os genes *OGG1* e *MTH1* envolvidos no mecanismo de reparo de danos ao DNA apresentaram-se superexpressos evidenciando assim a tentativa da célula em responder ao estresse oxidativo causado por ROS mediante a infecção por *Leishmania* e ao tratamento com antimoniato de meglumina. Furtado et al (61) relataram que em tripanossomatídeos como o *Trypanosoma cruzi*, a glicosilase TcOGG1, quando superexpressa, foi capaz de diminuir o nível de 8-oxoG tanto no núcleo quanto na mitocôndria após tratamento com H_2O_2 .

Desta forma, com os resultados aqui apresentados, relatamos pela primeira vez, que o antimoniato de meglumina, fármaco de primeira escolha para tratamento da leishmaniose, foi capaz de modular positivamente genes relacionado a defesa antioxidante e ao mecanismo de reparo ao DNA em resposta ao estresse oxidativo causado pela infecção e pelo tratamento com o antileishmanial antimoniato de meglumina. No entanto, ressaltamos que a resposta celular frente ao dano oxidativo não foi efetiva em reparar a instabilidade genômica, visto que as mutações foram fixadas.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa.

Financiamento: Este estudo foi financiado pela FAPEMA (Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão).

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação ética: "Todas as diretrizes internacionais, nacionais e/ou institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais foram seguidos".

Referências

1. Antinori, S., L. Schifanella, Corbellino, M. (2012). Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31, 109-118.
2. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. (2016). *Wkly Epidemiol Rec.*, 22, 287–296.
3. Lima, E. B. (2007). Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. *An. Bras. dermatol.*, 82, 111-124.
4. Lima, M. I. S., Arruda, V. O., Alves, E. V., Azevedo, A. P. de., Monteiro, S. G., Pereira, S. R. F. (2010). Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime. *Arch Toxicol.*, 84, 227–232.
5. Kato, K. C., Morais-Teixeira, E., Reis, P. G., Silva-Barcellos, N. M., Salaün, P., Campos, P. P., Corrêa-Junior, J. D., Rabello, A., Demicheli, C., Frézard, F. (2014). Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb (III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58, 481–488.

6. Goodwin, L. G., Page, J. E. (1943). A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *Biochem J.*, 37, 198–209.
7. Sereno, D., Cavaleyra, M., Zemzoumi, K., Maquaire, S., Ouaiissi, A., Lemesre, J. L. (1998). Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother.*, 42, 3097–3102.
8. Moreira, V. R., de Jesus, L. C., Soares, R. P., Silva, L. D., Pinto, B. A. S., Melo, M. N., Paes, A. M., Pereira, S. R. F. (2017). Meglumine Antimoniate (Glucantime) causes oxidative stress-derived DNA damage in BALB/c mice infected by *Leishmania (Leishmania) infantum*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 61, e02360-16.
9. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. (2007) *Free radicals in Biology and Medicine*. Ed. Oxford University Press, New York.
10. Ray, P. D., Huang, B. W., Tsuji, Y. (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, 24, 981–990.
11. Garlipp-Picchi, M., Deminice, R., Ovídio, P. P., Jordão, A. A. (2013). Efeitos do ácido ascórbico em biomarcadores de estresse oxidativo em nadadores de elite. *Rev Bras Med Esporte.*, 19, 394-398.
12. Ebuehi, O. A., Ogedegbe, R. A., Ebuehi, O. M. (2012). Oral administration of vitamin C and vitamin E ameliorates lead-induced hepatotoxicity and oxidative stress in the rat brain. *Nig Q J Hosp Med.*, 22, 85-90.
13. Boudouris, G., Verginadis, I. I., Simos, Y. V., Zouridakis, A., Ragos, V., Karkabounas, S. C., Evangelou, A. M. (2013). Oxidative stress in patients treated with continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and the significant role of vitamin C and E supplementation. *Int Urol Nephrol.*, 45, 1137-1144.
14. Harikrishnan, R., Abhilash, P. A., Das, S. S., Prathibha, P., Rejitha, S., John, F., Kavitha, S., Indira, M. (2013). Protective effect of ascorbic acid against ethanol-induced reproductive toxicity in male guinea pigs. *Br J Nutr.*, 110, 689-698.
15. Franco, A. A., Odom, R. S., Rando, T. A. (1999). Regulation of antioxidant enzyme gene expression in response to oxidative stress and during differentiation of mouse skeletal muscle. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 1122–1132.
16. Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*, 175, 184–191.
17. Tice, R. R., Agureel, E., Anderson, D., Burlison, B., Hartmann, A., Kobayashi, H. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.*, 35, 206–221.
18. Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutat Res.*, 31, 9–15.

19. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed. Cold Spring Laboratory Press, New York.
20. Degraeve, W., Fernandes, O., Campbell, D., Bozza, M., Lopes, U. (1994). Use of Molecular Probes and PCR for Detection and Typing of Leishmania - a MiniReview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 89, 463–469.
21. Prakash, J. A. J., Reller, M. E., Barat, N., Dumle, J. S. (2009). Assessment of a quantitative multiplex 5' nuclease real-time PCR for spotted fever and typhus group rickettsioses and *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Microbiol Infect.*, 15, 292-293.
22. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.*, 25, 402–408.
23. Barbosa, K. B. F., Costa, N. M. B., Alfenas, R. C. G., de Paula, S. O., Minim, V. P. R., Bressan, J. (2010). Estresse Oxidativo: Conceito Implicações e Fatores Modulatórios. *Rev. Nutr.*, 23, 629-643.
24. Sram, R. J., Binkova, B., Rossner, P. Jr. (2012). Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutat Res.*, 733, 39–49.
25. Grangeiro, M. S., Oliveira, D. M. de., El-Bachá, R. dos S., Costa, S. L., Costa, M. de F. D. (2013). Antioxidant action of ascorbic acid against catechol-induced toxicity on GL-15 cells. *Rev. Ciênc. Med. Biol.*, 12, 449-453.
26. Bento, D. B., Souza, B. de., Steckert, A. V., Dias, R. O., Leffa, D. D., Moreno, S. E., Petronilho, F., Andrade, V. M. de., Dal-Pizzol, F., Romão, P. R. (2013). Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. *Res Vet Sci.*, 95, 1134 –1141.
27. Roy, P., Mukherjee, A., Giri, S. (2015). Positive effects of Vitamin C in arsenic trioxide and sodium fluoride induced genotoxicity and oxidative stress in mice *in vivo*. *Pollution.*, 1, 451-460.
28. Farghaly, A. A., Abo-Zeid, M. A. M. (2010). Evaluation of the antimutagenic effect of Vitamin C against DNA damage and cytotoxicity induced by Trimethyltin in mice. *Researcher.*, 2, 21-27.
29. Konopacka, M. (2004). “Role of vitamin C in oxidative DNA damage”. *Postepy Hig Med Dosw (Online).*, 58, 343-348.
30. Ohshima, H., Tatemichi, M., Sawa, T. (2003). “Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis”. *Arch Biochem Biophys.*, 417, 3–11.
31. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S., Ma, N. (2006). Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation related carcinogenesis. *Biol. Chem.*, 387, 365–372.

32. Nair, A. B., Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J Basic Clin Pharm.*, 7, 27–31.
33. Lu, S. (2013). Glutathione synthesis. *Biochim Biophys Acta.*, 1830, 3143–3153.
34. Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, Radi, M., R. (2013). Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta.*, 1830, 3199–3216.
35. Grondin, K., Haimeur, A., Mukhopadhyay, R., Rosen, B. P., Ouellette, M. (1997). Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gshI* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J.*, 16, 3057–3065.
36. El Fadili, K., Imbeault, M., Messier, N., Roy, G., Gourbal, B., Bergeron, M., Tremblay, M. J., Le'gare, D., Ouellette, M. (2008). Modulation of Gene Expression in Human Macrophages Treated with the Anti-Leishmania Pentavalent Antimonial Drug Sodium Stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.*, 52, 526–533.
37. Frézard, F., Demicheli, C., Ferreira, C., Costa, M. A. (2001). Glutathione-induced Conversion of Pentavalent antimony to Trivalent Antimony in Meglumine Antimoniate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 913-916.
38. López, S., Aguilar, L., Mercado, L., Bravo, M., Quiroz, W. (2015). Sb(V) reactivity with human blood components: redox effects. *PLoS One.*, 10,e0114796.
39. Ferreira, C. dos S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., Frézard, F. (2003). Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biometals.*, 16, 441-446.
40. Torres, M. C. L., Soares, N. F. F., Maia, J. F. (2004). Parâmetros cinéticos da glutatona – S-transferase e sua ativação por extratos vegetais. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 24, 243-248.
41. Huber P. C., Almeida, W. P., Fátima, Â. de. (2008). Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim. Nova.*, 31, 1170-1179.
42. Jain, M., Kumar, S., Rastogi, N., Lal, P., Ghosal, U. C., Tiwari, A., Pant, M. C., Baiq, M. Q., Mittal, B. (2006). GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett.*, 24, 260-267.
43. Leslie, E. M., Haimeur, A., Waalkes, M. P. (2004). Arsenic Transport by the Human Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1). Evidence that a tri-glutathione conjugate is required. *J Biol Chem.*, 279, 32700–32708.
44. Sun, H., Yan, S. C., Cheng, W. S. (2000). Interaction of antimony tartrate with the tripeptide glutathione. Implication for its mode of action. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5450-5457.
45. Wyllie, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs

on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.*, 279, 39925–39932.

46. Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., Ilari, A. (2009). Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. *J. Med. Chem.*, 52, 2603–2612.

47. Brigelius-Flohé, R., Maiorino, M. (2013). Glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta.*, 1830, 3289–3303.

48. Lubos, E., Loscalzo, J., Handy, D. E. (2011). Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal.*, 11, 1957–1997.

49. Adinehbeigi, K., Razi Jalali, M. H., Shahriari, A., Bahrami, S. (2017). *In vitro* antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. *Pathog Glob Health.*, 7, 1-10.

50. Van Assche, T., Deschacht, da Luz, M., R. A., Maes, L., Cos, P. (2011). Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radical Biology & Medicine.*, 51, 337–351.

51. Cantin, A. M., Richter, M. V. (2012). Cigarette smoke-Induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. *Curr Mol Med.*, 12, 836-849.

52. Rais, S., Perianin, A., Lenoir, M., Sadak, A., Rivollet, D., Paul, M., Deniau, M. (2000). Sodium stibogluconate (Pentostam) potentiates oxidant production in murine visceral leishmaniasis and in human blood. *Antimicrob Agents Chemother.*, 44, 2406 –2410.

53. Mookerjee Basu, J., Mookerjee, A., Sen, P., Bhaumik, S., Sen, P., Banerjee, S., Naskar, K., Choudhuri, S. K., Saha, B., Raha, S., Roy, S. (2006). Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50, 1788 –1797.

54. Ribeiro, M. L., Priolli, D. G., Miranda, D. D., Arçari, D. P., Pedrazzoli, J. Jr., Martinez, C. A. (2008). Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer.*, 72, 67-72.

55. Van Loon, B., Markkanen, E., Hübscher, U. (2010). Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair.*, 9, 604– 16.

56. Dizdaroglu, M. (2012). Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. *Cancer Latt.*, 327, 26-47.

57. David, S. S., O'shea, V. L., Kundu, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature.*, 447, 941–950.

58. Barnes, D. E., Lindahl, T. (2004). Repair and genetic consequences of endogenous DNA

base damage in mammalian cells. *Annu Rev Genet.*, 38, 445-476.

59. Saraswat, V., Massiah, M. A., Lopez, G., Amzel, L. M., Mildvan, A. S. (2002). Interactions of the Products, 8-Oxo-dGMP, dGMP, and Pyrophosphate with the MutT Nucleoside Triphosphate Pyrophosphohydrolase. *Biochemistry.*, 41, 15566–15577.

60. Klungland, A., Bjellandb, S. (2007). Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. *DNA Repair.*, 6, 481–488.

61. Furtado, C., Kunrath-Lima, M., Rajão, M. A., Mendes, I. C., Moura, M. B. de, Campos, P. C., Macedo, A. M., Franco, G. R., Pena, S. D. J., Teixeira, S. M. R., Houten, B. V., Machado, C. R. (2012). Functional Characterization of 8-Oxoguanine DNA Glycosylase of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE.*, 7, e42484.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesta tese demonstramos que o potencial genotóxico do fármaco de primeira escolha utilizado no tratamento das leishmanioses, antimoniano de meglumina (Glucantime[®]), está relacionado com a oxidação das bases nitrogenadas do DNA. Demonstramos, ainda, que o antileishmanial é capaz de alterar a atividade das enzimas do sistema antioxidante (CAT, SOD e GPx) e de induzir a superexpressão de genes relacionados a defesa antioxidante, bem como de genes que atuam no mecanismo de reparo de danos ao DNA ocasionados por oxidação das bases nitrogenadas. Além disso, demonstramos que o ácido ascórbico, um potente antioxidante, é capaz de reduzir as lesões genômicas causadas pelo Glucantime[®]. Todos esses dados corroboram com a hipótese inicial levantada de que os danos genéticos induzidos pelo Glucantime[®] é mediado por espécies reativas de oxigênio geradas pelo fármaco.

Reforçamos, ainda, que a dose utilizada neste trabalho não exerceu atividade leishmanicida visto que foi inferior àquela recomendada pela Organização Mundial de Saúde. Porém, evidenciamos o seu efeito genotóxico sobre o DNA de camundongos BALB/c infectados por *L. infantum*. Nesse sentido, ressaltamos a necessidade de avaliar o efeito desse antileishmanial em regime terapêutico com a dose utilizada no tratamento em humanos para investigar o potencial efeito genotóxico do fármaco frente a outras doses, visto que a instabilidade genômica pode ser mais severa quando utilizada em doses mais elevadas; tornando assim, os pacientes sob tratamento mais suscetíveis ao surgimento de neoplasias, considerando a correlação existente entre mutagenicidade e carcinogenicidade.

Além disso, ressaltamos que o tratamento simultâneo do antileishmanial com um reconhecido antioxidante, o ácido ascórbico, foi capaz de reduzir a instabilidade genômica, mas não impossibilitou a fixação de mutações. Dessa forma, reforçamos a necessidade da realização de trabalhos que identifiquem compostos com atividade antioxidante que sejam capazes de modular a ação do fármaco exercendo atividade antimutagênica efetiva. Nessa perspectiva, é importante também avaliar a influência desses moduladores sobre a eficácia do antimonial para que redução na frequência de mutações não comprometa de forma significativa a atividade leishmanicida do fármaco.

9 REFERÊNCIAS

ALCOLEA, P. J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11-31, jan. 2010.

ALKHAWAJAH, A. et al. Subacute toxicity of pentavalent antimony compounds in rats. **Hum Exp Toxicol**, v. 11, n.4, p. 283-288, jun.1992.

ALKHAWAJAH, A. M. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration. **Ann Trop Med Parasitol**, v. 91, n. 8, p. 899-905, dec. 1997.

ALMEIDA, T. M.; ROSA, G. G.; REZENDE, F. F. M. Avaliação da terapêutica com antimonias e isotianato de pentamidina em pacientes portadores de leishmaniose cutânea atendidos na Fundação de Medicina Tropical do Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 110, 2007.

AMATO, V. S. et al. Um caso de leishmaniose cutâneo-mucosa tratado com sucesso com baixa dose de antimonial pentavalente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 31, n. 2, p. 221-224, mar./apr. 1998.

ANDERSEN, E. M. et al. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v.72, n. 2, p. 133-137, feb. 2005.

ANDRADE JR DR de et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n.1, p. 60-8, jan/fev. 2005.

ANGELI, J. P. et al. Evaluation of the genotoxic and anti-genotoxic activities of silybin in human hepatoma cells (HepG2). **Mutagenesis**, v. 25, n. 3, p. 223-229, may. 2010.

ARTUR JR. The glutathione peroxidases. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n.13-14, p.1825-35, dec. 2000.

ASAKURA, K. et al. Genotoxicity studies of heavy metals: Lead, Bismuth, Indium, Silver and Antimony. **J. Occup. Health**, v. 51, n.6, p. 498-512, oct. 2009.

ASARE, G. A. et al. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **J Ethnopharmacol**, v. 139, n. 1, p. 265-272, jan. 2012.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian J Med Res**, v.119, n. 6, p. 238-258, jun. 2004.

BALSAN, M.; FENECH, F. Acute renal failure in visceral leishmaniasis treated with sodium stibogluconate. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 515-516, sep./oct. 1992.

BARBOSA, K. B. F et al. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Rev. Nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, jul/ago. 2010.

BARNES, D. E; LINDAHL, T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. **Annu Rev Genet**, v.38, p. 445-76. 2004.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.

BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Curr Opin Microbiol**, v.11, n. 4, p. 340-344, aug. 2008.

BAUTE, J.; DEPICKER, A. Base excision repair and its role in maintaining genome stability. **Crit Rev Biochem Mol Biol**, v. 43, p. 239-76. 2008.

BECKER, I et al. The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitol Res**, v. 85, n. 3, p. 165-170, mar. 1999.

BERMAN, J. D.; GROGL, M. *Leishmania mexicana*: chemistry and biochemistry of sodium stibogluconate (Pentostam). **Exp Parasitol**, v. 67, n. 1, p. 96-103, oct. 1988.

BERMAN, J. D.; WADELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 27, n.6, p. 916-920, jun. 1985.

BERMAN, J.; GALLALLE, J.; BEST, J. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n. 2, p.197-201, jan. 1987.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; Di MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, nov/dec. 2006.

BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, v. 37, n.10, p. 1063-1075, aug. 2007.

BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G.; DREVON, C. A. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E. **J Nutr**, v. 120, p. 233-42. 1990.

BLUM, J. et al. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Among Travellers. **J Antimicrob Chemother**, v.53, n.2, p. 158-166, feb, 2004.

BOLOGNESI, C. et al. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. **Sci Total Environ**, v. 333, n. (1-3), p. 127-136, oct. 2004.

BONASSI, S. et al. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleous project. **Mutat Res**, v. 543, n. 2, p. 155-66, mar. 2003.

BRAHMACHARI, U. N. et al. Chemotherapy of antimonial compounds in kala-azar infection. Part VIII. Quantitative studies in excretion of antimony (tartar emetic stibamune). **Indian J Med Res**, v. 11, n. 3, p. 829-838, jan. 1924.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat Res**, v. 627, n. 1, p. 31-35, fev. 2007.

CANTANHÊDE, L. F. Soy isoflavones have antimutagenic activity on DNA damage induced by the antileishmanial Glucantime (meglumine antimoniate). **Drug Chem Toxicol**, v. 38, n. 3, p. 312–317. 2015.

CARVALHO, L. F. P. et al. Oxidative stress biomarkers in patients with endometriosis: systematic review. **Arch Gynecol Obstet**, v. 286, n.4, p.1033-1040, oct. 2012.

CHAGAS, E. et al. Leishmaniose visceral Americana. Nova entidade mórbida do homem na América do Sul: relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da Leishmaniose Visceral Americana em 1936. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 32, n. 3, p. 321-480, 1937.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, v. 5, n. 11, p. 873-882, nov. 2007.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 82, n. 1, p. 69-72, 1988.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radic Biol Med**, v. 48, p. 749-762. 2010.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? **Am J Clin Nutr**, v. 72, n. 2, p. 637-46. 2000.

.COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, n. 3, p. 249-261, mar. 2004.

COSTA, J. M. L et al. Visceral Leishmaniasis in the State of Maranhão, Brazil: Evolution of an Epidemic. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 321-324, apr/jun, 1995.

COUTINHO, A. C. C.; da SILVA, E. L.; CALDAS, A. J. M. Análise dos casos e óbitos por leishmaniose visceral no estado do Maranhão, no período de 2000 a 2008. **Rev Pesq Saúde**, v.13, n. 1, p. 11-15, 2012.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advancing the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 11, p. 502-508, nov. 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.1, p. 114-118, jan. 2006.

CROFT, S. L.; YARLEY, V. Chemoteraphy of leishmaniasis. **Curr Pharm Des**, v. 8, n.4, p. 319-342. 2002.

CUCÉ, L. C.; BELDA JÚNIOR, W.; DIAS, M. C. Alterações renais por hipersensibilidade ao uso de antimoniais pentavalente (glucantime) na leishmaniose tegumentar americana. Relato de um caso. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, n. 4, p. 249-251, jul./ ago. 1990.

DAHER, E. F. et al. Clinical and epidemiological features of visceral leishmaniasis and HIV co-infection in fifteen patients from Brazil. **J Parasitol**, v. 95, n. 3, p. 652-655, jun. 2009.

DALLE-DONNE I et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. **J Cell Mol Med**, v. 10, n. 2, p. 389-406, apr-jun. 2006.

DALLE-DONNE I et al. Protein carbonylation in human diseases. **Trends Mol Med**, v.9, n. 4. p. 169-176, apr. 2003.

DAUN, C.; AKESSON, B. Glutathione peroxidase activity and content of total and soluble selenium in five bovine and porcine organs used in meat production. **Meat Sci**, v. 66, n. 4, p. 801-807, apr. 2004.

DAVID, S, S; O'SHEA, V. L; KUNDU, S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. **Nature**, v. 447, n. 7147, p. 941–50. jun. 2007.

DEMICHELI, C; FRÉZARD, F. Novas embalagens para medicamentos à base de antimônio usados no tratamento de leishmaniose e esquistossomose. **Cadernos temático de Quím. Nova na escola**, n. 6, p. 1-7, jun. 2005.

DEMICHELI, C. et al. Pentavalent organoantimonial derivatives: two simple and efficient synthetic methods for meglumine antimonate. **Appl. Organomet. Chem**, v. 17, n. 4, p. 226–231, apr. 2003.

DEMICHELI, C. et al. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochim Biophys Acta**, v.1570, n. 3, p. 192– 198, apr. 2002.

DENTON, H; MCGREGOR, J. C; COOMBS, G. H. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochem J**, v. 381, n. 2, p. 405-412, jun. 2004.

DIAMENT, M. et al. N-metilglucamina (Glucantime) e insuficiência renal aguda no tratamento da leishmaniose muco-cutânea: Relato de um Caso. **Acta Cir. Bras**, v.18, n. 4, p.24, 2003.

DIZDAROGLU, M. Oxidatively induced DNA damage: Mechanisms, repair and disease. **Cancer Latt**, v. 327, n. 1-2, p. 26-47, dec. 2012.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2576-2597, nov. 2012.

DUARTE, T. L; LUNEC, J. Review: When is an oxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. **Free Radic Res.**, v. 39, n. 7, p. 671-686, jul. 2005.

EPHROS, M. et al. Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 43, n. 2, p. 278-82, feb. 1999.

FENECH, M. et al. The Human MicroNucleous Project- An International collaborative on the use of micronucleous technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat Res**, v. 428, n. (1-2), p. 271-283. jul. 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v. 455, n.1-2, p. 81-95, nov. 2000.

FERREIRA, A. L.A; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v.43, p.61-68, 1997.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar.1997.

FERREIRA, C dos S. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biometals**. v. 16, n. 3, p. 441-446, sep. 2003.

FIORUCCI, A. R; SOARES, M. H. F. B; CAVALHEIRO, E. T. G. A Importância da Vitamina C na Sociedade Através dos Tempos. **Quím. Nov. na Escola**, São Paulo, v.17, maio. 2003.

FRÉZARD, F. et al. Chemistry of antimony-based drugs in biological systems and studies of their mechanism of action. **Rev Inorg Chem**, v. 33, n.1, p. 1–12, feb. 2013.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 3, p. 913-916, mar. 2001.

FRÉZARD, F; DEMICHELI, C; RIBEIRO, R. R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2317-2336, jun. 2009.

GIL, E. S. et al. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. **Vita et Sanitas**, v. 1, n. 1, p. 91-115, 2007.

GIOVANELLI, L. et al. Measurement of DNA breaks and oxidative damage in polymorphonuclear and mononuclear white blood cells: a novel approach using the comet assay. **Mutat. Res**, v. 538, n. 1-2, p. 71-80, jul. 2003.

GOODWIN, L. G, PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem J**, v.37, n. 2, p.198 –209. 1943.

GROTTO, D. et al. Low levels of methylmercury induce DNA damage in rats: protective effects of selenium. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 3, p. 249-254, mar. 2009.

GUARATINI, T; MEDEIROS, M. H. G; COLEPICOLO, P. Antioxidants in the skin: applications and evaluation of their efficacy. **Quím. Nova**, v.30, n.1, jan/feb. 2007.

HALDAR, A. K; SEN, P; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Mol Biol Int.**, v. 2011, p. 1-23, mar. 2011.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. Estresse oxidativa. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford Science Publications, 1999. p. 246–350.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. The antioxidants of human extracellular fluids. **Arch Biochem Biophys**, v. 280, n. 1, p. 1-8, jul. 1990.

HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species can be poisonous. In: HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford Science Publications, p. 440–487. 2007.

HANTSON, P. et al. Cytogenetic observations after meglumine antimoniate therapy for visceral leishmaniasis. **Pharmacotherapy**, v.16, n. 5, p. 869-871, sep./oct. 1996.

HEADLEY, J. V. et al. Fast-atom bombardment mass spectrometry of the organometallic parasiticide, meglumine antimonate. **Rapid Commun. Mass Spectrom**, v. 9, n. 5, p. 372-376, apr. 1995.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: STOREY, K. B. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. New Jersey: Wiley-Liss, Inc., p. 319-368. 2004.

HUBER, P. C; ALMEIDA, W. P; FÁTIMA, Â de. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quím. Nova**, v. 31, n. 5, p.1170-1179. 2008.

IQBAL, K; KHAN, A; KHATTAK, M. M. A. K. Biological significance of ascorbic acid (vitamin C) in human health: a review. **Pakistan J Nutr.**v.3, n. 1, p. 5-13. 2004.

JONES, D. P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. **Methods Enzymol**, v. 348, p.93-112. 2002.

KATO, K. C. et al. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb (III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 481-488, jan. 2014.

KINNULA, V. L; CRAPO, J. D. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. **Free Radic Biol Med**, v. 36, n. 6, p.718-744, mar. 2004.

KOURY, J. C; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Rev Nutr**, v. 16, n.4, p. 433-41. 2003.

KUMAR, R; ENGWERDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clin Transl Immunology**, v.3, n.3, p. e13. 2014.

LAWN, S. D. et al. Eletrocardiographic and biochemical adverse effects of sodium stibogluconate during treatment of cutaneous and mucosal leishmaniasis among returned travellers. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100, n.3, p.264-269, mar. 2005.

LEE, N et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death Differ**, v. 9, n. 1, p. 53-64. 2002.

LEE, R. F; STEINERT, S. Use of single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine e and freshwater) animals. **Mutat Res**, v. 544, n. 1, p. 43-64, sep. 2003.

LESGARDS, J. F. et al. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chem Biol Interact**, v. 190, n.1, p. 28-34, mar. 2011.

LIMA, E. B. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. dermatol**, v. 82, n. 2, p. 111-124, mar./ abr. 2007.

LIMA, E. S; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Rev Bras Ciênc Farm.** v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez. 2001.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime®. **Arch Toxicol**, v. 84, n.3, p. 227-232, mar. 2010.

LLANOS-CUENTAS, A. et al. Clinical and parasite species risk factors for pentavalent antimonial treatment failure in cutaneous leishmaniasis in Peru. **Clin Infect Dis**, v. 46, n. 2, p. 223–231, jan. 2008.

LOPEZ, G. T. **Efeitos do antimoniato de N-metilglucamina e Sb^v sobre parâmetros citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em cultura de leucócitos humanos**. 2015. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2015.

LOZANO, R. et al. Global and regional mortality from 795 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**, v. 380, n. 9859, p. 2095-2128, dec. 2012.

MA, H. et al. Oxidative DNA damage and its repair in rat spleen following subchronic exposure to aniline. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 233, n. 2, p. 247- 253, 2008.

MALTEZOU, H. C. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 617521, aug. 2010.

MARCILI, A. et al. Phylogenetic relationships of *Leishmania* species based on trypanosomatid barcode (SSU rDNA) and gGAPDH genes: Taxonomic revision of *Leishmania (L.) infantum chagasi* in South America. **Infect Genet Evol**, v. 25, p. 44–51, jul. 2014.

MARSDEN, P. D. et al. High continuous antimony therapy in two patients with unresponsive mucosal leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 34, n. 4, p. 170-173, jul. 1985.

MAYRINK, W et al. Immunotherapy, Immunochemotherapy and chemotherapy for American Cutaneous Leishmaniasis Treatment. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.1, p. 14-21, jan. 2006.

MEDINA, L. F. C. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutat Res**, v. 650, n. 2, p.140- 149, feb. 2008.

MIEKELEY, N; MORTARI, S. R; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal Bioanal Chem**, v. 372, n. 3, p. 495-502, feb. 2002.

Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral – situação epidemiológica. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN). 2015 [acessado em 15 maio. 2017]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/726-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-visceral-lv/11334-situacao-epidemiologica-dados>.

MIRANDA, E. S. et al. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. **Reprod Toxicol**, v. 21, n. 3, p. 292-300, apr. 2006.

MONTEIRO, E. M et al. Leishmaniose visceral: estudo de flebotomíneos e infecção canina em Montes Claros, Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v.38, n. 2, p.147-152. 2005.

MOTTA, J. O. C; SAMPAIO, R. N. R. A pilot study comparing low-dose liposomal amphotericin B with N-methyl glucamine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 26, n. 3, p. 331-335, mar. 2012.

MURRAY, C. J. L et al. Disability-adjusted life years 803 (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the 804 Global Burden of Disease Study. **Lancet**, v.380, n. 9859, p. 2197-2223, dec. 2012.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, aug. 2001.

NAME, R. Q. et al. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 3, p. 249-254, may. 2005.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J. Dtsch Dermatol Ges**, v. 6, n. 9, p. 754-765, sep. 2008.

NORDBERG, J; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31, n.11, p. 1287-1312. 2001.

OLIVEIRA, A. L. et al. Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. **Trop Doct**, v.39, n. 3, p.180-182, jul. 2009.

OLIVEIRA, M. C. et al. Óbito em caso de Leishmaniose cutâneo-mucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 38, n. 3, p. 258-260, may./jun. 2005.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ L. et al. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **Int J Antimicrob Agents**, v. 30, n. 4, p. 325-329, out. 2007.

OSTLING, O; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, n. 1, p. 291-298, aug. 1984.

PANTKE, U et al. Oxidized proteins as a marker of oxidative stress during coronary heart surgery. **Free Radic Biol Med**, v. 27, n. 9-10, p. 1080–1086. 1999.

PASTORINO, A. C et al. Visceral leishmaniasis: clinical and laboratorial aspects. **J Pediatr**, v. 78, n. 2, p. 120-127, mar./apr. 2002.

PAUMGARTTEN, F. J; CHAHOUD, I. Embryotoxicity of meglumine antimoniate in the rat. **Reprod Toxicol**, v. 15, n. 3, p. 327-31, may./jun. 2001.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 27, n.3, p.1-21, jun. 2014.

POON, R et al. Effects of antimony on rats following 90-day exposure via drinking water. **Food Chem Toxicol**, v. 36, n. 1, p. 21- 35, jan. 1998.

RATH, S et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim Nova**, v. 26, n.4, p. 550-555, jul./ago. 2003.

RAY, P. D; HUANG, B. W; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cell Signal**, v. 24, n. 5, p. 981–990, may. 2012.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v.146, n.1-2, p.22-53.

REITHINGER, R et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-596, sep. 2007.

RESENDE, F. A et al. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutat Res**, v. 634, n. 1-2, p. 112-8. 2007, dec. 2007.

RIBEIRO, L. R, SALVADORI, D. M. F, MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. Ulbra, 2003.

RIBEIRO, M. L et al. Analysis of oxidative DNA damage in patients with colorectal cancer. **Clin Colorectal Cancer**, v. 7, n. 4, p. 267-72, jul. 2008.

RINALDI, R et al. Reactive Intermediates and The Dynamics of Glutathione Transferases. **Drug Metab Dispos**, v. 30, n. 10, p. 1053-1058, oct. 2002.

ROBERTS, W. L; MCMURRAY, W. J; RAINEY, P. M. Characterization of the antimonial antileishmanial agent meglumine antimonite (Glucantime). **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n. 5, p. 1076 – 1082, may. 1998.

ROBERTSON, A. B et al. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. **Cell Mol Life Sci**, v. 66, n. 6, p. 981–93, mar. 2009.

RODRIGUES, A. M et al. Fatores Associados ao Insucesso do Tratamento da Leishmaniose Cutânea com Antimoniato de Meglumina. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 39, n. 2, p. 139-145. 2006.

ROY, P et al. Biological targeting and drug delivery in control of leishmaniasis. **J. Cell Anim. Biol**, v. 6, n. 6, p. 73-87, mar. 2012.

RUTKOWSKA, M. et al. Increased protein carbonyl groups in the serum of men with chronic arterial occlusion and the effect of postoperative treatment. **Med Sci Monit**, v.11, n. 2, p. 79-83, feb. 2005.

SADEGHIAN, G; ZIAEI, H; SADEGHI, M. Electrocardiographic changes in patients with cutaneous leishmaniasis treated with systemic glucantime. **Ann Acad Med Singapore.**, v.37, n. 11, p. 916-918, nov. 2008.

SAMPAIO, R. N. R et al. Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimônio pentavalente administrado na dose de 40mg Sb^V/kg/dia, de 12/12h, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 30, n. 6, p. 457-463, nov./dez. 1997.

SAUVAIGO, S. et al. Comet assay coupled to repair enzymes for the detection of oxidative damage to DNA induced by low doses of gamma-radiation: use of YOYO-1, low-background slides, and optimized electrophoresis conditions. **Anal Biochem**, v. 303, n .1, p.107-109, apr. 2002.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, jul. 2005.

SCHETTINI, D. A et al. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. **Int J Pharm**, v. 315, n. 1-2, p.140-147, jun. 2006.

SCHIMID, W. The micronucleus test. **Mutat Res**. v. 31, n. 1, p. 9-15, feb. 1975.

SERENO, D et al. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.7, p. 2064-2069, jul. 2001.

SERENO, D. et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 12, p. 3097-3102, dec. 1998.

SHAKED-MISHAN, P et al. Novel Intracellular Sb^V reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. **J Biol Chem**, v. 276, n. 6, p. 3971-3976, feb. 2001.

SHAW, J. J. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p. 471-478, jul./sept. 1994.

SHINMURA, K et al. Role of Base Excision Repair Enzyme MUTYH in the Repair of 8-Hydroxyguanine and MUTYH-Associated Polyposis (MAP). **Hereditary Genet**, v.1, n. 3, p. 111. 2012.

SILVA, A. R da. et al. **Controle de doenças infecciosas e parasitárias**- Projeto de funcionamento e relatório técnico de gestão 2012/2013. São Luís: UFMA/SVS-MS/SES/SEMUS, 2015.

SINGH, N. P et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-191, mar. 1988.

SLUPPHAUG, G et al. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutat Res**, v. 531, n. 1-2, p. 231-251, oct. 2003.

SOTO, J et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis: placebo-controlled multicenter study. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 9, p. 1266-1272, may. 2004.

STADTMAN, E. R; LEVINE, R. L. Free radical –mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 207-218, dec. 2003.

STAGSTED, J. Absence of both glutathione peroxidase activity and glutathione in bovine milk. **Int Dairy J**, v. 16, n.6, p. 662-668, jun. 2006.

SUDHANDIRAN, G; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca^{2+} through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J Biol Chem**, v. 278, n. 27, p. 25120-25132, jul. 2003.

SUNDAR, S; CHAKRAVARTY, J. Recent advances in the diagnosis and treatment of kala-azar. **Nati Med J India**, v. 25, n. 2, p.85-89, mar./apr. 2012.

SUNDAR, S; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **Indian J Med Res**, v. 123, n. 3, p. 345-352, mar. 2006.

SUNDAR, S.; RAI, M. Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 9, n. 5, p. 951-958, sep. 2002.

TICE, R. R. et al. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-221, jun. 2000.

TOWNSEND, D. M; TEW, K. D; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 3-4, p. 145-55, may./jun. 2003.

UFMG. Cinthia Demicheli. **Síntese de derivados de antimônio pentavalente utilizados no tratamento de protozooses**. BR n. PI 9907575-0, 1999.

VALKO, M et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress induced cancer. **Chem Biol Interact**, v. 160, n. 1, p. 1-40, mar. 2006.

VALLADARES, J. E et al. Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. **Vet Parasitol**, v. 75, n. 1, p: 33-40, feb. 1998.

VALLADARES, J. E et al. Disposition of antimony after the administration of N-methylglucamine antimoniate to dogs. **Vet Rec**, v. 138, n. 8, p. 181-183, feb. 1996.

VASCONCELOS, S. M. L et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidants e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, sept./out. 2007.

VIAU, C. M et al. SnCl₂- induced DNA damage and repair inhibition of MMS-caused lesions in V79 Chinese hamster fibroblasts. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 8, p. 769-75, aug. 2009.

WERNECK, G. L. Geographic spread of visceral leishmaniasis in Brazil. **Cad Saude Publica**, v. 26, n. 4, p. 644-645, apr. 2010.

WILSON 3rd, D. M et al. Variation in Base Excision Repair Capacity. **Mutat Res**, v. 711, n. 1-2, p. 100-112, jun. 2011.

WITTE, I et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 21-26, may. 2007.

WONG, V. W. C. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Curr Top Nutraceutical Res**, v. 3, n. 1, p.1-14, sep. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. 2017. Leishmaniasis - Burden of Disease. Disponivel em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em: 10 de abril de 2017.

WYLLIE, S; CUNNINGHAM, M. L; FAIRLAMB, A. H. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. **J. Biol. Chem**, v. 279, n. 38, p. 39925-39932, sep. 2004.

WYLLIE, S; FAIRLAMB, A. H. Differential toxicity of antimonial compounds and their effects on glutathione homeostasis in a human leukaemia monocyte cell line. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 3, p. 257–267, jan. 2006.

YAN, S; WONG, I. L. K; CHOW, L. M. C.; SUN, H. Rapid reduction of pentavalent antimony by trypanothione: potential relevance to antimonial activation. **Chem Commun**, v.21, n. 2, p. 266-267, jan. 2003.

ZHOU, Y. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug Pentostam. **J Biol Chem**, v. 279, n. 36, p. 37445-37451, sep. 2004.

ANEXOS



The antileishmanial drug miltefosine (Impavido®) causes oxidation of DNA bases, apoptosis, and necrosis in mammalian cells



Patrícia Valéria Castelo Branco^{a,*}, Rossy-Eric Pereira Soares^a, Luís Cláudio Lima de Jesus^a,
 Vanessa Ribeiro Moreira^a, Hugo José Alves^a, Marta Regina de Castro Belfort^a,
 Vera Lucia Maciel Silva^b, Silma Regina Ferreira Pereira^a

^a Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária do Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil

^b University of State of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2016

Accepted 9 June 2016

Available online 24 June 2016

Keywords:

Genotoxicity

Comet assay

Micronucleus test

ABSTRACT

Miltefosine was developed to treat skin cancer; further studies showed that the drug also has activity against *Leishmania*. Miltefosine is the first oral agent for treating leishmaniasis. However, its mechanism of action is not completely understood. We have evaluated the induction of DNA damage by miltefosine. Cytotoxicity and genotoxicity (comet assay) tests were performed on human leukocytes exposed to the drug *in vitro*. Apoptosis and necrosis were also evaluated. *In vivo* tests were conducted in Swiss male mice (*Mus musculus*) treated orally with miltefosine. Oxidation of DNA bases in peripheral blood cells was measured using the comet assay followed by digestion with formamidopyrimidine glycosylase (FPG), which removes oxidized guanine bases. The micronucleus test was performed on bone marrow erythrocytes. Miltefosine caused DNA damage, apoptosis, and necrosis *in vitro*. Mice treated with miltefosine showed an increase in the DNA damage score, which was further increased following FPG digestion. The micronucleus test was also positive.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Miltefosine (hexadecylphosphocholine) was developed as an anticancer drug. The antileishmanial activity of this agent was discovered through *in vitro* and *in vivo* tests [1]. Miltefosine has been in use since 2002 as the first and only orally administered drug to treat leishmaniasis, in India, South America, and Germany [2]. In 2011, miltefosine was included as an antileishmanial drug in the World Health Organization list of essential medicines [3].

Miltefosine is a simple, very stable, relatively safe, and highly effective drug. Cure rates in India are 97% for *Leishmania donovani*, 91% for *L. panamensis* in Colombia, and 53% for *L. braziliensis* and *L. mexicana* in Guatemala [4]. In Brazil, the response rate for *L. braziliensis* is 75% [5] and 71.4% for *L. guyanensis* [6].

Miltefosine belongs to the class of zwitterionic surfactants; it is structurally similar to biological membrane phospholipids [7]. It interacts with protozoan cell membranes, then quickly reaches

subcellular membranes, where it can affect metabolism [8,9]. Hence, the cell membrane is considered the main site of action; miltefosine is inserted in the phospholipid membrane by miscibility and through interaction with membrane sterols [10]. The drug is transported into the cell through a protein complex in the parasite's plasma membrane [3].

The use of miltefosine for the treatment of leishmaniasis is considered very beneficial due to its lower toxicity and side effects compared to those of pentavalent antimonials and also due to its easier administration [11]. Effective oral medication against leishmaniasis is critical because this disease is prevalent in poor regions, such as India, Bangladesh, Nepal, and Brazil; oral administration would increase adherence to the treatment [12].

Miltefosine is well absorbed orally and is rapidly distributed throughout the body. It accumulates in the liver, spleen, kidneys, lungs, and adrenal glands; it is slowly metabolized by liver phospholipases, and urinary excretion is minimal [13,14]. Prolonged treatment (28 d) is required and the drug has a long half-life (approximately 150 h) [15].

Pentavalent antimonial agents are the most commonly used antileishmanial drugs worldwide, despite studies that have

* Corresponding author at: Av dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária do Bacanga, São Luís - MA, CEP 65080-805, Brazil.

E-mail address: ifevp@yahoo.com.br (P.V. Castelo Branco).

reported their high toxicity [16,17], genotoxicity, and mutagenicity [18].

The Food and Drug Administration (FDA) described possible mutagenic effects of miltefosine, based on seven mutagenicity tests. Only one of the tests gave positive results [19]. The objective of the present study was to evaluate the interaction of miltefosine with the genetic material.

2. Materials and methods

Miltefosine capsules (Impavido®–50 mg) were kindly provided by Prof. Dr. Carlos Costa from the Leishmaniasis Laboratory (Laboratório de Leishmanioses – [LabLeish]) of the Federal University of Piauí (UFPI), Brazil. For the assays, capsules were dissolved in distilled water. All concentrations were previously assayed for cellular viability based on the World Health Organization recommended dose of 2.5 mg/kg/day.

2.1. *In vitro* assays

All *in vitro* assays were carried out on peripheral blood leukocytes obtained from three male and three female volunteers. Inclusion criteria were: 19–30 years of age, healthy, non-smoker, medication-free, and chemotherapy- or radiation therapy-free for the last six months (Ethics Committee Opinion n° 1.284.493-UFMA). Peripheral blood (20 mL) was collected from each subject in heparinized tubes; leukocytes were obtained using Ficol Paque™ Plus. Cells were uniformly diluted in RPMI culture medium, 5 mL, exposed to the drug immediately (time 0), and harvested after 3 and 24 h (for the comet assay and cell viability) and after 48 h for the cell death assays. For the negative control, cells were grown in RPMI 1640 medium alone. For the positive control, cells were treated with H₂O₂, 10 vol (30 mg/mL), 10 µL, for 10 min.

2.1.1. Cell viability

Cell viability was determined in a pilot test (100, 50, 25, and 10 µg/mL) by adding trypan blue (0.4%, 10 µL) to cell suspension, 10 µL. One hundred cells were counted for each treatment and the cultures had to have >70% viable cells to be used [20]. We performed cytotoxicity tests at both exposure times (3 and 24 h). The final concentrations established were C1 (0.25 µg/mL), C2 (0.5 µg/mL), and C3 (1.0 µg/mL).

2.1.2. Comet assay

Leukocytes were grown for 3 and 24 h in PB-MAX™ medium (Gibco® Life Technologies™). Then, low-melting-point agarose (0.5%, 200 µL) was added to cell suspension, 100 µL. This mixture was dropped on slides pre-treated with normal melting point agarose (1.5%) and cooled for 5 min. After solidification, the slides were immersed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% dimethyl sulfoxide, 1% Triton X-100, pH 10.0) and refrigerated overnight at 4°C. Subsequently, the slides were incubated in alkaline solution (10 M NaOH, 0.2 M EDTA, and distilled water, pH 13.0) for 20 min at 4°C. Electrophoresis was performed for 25 min/25 V (0.72 V/cm)/300 mA. Slides were neutralized (0.4 M Tris/HCl, pH 7.5), dried at room temperature (22–25°C) and fixed in 100% ethanol for 4 min. Then, slides were submitted to 20 µg/mL ethidium bromide [21,22] and analyzed under a fluorescence microscope (Olympus BX61).

One hundred nucleoids were analyzed by considering size and amount of DNA present in the comet tail. The damage was classified into five levels: Class 0, no damage (<5%); Class 1, low damage (5–20%); Class 2, moderate damage (20–40%); Class 3, high damage (40–94%); Class 4, total damage (>95%) [23]. The damage score was

obtained by multiplying the number of nucleoids in each class by the respective class value, according the equation:

$$\text{Score} = [(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)] / \text{total number of cells}$$

2.1.3. Cytotoxicity assay

After 48 h culture, an aliquot (50 µL) of cell suspension was stained with 2.5 µL of a fluorescent dye mixture (5 µg/mL propidium iodide, 15 µg/mL fluorescein diacetate, 2 µg/mL Hoechst 3334 and 15 µL PBS, pH 8.0) and then incubated at 37°C for 5 min [24]. Six repetitions were performed for each treatment; 500 cells from each animal were analyzed using a fluorescence microscope (triple-band filter), totaling 3000 cells per treatment group. Cells were classified as normal (spherical nuclei stained in blue and cytoplasm stained in green), necrotic (spherical nuclei stained in red), or apoptotic (blue-stained nucleus with apoptotic bodies and green cytoplasm) [25].

2.2. *In vivo* assays

2.2.1. Animals

The Animal Ethics Committee of the Federal University of Maranhão (Protocol no. 23115-009229/2014-21) approved all experimental procedures. Male Swiss *Mus musculus* mice (n = 25) weighing 30 g were obtained from the Animal Breeding Unit (Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil). The animals were kept in a well cross-ventilated room at 21 ± 2°C with relative humidity 44–56% and light and dark cycles of 12 h. They had access ad lib to sterilized food and water.

2.2.2. Doses and treatment

To perform *in vivo* tests, miltefosine (Impavido®) doses were established based on the recommended dose for treating leishmaniasis, according to the WHO, which is 2.5 mg/kg over 28 d, for cumulative dose = 70 mg/kg. Thus, each group of animals received an acute treatment at one of three doses (35; 70; and 140 mg/kg). All treatments were administered orally in volumes of 0.1 mL/10 g of body weight. The negative control group received distilled water and the positive control group received cyclophosphamide (50 mg/kg) intraperitoneally. The animals were euthanized 24 h after receiving the drug.

2.2.3. Comet assay

The standard alkaline comet assay was performed using peripheral blood cells. After 24 h treatment, a small incision was made on the extremity of the animal's tail to collect 5 µL peripheral blood, which was mixed with 100 µL low-melting-point agarose (0.5%). Then, this mixture was transferred to slides with normal-melting-point agarose (1.5%). The subsequent steps were as previously described for the comet assay *in vitro*.

The comet assay was followed by FPG (formamidopyrimidine-DNA glycosylase) digestion to test whether miltefosine induces DNA damage by base oxidation. The FPG FLARE™ kit (Trevigen, Gaithersburg, MD) was used following the protocol described by Gajski et al. [26]. After the lysis step, the slides were immersed in 1 × FLARE™ (Trevigen) for 30 min. Then, each slide was treated with 150 µL FPG solution, covered with a coverslip, and incubated at 37°C for 45 min in a moist chamber. The coverslips were then removed and the electrophoresis, neutralization, fixation, staining, and analysis steps were performed as previously described for the *in vitro* comet assay.

2.2.4. Micronucleus test

The micronucleus test was performed in bone marrow cells collected from the same animals used for the comet assay. Briefly,

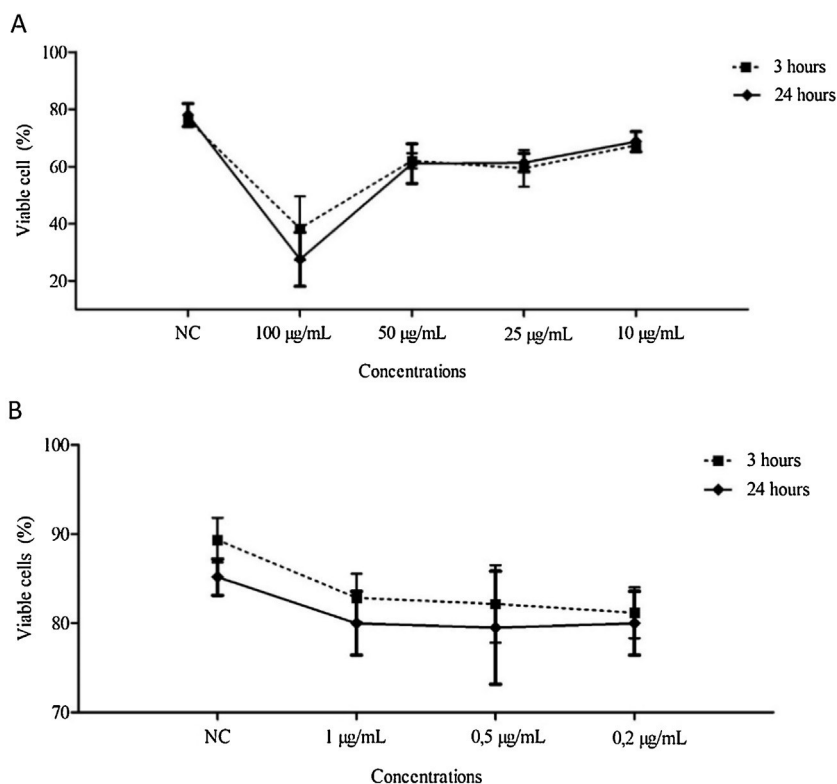


Fig. 1. Cell viability (%) detected in human leukocytes ($n = 6$ volunteers) *in vitro* treated with different concentrations of miltefosine (Impavido®) for 3 and 24 h. A: concentrations lower than 70% viability; B: concentrations higher than 70% viability. NC: negative control (water).

Table 1
DNA damage scores (mean \pm SD) and frequency of comet classes detected in human leukocytes treated with different concentrations of miltefosine (Impavido®) *in vitro* for 3 and 24 h.

Groups	Class (%)					Scores Mean \pm SD
	0	1	2	3	4	
3h						
NC	86.5	7.5	2.0	1.8	2.2	0.26 \pm 0.01 ^a
PC	0.0	0.0	0.2	11.6	88.2	3.88 \pm 0.06 ^b
C1	79.0	12.8	3.6	1.6	3.0	0.37 \pm 0.17 ^a
C2	80.2	10.5	3.3	3.0	3.0	0.38 \pm 0.18 ^a
C3	80.5	9.2	3.2	2.8	4.3	0.41 \pm 0.15 ^a
						$F = 762.35$ $p < 0.0001$
24h						
NC	86.7	7.8	1.7	1.8	2.0	0.25 \pm 0.15 ^a
PC	0.0	0.2	0.7	10.3	88.8	3.88 \pm 0.08 ^b
C1	61.1	20.2	5.0	7.5	6.2	0.83 \pm 0.28 ^c
C2	58.7	18.4	3.7	10.7	8.5	0.77 \pm 0.28 ^c
C3	64.9	13.1	4.5	9.0	8.5	0.83 \pm 0.23 ^c
						$F = 259.14$ $p < 0.0001$

Different letters denote statistical difference among groups ($p < 0.01$ by Tukey test).

F refers to the ANOVA's statistic.

NC: negative control (water); PC: positive control (cyclophosphamide 50.0 mg/kg); C1: 0.25 µg/mL; C2: 0.5 µg/mL; C3: 1.0 µg/mL.

after collecting blood, the animals were euthanized by anesthesia overdose (xylazine, 1 mL/kg and ketamine, 0.1 mL/kg). Next, femurs and muscles were removed, and epiphyses were cut. The bone marrow was removed by aspiration with fetal bovine serum. The cell suspension was centrifuged for 5 min at 1000 rpm. The supernatant was discarded and a slide smear was made with the remaining material. The material was fixed in absolute methanol for 10 min, and then stained with May Grunwald-Giemsa diluted in a phosphate buffer (pH 6.8). This stain differentiates young or polychromatic erythrocytes (PCEs) (light, purplish blue) from normochromatic erythrocytes (NCEs) (light red) [27].

The toxicity of miltefosine (Impavido®) was estimated using 1000 erythrocytes per animal by calculating the PCE/NCE ratio. Moreover, 2000 PCE for each animal were analyzed to determine the frequency of micronucleated cells.

2.3. Statistic analysis

The normality of the data was analyzed by the Shapiro-Wilk test. The nonparametric Kruskal-Wallis test was applied to analyze the comet assay data, followed by Tukey's test. The comparison between the damage score obtained from both the comet assays

Table 2

DNA damage scores (mean \pm SD) and frequency of comet classes detected by the alkaline comet assay in peripheral blood of Swiss *Mus musculus* mice treated with different doses of miltefosine (Impavido[®]) for 24 h.

Groups	Classes (%)					Scores Mean \pm SD
	0	1	2	3	4	
NC	50.0	37.4	5.8	3.2	3.6	0.73 \pm 0.1 ^a
PC	30.2	23.8	18.4	11.8	15.8	1.59 \pm 0.3 ^{b*}
D1	21.6	19.4	13	12.4	34.4	2.20 \pm 0.2 ^{c**}
D2	19.0	19.8	12	11.4	37.2	2.27 \pm 0.1 ^{c**}
D3	18.2	19.2	12.0	13.6	37.0	2.32 \pm 0.2 ^{c**}
						F = 54.1067 p < 0.0001

Different letters denote statistical difference among groups (p < 0.05 by Tukey test; * p < 0.05, ** p < 0.01).

F refers to the ANOVA's statistic.

NC: negative control (water), CP: positive control (cyclophosphamide 50 mg/kg), D1: 35 mg/kg, D2: 70 mg/kg, D3: 140 mg/kg.

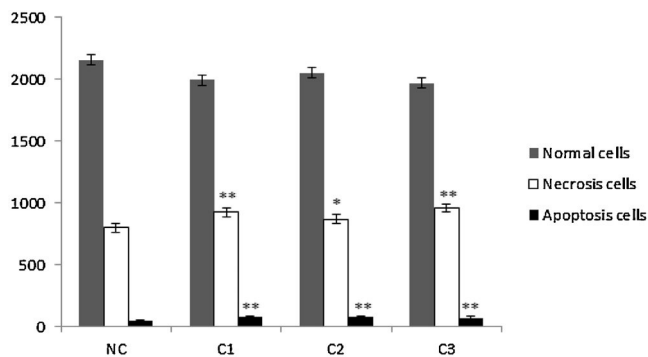


Fig. 2. Cell death induced by miltefosine (Impavido[®]) in human leukocytes from volunteers (n = 6) treated for 48 h *in vitro*.

χ^2 test * p < 0.05; ** p < 0.0001.

NC: negative control (culture medium RPMI 1640), C1: 0.25 μ g/mL, C2: 0.5 μ g/mL, C3: 1.0 μ g/mL.

(standard and FPG version) was performed by Student-T test. The micronucleus and the cell death assays were analyzed by Chi-square test (p < 0.05) [28].

3. Results

3.1. Cell viability

Viability tests were initially performed in cells treated with miltefosine at concentrations of 100, 50, 25, and 10 μ g/mL, which revealed cell viability lower than 70% (Fig. 1A). The final concentrations were established as 0.25, 0.5, and 1.0 μ g/mL, which revealed

no cytotoxicity after 3 h and 24 h of exposure, compared to the negative control. The viability values were 82.8%, 82.2%, 81.2% and 89.3%, respectively. Similarly, 24 h exposure to miltefosine resulted in 80.0%, 79.5%, 80.0%, and 85.8% viability, respectively (Fig. 1B).

3.2. Miltefosine (Impavido[®]) induces DNA damage *in vitro*

Table 1 shows the damage scores obtained from the comet assay. Significant differences in the damage scores were not observed at 3 h for any concentrations (0.25, 0.5, and 1.0 μ g/mL). However, when cells were exposed for 24 h, there was a significant increase in the damage scores at all concentrations tested (p < 0.01) compared to the negative control, providing evidence of miltefosine genotoxicity.

3.3. Miltefosine (Impavido[®]) induces cell death by necrosis and apoptosis

Significant increases in the frequencies of necrotic and apoptotic cells were observed for all miltefosine (Impavido[®]) concentrations (0.25, 0.5, and 1.0 μ g/mL) when compared to the negative control group (p < 0.05); Fig. 2. However, no differences were observed among the concentrations.

3.4. Miltefosine (Impavido[®]) induces DNA damage *in vivo*

Table 2 shows the DNA damage scores calculated from the standard comet assay data. Miltefosine was genotoxic to all groups (35, 70, and 140 mg/kg) (p < 0.01), but significant differences were not observed among the three doses. The miltefosine damage score was

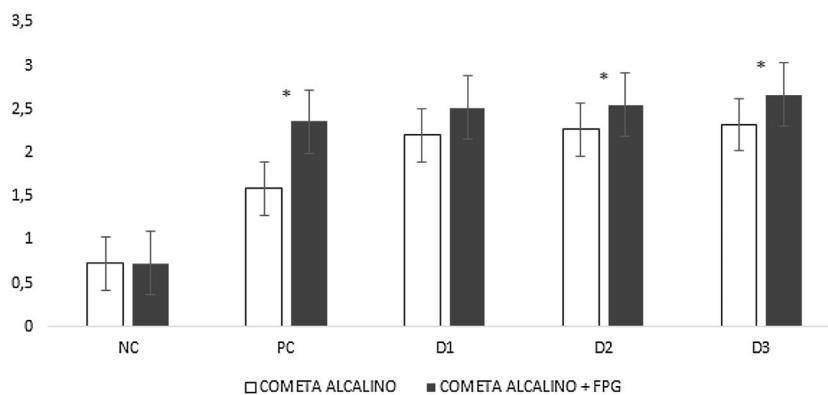


Fig. 3. DNA damage scores detected by conventional alkaline comet assay and the comet assay followed by Formamidopyrimidine-DNA glycosylase (FPG) digestion (n = 5 animals per group).

*t test p < 0.05

NC: negative control (water), PC: positive control (cyclophosphamide 50.0 mg/kg), D1: 35 mg/kg, D2: 70 mg/kg, D3: 140 mg/kg.

Table 3
Frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) in bone marrow of swiss mice (n=5 animals per group) treated intraperitoneally with miltefosine (Impavido®).

Grupos	PCE	PCEMNs	% MÉDIA ± DP	PCE/NCE
NC	10000	26	2.6 ± 0.04	1.03
PC	10000	202	20.2 ± 0.31*	0.65
D1	10000	94	9.4 ± 0.32*	1.14 ^{ns}
D2	10000	95	9.5 ± 0.40*	1.01 ^{ns}
D3	10000	91	9.1 ± 0.32*	0.86 ^{ns}

χ^2 test * p < 0.0001 compared to the negative control group.

NC: Negative control (water), PC: positive control (50.0 mg cyclophosphamide/kg) D1: 35 mg/kg, D2: 70 mg/kg, D3: 140 mg/kg; ns: no significant difference compared with NC.

also significantly higher than that for the positive control group (cyclophosphamide).

3.5. Miltefosine (Impavido®) induces DNA damage by oxidation of its bases

Based on the previous results, the comet assay with Fpg digestion was performed. The data showed an increase in DNA damage in the positive control and at the two higher doses of miltefosine (p < 0.05). On the other hand, there was no difference for the negative control (Fig. 3).

3.6. Miltefosine (Impavido®) induces micronuclei in vivo

The PCE/NCE ratio demonstrates that miltefosine (Impavido®) was not cytotoxic at any of the three doses (p > 0.05). The frequencies of micronuclei in the negative and positive controls were within the expected range. A significant increase (p < 0.05) in PCEMN is observed at the three miltefosine doses when compared to the negative control. Statistically-significant differences were not observed among the miltefosine doses (Table 3).

4. Discussion

Our data demonstrate that miltefosine (Impavido®) is genotoxic. The *in vitro* comet assay indicates that DNA damage did not occur during the 3 h treatment time at any concentrations (0.25, 0.5, and 1.0 μ g/mL). However, cells exposed to all miltefosine concentrations for 24 h had significant damage compared to the negative control. High frequencies of necrotic and apoptotic cells were observed after 48 h drug exposure. These findings corroborate the results of Jiménez-Lopez et al. [29], who observed cytostatic and apoptotic activity in HepG2 cells (human hepatoma) treated with miltefosine. These authors [30] suggested that programmed cell death processes may be related to specific changes in lipid metabolism. This hypothesis was confirmed when the authors observed that miltefosine alters cholesterol metabolism, which prevents its transport from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum. They concluded that miltefosine leads to apoptosis due an accumulation of compounds in membrane regions rich in cholesterol and sphingolipids.

The strong interaction of miltefosine with bilayers rich in cholesterol was also noted by Sá et al. [31]. The authors confirmed that cholesterol depletion in the endoplasmic reticulum inhibits cholesterol esterification and, hence, signaling cell death by apoptosis. These studies support the findings of Li et al. [32], who demonstrated that cholesterol-depleting agents induce apoptosis in cancer cells, which have lipid regions rich in cholesterol. Considering that miltefosine is a cholesterol-depleting agent, these data may suggest the possible efficacy of miltefosine as an antitumor agent.

We also noted a high frequency of necrotic cells. According to Elmore [33], this type of cell death is related to direct damage inflicted on the cell membranes when their integrity is broken. Furthermore, the necrosis is also related to the removal of cancer cells [34,35], which once again supports the action of miltefosine as an antitumor agent.

Our results also demonstrated increases of genomic instability in mice receiving miltefosine at all doses (35, 70 and 140 mg/kg), revealing a damage score higher than the positive control treated with cyclophosphamide (50 mg/kg), a known mutagen and carcinogen. In addition, the *in vivo* comet assay followed by formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG) digestion was performed to determine the mechanism by which this damage occurs. FPG is a repair endonuclease which recognizes oxidized purine bases, particularly 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG). FPG removes the products of guanine oxidation, causing more DNA fragmentation and an increased damage score compared to the standard comet assay [36]. At 70 and 140 mg/kg miltefosin, a significant increase in damage was seen with FPG treatment, indicating that the drug causes DNA oxidation. Our data suggest that cell death induced by miltefosine may result from DNA damage due to oxidation of purine bases.

Genomic lesions induced by the accumulation of 8-oxoG are usually repaired by base excision, which functions to maintain the integrity of the genome and reduce the rate of mutations [37]. However, if damage levels are high and DNA is not repaired, mutations may become permanent. DNA damage activates checkpoint regulators, such as p53, SMC1, FANCD2, BRCA1, that promote interruption of the cell cycle and apoptosis. Impairment of any of these regulators increases mutagenesis, which can lead to carcinogenesis [38]. In this study, we also noted a high frequency of micronucleated cells following miltefosine treatment. This suggests that the damage observed in the comet assay was not repaired and, therefore, the resulting mutations were fixed.

In summary, our findings demonstrate genotoxic and mutagenic effects of miltefosine. We also suggest that the mechanism of genotoxic action for miltefosine may be purine base oxidation. Other authors have reported that miltefosine leads to production of reactive oxygen species in yeast [39]. Our data indicate cell death by necrosis, which can be explained by the action of miltefosine on lipid membranes, as proposed by other authors. These results provide insight into the mechanisms of action of miltefosine and may assist the development of strategies to reduce its side effects and improve treatment efficacy.

The present study is the first to assess the genotoxic and mutagenic effects of miltefosine in animals treated with an acute dose. Pre-clinical studies are needed to evaluate the genotoxic effects of this drug under chronic-use conditions. Since miltefosine is already being used to treat leishmaniasis, monitoring its possible genotoxicity in patients is recommended.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico do Maranhão – FAPEMA for its financial support and, Prof. Dr. Carlos Costa, Universidade Federal do Piauí, Brazil, for providing the miltefosine for the assays.

References

- [1] S.L. Croft, J. Engel, Miltefosine-discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100 (suppl 1) (2006) S4–S8.
- [2] C. Wrenger, I. Schettert, E. Liebau, Oxidative stress in human infectious diseases—present and current knowledge about its druggability, in: *Drug Discovery*, 2013, pp. 227–250 (Chapter 8).

- [3] FDA. Food and Drug Administration. Briefing Document for the Anti-Infective Drugs Advisory Committee Meeting. Miltefosine (Impavido®) for the Treatment of Visceral, Mucosal and Cutaneous Leishmaniasis. (2013) NDA 204,684.
- [4] J. Soto, B.A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J.C. Vega, A. Diaz, et al., Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis, *Clin. Infect. Dis.* 38 (2004) 1266–1272.
- [5] P.R. Machado, J. Ampuero, L.H. Guimarães, L. Villasboas, A.T. Rocha, A. Schriefer, et al., Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) 1–6.
- [6] A. Chrusciak-Talhari, R. Dietze, C. Chrusciak-Talhari, R.M. da Silva, E.P. Gadelha Yamashita, G. de Oliveira Penna, et al., Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 84 (2011) 255–260.
- [7] B. Castro, P. Gameiro, J.L.F.C. Lima, C. Matos, S. Reis, Interaction of drugs with hexadecylphosphocholine micelles. Derivative spectroscopy, acid-base and solubility studies, *Mat. Sci. Eng. C* 18 (2001) 71–78.
- [8] F. Huang, F. Qu, Q. Peng, Y. Xia, L. Peng, Synthesis and characterization of photolabeling probes of miltefosine, *J. Fluorine Chem.* 126 (2005) 739–743.
- [9] C. Marco, J.M. Jimenez-Lopez, P. Rios-Marco, Hexadecylphosphocholine alters nonvesicular cholesterol traffic from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum and inhibits the synthesis of sphingomyelin in HepG2 cells, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41 (2009) 1296–1303.
- [10] M. Rakotomanga, P.M. Loiseau, M. Saint-Pierre-Chazalot, Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers, *Biochim. Biophys. Acta* 1661 (2004) 212–218.
- [11] R. Prasad, R. Kumar, P. Jaiswal, K. Singh, Miltefosine an oral drug for visceral leishmaniasis, *Indian J. Pediatr.* 71 (2004) 143–144.
- [12] A.V. Costa-Filho, I.C. Lucas, R.N.R. Sampaio, Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metilglucamineantimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41 (2008) 424–427.
- [13] B. More, H. Bhatt, V. Kukreja, S.S. Ainapure, Miltefosine great expectations against visceral leishmaniasis, *J. Postgrad. Med.* 49 (2003) 101–103.
- [14] V.K. Agrawal, Miltefosine First oral drug for treatment of visceral leishmaniasis, *MJAFI* 62 (2006) 66–67.
- [15] J.M. Perez-Victoria, F. Cortés-Selva, A. Parodi-Talice, B.I. Bavchvarov, F.J. Pérez-Victoria, F. Muñoz-Martínez, et al., Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp to miltefosine by inhibiting drug efflux, *Antimicrob. Agents Chemother.* 50 (2006) 3102–3110.
- [16] C. Demicheli, F. Frézard, M. Lecouvey, A. Garnier-Suillerot, Antimony (V) complex formation with adenine nucleoside in aqueous solution, *Biochem. Biophys. Acta* 1570 (2002) 192–193.
- [17] K.C. Kato, E. Morais-Teixeira, P.G. Reis, N.M. Silva-Barcellos, P. Salaün, P.P. Campos, et al., Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb (III) and protective effect of ascorbic acid, *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2014) 481–488.
- [18] M.I. Lima, V.O. Arruda, E.V. Alves, A.P. de Azevedo, S.G. Monteiro, S.R.F. Pereira, Genotoxic effects of the antileishmanial drug Glucantime®, *Arch. Toxicol.* 84 (2010) 227–232.
- [19] FDA. Food and Drug Administration. Full Prescribing Information. Chapter Carcinogenesis, Mutagenesis, Impairment of Fertility. (2014).
- [20] M.C. Elia, R.D. Storer, L.S. Harmon, A.R. Kraynak, T.W. Mckelvey, P.R. Hertzog, et al., Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay, *Mutat. Res.* 291 (1993) 193–205.
- [21] N.P. Singh, M.T. Mccoy, R.R. Tice, E.L. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [22] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlison, A. Hartmann, H. Kobayashi, Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206–221.
- [23] G. Speit, A. Hartmann, The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay), *Mutagenesis* 10 (1995) 555–559.
- [24] C. Dive, C.D. Gregory, D.J. Phipps, D.L. Evans, A.E. Milner, A.W. Wyllie, Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry, *Biochim. Biophys. Acta* 1133 (1992) 275–285.
- [25] M. Hashimoto, E. Rockenstein, L. Crews, E. Masliah, Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases, *Neuromolecular Med.* 4 (2003) 21–36.
- [26] G. Gajski, A.M. Domijan, V. Garaj-Vrhovac, Alterations of GSH and MDA levels and their association with bee venom-induced DNA damage in human peripheral blood leukocytes, *Environ. Mol. Mutagen.* 53 (2012) 469–477.
- [27] W. Schmid, The micronucleus test, *Mutat. Res.* 31 (1975) 9–15.
- [28] M. Ayres, M. Ayres Jr, D.L. Ayres, A.S. Santos, *Bioestat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas*. Sociedade Civil Mimirauá 2005, MCT-CNPq. Belém, Pará, Brazil.
- [29] J.M. Jiménez-López, M.P. Carrasco, J.L. Segovia, C. Marco, Hexadecylphosphocholine inhibits phosphatidylcholine biosynthesis and the proliferation of HepG2 cells, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 4649–4655.
- [30] J.M. Jiménez-López, P. Rios-Marco, C. Marco, J.L. Segovia, M.P. Carrasco, Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids, *Lipids Health Dis.* 9 (2010) 1–10.
- [31] M.M. Saí, V. Sresht, C.O. Rangel-Yagui, D. Blankschtein, Understanding miltefosine-membrane interactions using molecular dynamics simulations, *Langmuir* 31 (2015) 4503–4512.
- [32] Y.C. Li, M.J. Park, S.K. Ye, C.W. Kim, Y.N. Kim, Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents, *Am. J. Pathol.* 168 (2006) 1107–1118.
- [33] S. Elmore, Apoptosis a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516.
- [34] W.X. Zong, D. Ditsworth, D.E. Bauer, Z.Q. Wang, C.B. Thompson, Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death, *Genes Dev.* 18 (2004) 1272–1282.
- [35] P. Agostinis, E. Buytaert, H. Breyssens, N. Hendrickx, Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis, *Photochem. Photobiol.* 3 (2004) 721–729.
- [36] J. Cadet, J.L. Ravanat, M. TavernaPorro, H. Menoni, D. Angelov, Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions, *Cancer Lett.* 327 (2012) 5–15.
- [37] K.B.F. Barbosa, N.M.B. Costa, R.C.G. Alfenas, S.O. Paula, V.P.R. Minim, J. Bressan, Oxidative stress: concept, implications and modulating factors, *Rev. Nutr.* 23 (2010) 629–643.
- [38] E. D'Amico, P. Factor-Litvak, R.M. Santella, H. Mitsumoto, Clinical perspective on oxidative stress in sporadic amyotrophic lateral sclerosis, *Free Radic. Biol. Med.* 65 (2013) 509–527.
- [39] C. Biswas, X. Zuo, S.C.A. Chena, S.D. Schibecic, J.K. Forwood, K.A. Jolliffe, T.C. Sorrella, J.T. Djordjevic, Functional disruption of yeast metacaspase Mca1, leads to miltefosine resistance and inability to mediate miltefosine-induced apoptotic effects, *Fungal Genet. Biol.* 67 (2014) 71–81.

1 **ORIGINAL RESEARCH**

2 Hippocampal endoplasmic reticulum stress accelerates motor and cognitive
3 decline in adult rats sustainedly exposed to high-sucrose diet.

4

5 **AUTHORS**

6 Bruno Araújo Serra Pinto¹, Thamys Marinho Melo¹, Karla Frida Torres Flister¹,
7 Lucas Martins França¹, Vanessa Ribeiro Moreira², Daniela Kajihara³, Adriana
8 Leandro Camara¹, Silma Regina Ferreira Pereira², Francisco Rafael Martins
9 Laurindo³, Antonio Marcus de Andrade Paes^{1*}.

10

11 **AFFILIATIONS**

12 ¹Laboratory of Experimental Physiology, Department of Physiological Sciences,
13 Federal University of Maranhão, São Luís (MA), Brazil; ²Laboratory of Genetics
14 and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão,
15 São Luís (MA), Brazil; ³Laboratory of Vascular Biology, Heart Institute of the School
16 of Medicine, University of São Paulo, São Paulo (SP), Brazil.

17

18 ***Correspondence:** Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, Federal University
19 of Maranhão, Av. dos Portugueses 1966, Bacanga, 65080-805, São Luís (MA),
20 Brazil. Phone/Fax: +55 (98) 3272 8547; E-mail: marcuspaes@ufma.br

21

22

23 ABSTRACT

24 This study investigates the deleterious effects of early and prolonged exposure to
25 high-sucrose diet on motor and cognitive functions of adult rats and its relationship
26 with hippocampal endoplasmic reticulum (ER) stress. Weaned Wistar male rats fed
27 with high-sucrose diet until adulthood (HSD; 6-months-old) were compared to both
28 age-mated lean adult rats and middle-aged lean rats (OLD; 20-months-old).
29 Metabolic syndrome (MetS) development; serum redox profile; behavioral, motor
30 and cognitive functions; and hippocampal gene/protein expressions for ER stress
31 pro-adaptive and pro-apoptotic pathways, as well as senescence markers were
32 assessed. Prolonged exposure to HSD induced MetS with marked body weight
33 gain associated to central obesity, hypertriglyceridemia-based dyslipidemia, insulin
34 resistance and oxidative stress. HSD rats showed motor and cognitive decline
35 similar to OLD animals. Noteworthy, HSD rats presented marked hippocampal ER
36 stress characterized by failure of pro-adaptive signaling and increased expression
37 of Chop, Parp-1 and p21, markers of cell death and aging, whereas the anti-
38 apoptotic factor Bcl2 was reduced. This panorama was alike that found in OLD
39 rats. *In toto*, our data showed that early and sustained exposure to high-sucrose
40 diet induces MetS, which subsequently disrupt hippocampus homeostasis leading
41 to premature impairment of motor and cognitive functions in adult rats.

42

43 KEYWORDS

44 High-sucrose diet; Metabolic syndrome, Hippocampus, ER stress, Cognitive and
45 motor impairments.

46

47 INTRODUCTION

48 Metabolic syndrome (MetS) is a worldwide alarming public-health concern
49 related to excess energy intake associated to sedentary lifestyle, which lead to
50 metabolic dysfunctions highly associated with increased risk of cardiovascular
51 diseases, type 2 diabetes mellitus (T2DM), and all-cause mortality (1). Clinical
52 criteria for MetS demands the presence of at least three out of the following: insulin
53 resistance (IR), central adiposity, impaired glycemic profile, atherogenic
54 dyslipidemia, nonalcoholic steatohepatitis and hypertension (2). Nevertheless,
55 recent studies have increasingly shown an association of MetS dysfunctions,
56 especially T2DM and obesity, with impaired cognitive function and all-types
57 dementias, independently from advanced age (3).

58 Hippocampus is a key cerebral area classically responsible for cognitive
59 processing made by its two-third dorsal area, but whose role have been expanded
60 by studies showing that neurons projecting from hippocampal ventral region toward
61 amygdala and ventral striatum are involvement in motor and behavioral modulation
62 (4, 5). Moreover, hippocampus also acts as a neuroendocrine interconnector
63 between metabolic signals and cognitive functions, particularly in obesity models
64 based on dietary fructose (6). The importance of this relationship is further
65 supported by the description that mature neurons from dentate gyrus are able to
66 produce and secrete insulin (7). Currently, it is well established that metabolic
67 dysfunctions; such as progressive IR, lipolysis inhibition, impaired control of
68 hepatic glucose production and triglyceride secretion; are directly involved in
69 cellular aging (8), through mechanisms potentially shared by aging- and obesity-
70 triggered processes (9). Meanwhile the pathways involved in this shared
71 deteriorating signaling is still unclear, endoplasmic reticulum (ER) stress has
72 emerged as a potential underlying condition linking those pathways.

73 ER stress can be defined as an unbalance between misfolded proteins
74 overload in ER lumen and its limited capacity to handle such aberrant proteins
75 (10). To control ER stress, a complex network of adaptive signaling, known as
76 unfolded protein response (UPR), is activated in ER lumen to rescue ER

77 homeostasis and ensure cell survival (11). However, under persistent unresolved
78 ER stress, UPR migrates from an adaptive to a pro-apoptotic pattern that ultimately
79 leads to early cell death (12). Recently, ER stress has emerged as a key agent to
80 IR onset, by acting as a negative modulator of insulin signaling (13, 14). Aging, in a
81 similar way, takes to progressive declines in expression/activity of ER chaperoning
82 system and subsequently, compromise proper protein folding and UPR-adaptive
83 responses (15). Several neurodegenerative age-related diseases have been
84 associated with this aberrant protein accumulation, particularly Alzheimer and
85 Parkinson's diseases (16).

86 In a previous report, we showed that MetS induced by early exposure to
87 high-sucrose diet triggers ER stress pathways leading to activation of hippocampal
88 pro-apoptotic signaling and mild motor and behavioral impairments but with no
89 cognitive deficit in young rats (3-months-old) (17). Thus, in the present study we
90 supportively show that sustained exposure to the same diet until 6-months-old
91 deepened ER stress-driven hippocampal damage and accelerated cognitive
92 decline in a fashion very similar to 20-months-old lean rats, which emphasize the
93 dysfunctional outcomes of early MetS onset on neuromotor and cognitive health of
94 young-to-adult subjects.

95

96 **RESULTS**

97 **Early and sustained exposure to high-sucrose diet induces metabolic** 98 **syndrome phenotype in adult rats**

99 Early and sustained feeding of weaned rats with high-sucrose diet induced
100 MetS-related disorders assessed at adulthood (6 months-old) mainly characterized
101 by increased body weight associated to higher Lee Index, which infers obesity
102 development, besides reduced caloric intake in HSD rats, as compared to CTR
103 (Figure 1A-C). Additionally, HSD rats showed increased visceral and non-visceral
104 fat pads accumulation (Figure 1D-F), as well as heavier livers (Figure 1G)
105 containing expressively more ectopic fat (Figure 1H) than CTR ones. On the other
106 hand, posterior skeletal muscles were atrophied in HSD (Figure 1I).

107 In accordance to the obese phenotype, HSD rats presented higher blood
108 glucose levels in both fasting and fed states (Figure 2A and D, respectively), which
109 was consistent with their impaired glucose tolerance, as assessed in the *ip*GTT
110 test (Figure 2B and C). Curiously, insulin-induced glucose disappearance rate
111 (*k*ITT) did not differ between groups (Figure 2E and F), whereas HSD rats were
112 hyperinsulinemic in comparison to CTR (Figure 2G). Notwithstanding, calculation
113 of HOMA Indexes suggested an increased secretory capacity of pancreatic β -cells
114 (Figure 2H) and lower peripheral insulin sensitivity (Figure 2I) induced by sustained
115 HSD feeding.

116 To further characterize the metabolic changes caused by early and
117 sustained consumption of sucrose, animals' lipid profile was assessed. Serum
118 triglycerides and free fatty acid levels were augmented by nearly 241.7% and
119 109.9%, respectively, in HSD group (Figures 2J and K), while no differences were
120 detected for total cholesterol and its fractions (data not shown). Finally, as an
121 attempt to associate triglyceride production with hepatic insulin sensitivity,
122 calculation of TyG Index showed HSD group to present higher values (Figure 2L),
123 which was consistent with hepatic IR. In a whole, this set of data supports that
124 early and sustained exposure to high-sucrose diet induces MetS, mainly
125 characterized by central obesity, disturbance of glucose-insulin axis, and peripheral
126 as well as hepatic IR.

127 **Metabolic syndrome induced by high-sucrose consumption promotes serum** 128 **redox unbalance and oxidative damage**

129 Assessment of serum redox profile showed HSD group had increased
130 SOD and CAT activities by approximately 15% and 28%, respectively (Figures 3A
131 and B), whereas GPx activity was reduced in nearly 62% (Figure 3C). Accordingly,
132 HSD rats presented higher lipid peroxidation, as demonstrated by a 20% increase
133 of MDA levels in comparison to CTR (Figure 3D).

134

135 **Metabolic syndrome induced by high-sucrose consumption impairs motor,** 136 **behavioral and cognitive functions**

137 In order to verify central repercussions of MetS phenotype induced by early
138 and sustained exposure to high-sucrose consumption, both CTR and HSD rats
139 were subjected to neurofunctional tests and additionally compared with the
140 performances of the OLD group. In rotarod test, time spent on rod was decreased
141 in 48.9% and 99.1% in HSD and OLD groups, respectively (Figure 4A), depicting
142 substantial motor deficit. Meanwhile, animals' performance in the open field test
143 revealed increased anxiogenic behavior in HSD group, characterized by a 62%
144 higher ambulation, an outcome not observed in OLD rats when both groups were
145 compared to CTR (Figure 4D). Nevertheless, other anxiety-related stereotyped
146 behaviors were not observed in any group.

147 Cognitive capacity, represented by spatial learning and memory retention,
148 was assessed through the water maze test. HSD rats spent more time to find the
149 hidden platform throughout the 3-days trial period, as compared to CTR (Figure
150 4B). Noteworthy, OLD rats did not show the same adaptive behavior observed in
151 the others, since the time spent to find the platform did not decay in the 2nd and 3rd
152 days. At 4th day, memory assessment displayed both HSD and OLD rats had
153 significant impairment of memory consolidation, since these animals spent,
154 respectively, 38% and 25% less time in the correct quadrant in relation to CTR
155 (Figure 4C).

156 **Failure of pro-adaptive and activation of pro-apoptotic pathways anticipates** 157 **hippocampal senescence in cognitively deficient HSD rats**

158 Hippocampus role is not restricted to cognitive functions but rather
159 influence other brain areas responsible for metabolic, motor, and behavioral control
160 (18). Thus, we next investigated whether the disruption of hippocampus
161 homeostasis underlies the cognitive impairment observed in HSD, as well as OLD
162 rats. Assessment of several markers involved in pro-adaptive UPR signaling
163 showed reduced gene expression of UPR sensors (Ire1 α , Perk and Atf6) in both
164 HSD and OLD groups to levels lesser than half that found in CTR (Figures 5A-C).
165 Gene expression of ER chaperones (Grp78, Pdi A2, Calnexin and Calreticulin) was
166 similarly reduced in HSD, while only Pdi A2 and Calnexin were decreased in OLD

167 rats (Figures 5D-G), a finding further supported by decreased protein expression of
168 chaperones Grp94 and Grp78 in the same groups (Supplementary Figure 1). Bdnf,
169 a factor related to neural plasticity, was significantly less expressed in HSD and
170 OLD rats (Figure 5H), meanwhile expression of Nrf2, a nuclear factor related to
171 antioxidant defense, was unchanged in HSD but increased in OLD rats (Figure 5I).

172 Regarding the triggering of UPR pro-apoptotic pathways, hippocampal
173 gene expression of Bcl2, an important anti-apoptotic factor, was reduced in HSD
174 and OLD groups (Figure 6A); an effect oppositely corroborated by increased gene
175 (Figure 6B) and protein (Supplementary Figure 2) expressions of Chop, an
176 apoptotic factor, in HSD, but not in OLD rats. Surprisingly, Caspase 3 gene
177 expression was strongly decreased in the same groups (Figure 6C). Assessment
178 of p53 and p21 gene expression, two genes intimately related to cell senescence,
179 showed they were, as expected, augmented in the OLD group (Figures 6D and E).
180 It is noteworthy that p21 gene expression was also increased in HSD, suggesting
181 an accelerated neuronal aging. Notwithstanding, Parp-1 protein expression
182 revealed a 40-kDa band, which is compatible with its cleavage by calpain, an
183 important marker of cell necrosis (19).

184

185 **DISCUSSION**

186 The exponential rise of worldwide sucrose consumption during the last
187 decades has been directly correlated to the epidemic growth of MetS and its
188 associated dysfunctions, affecting individual quality of life and health insurance
189 systems (20, 21). Besides its peripheral metabolic damages, MetS has also been
190 classified as an age-related illness with important impact on cognitive decline in
191 both humans and rodents (6). Nevertheless, we have recently shown that rats fed
192 a high-sucrose diet since weaning already presented MetS along with motor and
193 behavioral impairments at young age (3-months-old), which were ascribed to
194 hippocampal ER stress (17). Thus, in this study, we expanded those findings by
195 showing that rats' exposure to the same diet until adulthood (6-months-old) not
196 only aggravates metabolic dysfunctions and serum oxidative profile, but worsens
197 hippocampus-driven neuronal functions, especially cognition, as consequence of

198 the precocious failure of UPR pro-adaptive responses, as well as increased
199 expression of neuronal aging and cell death markers.

200 Exposure of HSD rats to high-sucrose diet until 6-months-old deepened
201 the obesogenic phenotype as compared to previously described young HSD
202 animals (17). Particularly, HSD body weight gain was mainly associated with
203 strong central obesity and IR, which concurred with hypertriglyceridemia-based
204 dyslipidemia, glucose intolerance, hyperinsulinemia, and ectopic accumulation of
205 fat in the liver, features not found in CTR rats. Those alterations might be primarily
206 attributed to the high consumption of sucrose, since glucose elicits insulin release
207 toward its own uptake by insulin-sensitive tissues, whereas fructose is promptly
208 uptaken via hepatic GLUT-2 and partially converted into fatty acids through *de*
209 *novo* lipogenesis that favors triglycerides synthesis and VLDL secretion (22).
210 Noteworthy, fructose-induced *de novo* lipogenesis and its metabolic outcomes
211 have be shown to be exacerbated upon co-ingestion with glucose than fructose
212 alone (23).

213 In addition to MetS development, our adult HSD rats showed motor and
214 cognitive impairment compatible with the middle-aged (20-months-old) OLD rats.
215 Motor deficit in rotarod test is generally associated with increased body mass,
216 skeletal muscle atrophy – both of them found in adult HSD rats – as well as motor
217 neuron degeneration (24). Nevertheless, since young HSD rats displayed deficient
218 performance on rod, without increased body mass or muscle atrophy (17), we
219 speculate that degeneration of motor-controlling brain areas would be the primary
220 cause. This assumption is corroborated by findings that mice fed a high-fat diet for
221 10 months poorly performed on rotarod in a way not correlated with adipose mass
222 increase (25). Fructose-induced obesity has also been related to long-term spatial
223 memory impairment subsequent to hippocampal IR (26-28) which results from
224 elevated triglycerides levels that penetrate the blood-brain barrier and interfere with
225 insulin signaling (27). Other MetS risk factors, such as hyperglycemia,
226 hyperinsulinemia, and peripheral IR might contribute for hippocampal IR
227 development as well (29, 30). Accordingly, high sucrose intake did not impair
228 cognitive functions on young HSD rats (17), which were later characterized as yet

229 non-insulin resistant (unpublished data), but did in the adult HSD rats herein
230 described. Besides IR, serum oxidative stress has also been enrolled as a potential
231 trigger of cognitive decline secondary to hippocampal homeostasis disruption (31).

232 ER stress pathways have emerged as a common mechanism underlying
233 neuronal damage induced by oxidative stress, IR and/or aging (15, 32). Our adult
234 HSD rats presented remarkable hippocampal ER stress mainly characterized by
235 failure of pro-adaptive signaling, as depicted from very low gene expression of
236 UPR-sensors, chaperones and Bdnf. On the other hand, gene expression of Chop
237 and p21, both of them markers of cell death and aging, were increased, whereas
238 the anti-apoptotic factor Bcl2 was reduced. OLD rats presented a very similar
239 profile, excepting that Chop expression was not increased. Unexpectedly, caspase
240 3 expression was heavily decreased in both HSD and OLD groups. Hippocampus
241 of 6-months-old diabetic *db/db* mice has been shown to have decreased
242 gene/protein expression of pro-adaptive sensors Grp78, Grp94 and Xbp1, as well
243 as lower Xbp1 spliced/unspliced ratio (33); similarly to the profile found in cortical
244 brain samples from 24-months-old non-obese/non-diabetic C57bl/6 mice, which
245 displayed reduction of eIF2 α phosphorylation and Grp78 expression along with
246 increased expression of Chop and Caspase 12 (34). Alike, progressive failure of
247 neuronal UPR pro-adaptive pathways has been also noticed in middle-aged (35)
248 and aged Wistar rats (36), rendering this as a hallmark of idiopathic neuronal
249 aging.

250 The scenario in our adult HSD rats demonstrates a worsen and irreversible
251 hippocampal damage, since they further presented high expression of a 40 kDa
252 fragment of Parp-1, a finding consistent with its cleavage by calpain (19), which
253 may lead to inhibition of Parp-1 role on genome integrity maintenance, as well as
254 generalized proteolysis followed by necrosis and/or apoptosis in a caspase-
255 independent way (37). Increase Parp-1 cleavage by calpain has also been found in
256 brain ischemia and neurodegenerative diseases such as Alzheimer, Parkinson and
257 Huntington's disease (37-39). All cognitive impairments found in both HSD and
258 OLD groups seem to be intrinsically linked to the reduced expression of Bdnf, a
259 capital factor for neurogenesis, cellular differentiation, and hippocampal plasticity

260 that promotes Ire1 α phosphorylation and Xbp1 splicing toward UPR-pro-adaptive
261 responses (40-42). Notwithstanding, augmented gene expression of p21, despite
262 unchanged p53, in adult HSD rats supports acceleration of hippocampal
263 senescence and telomere shortening by sustained exposition to high-sucrose diet
264 and agrees with demonstration of premature aging in obese *Agouti* mice (43).

265 Collectively, data herein shown reinforce the harmful consequences of
266 early and sustained introduction of refined sugars to daily diets. To the best of our
267 knowledge, this work originally shows that MetS induced by high sucrose intake
268 accelerates hippocampal aging and establishes a series of biochemical and
269 functional impairments subsequent to the disruption of ER homeostasis.
270 Furthermore, it corroborates the hypothesis that obesity and correlated metabolic
271 disturbances hastens cellular aging by subsequently promote ROS over
272 generation, antioxidant defense insufficiency, and ultimately DNA damage and
273 aging (9), to which we add UPR ineptitude as an underlying mechanism. Finally, in
274 spite of the fact that this study has successfully established a direct relationship
275 between cognitive losses and MetS-driven hippocampal ER stress, it still remains
276 unknown whether diet exchange for a low-sugar one would mitigate/revert this
277 morbid condition.

278 **MATERIALS AND METHODS**

279 **Animals and Experimental Design**

280 Weaned male Wistar rats provided by the animal facility house of the
281 Federal University of Maranhão [postnatal day (pnd) 21; 51.07 \pm 0.57 g] were
282 randomized into two groups: control rats (CTR; $n = 7$), fed a standard chow
283 (Nuvital[®], Nuvilab, Brazil) composed by 55.4% total carbohydrate (10% sucrose),
284 21% proteins, 5.2% total lipids, totaling 1473.5 kJ·100 g⁻¹; or high-sucrose diet rats
285 (HSD, $n = 7$), fed a high-sucrose but isocaloric chow composed by 65% total
286 carbohydrates (25% sucrose), 12.3% proteins, 4.3% total lipids, totaling 1456.7
287 kJ·100 g⁻¹, as previously described (17). Both groups were followed for 24 weeks
288 until 6-months-old. To provide an aging control, an additional group of 20-months-
289 old non-obese rats (OLD, $n = 7$) was introduced 30 days before the end of the

290 experimental period. Animals were maintained in a controlled room (21 ± 2 °C;
291 60% humidity and 12h light/dark cycle) with water and chow *ad libitum*.

292 Throughout dietary interventional period, body weight and energy intake
293 were assessed twice a week. Lee index (body weight (g)^{1/3}·naso-anal length (cm)⁻¹·
294 1000) was calculated every month for assessment of obesity development (44).
295 Behavioral and cognitive tests were performed during the last week before
296 euthanasia. Paralleling, animals were also subjected to intraperitoneal glucose and
297 insulin tolerance tests. At pnd 180, overnight fasted animals were anesthetized
298 (40:10 mg/kg ketamine:xylazine solution) for blood and tissue collection upon
299 laparotomy, as well as craniotomized for hippocampus dissection. Retroperitoneal,
300 periepididymal and mesenteric white adipose tissue fat pads, liver and posterior
301 skeletal muscles (gastrocnemius and soleus) were weighed for morphometric
302 assessment and expressed as tissue mass (g) per 100 g body weight. Liver
303 samples were also used for fat liver content measurement. Serum samples were
304 used for the assessment of biochemical, hormonal and redox profiles, whereas
305 hippocampi homogenates were used for gene/protein expression protocols. All
306 procedures were performed in accordance with the rules of Brazilian Council for
307 the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and approved by the Ethical
308 Committee on Animal Use and Welfare of the Federal University of Maranhão,
309 under ruling number 23115.009595/2014-81.

310 **Assessment of behavioral, cognitive and motor functions**

311 In order to assess exploratory and anxiety-like behavior, animals were
312 individually placed at the center of a lit Plexiglas circular arena (140 cm²), divided
313 in 9 quadrants, for 5 min. The total number of quadrant crossings, frequency of
314 entrances in the central quadrant and stereotyped behaviors were recorded for
315 subsequent analysis (45). Rotarod equipment was used to assess the neuromotor
316 activity. Briefly, animals were accommodated on rod and trained 3 times a day for
317 4 consecutive days. At day 5, animals were fasted for 2h before experimental
318 performance, when the rod was set at 12 rpm and the latency to fall was recorded
319 in seconds for a maximum of 5 min (46).

320 To assess spatial learning/memory functions, animals were subjected to
321 water maze test (47). The apparatus consisted of a circular fiberglass pool filled
322 with water and divided into four quadrants with presence of visible clues to the rats
323 in the walls. A hidden escape platform was submerged so that it reached 1.5 cm
324 below the water surface in the pre-set quadrant. Animals were trained for 3
325 consecutive days, when they were individually released into the water from one of
326 the four quadrants, facing maze wall, and allowed to swim for 60 s to find the
327 hidden platform. Rats that failed to locate the platform were gently guided to the
328 platform and allowed to stay on it for 30 s. Each rat received 4 trials per day for 3
329 consecutive days. Latency to find the hidden platform was recorded for spatial
330 learning assessment. At day 4, the platform was removed and the animals
331 released in the center of the pool to swim for 120 s. The time spent in the quadrant
332 where platform was expected to be was recorded for memory retention
333 assessment.

334 **Assessment of serum biochemical and redox profiles**

335 Serum samples were used for colorimetric measurement of triglycerides,
336 total cholesterol and fractions (Labtest, Brazil) and free fatty acids (Sigma-Aldrich,
337 USA) levels according to manufacturer's instructions. Insulin levels were assessed
338 by radioimmunoassay using ¹²⁵I-labeled human insulin as tracer, rat insulin as
339 standard and rat insulin antibody, as elsewhere described (48). Redox profile was
340 assessed by measuring serum malondialdehydes levels (MDA) (49), as well as
341 antioxidant enzymes activities, namely superoxide dismutase (SOD), catalase
342 (CAT) and glutathione peroxidase (GPx), according to manufacturer's instructions
343 (Cayman Chemical, USA).

344 **Assessment of glucose-insulin axis function**

345 For intraperitoneal glucose tolerance test (*ip*GTT), animals were submitted
346 to 8h fasting prior to administration of glucose 2 g/kg. Tail vein blood drops were
347 collected immediately before (time 0) and 15, 30, 60 and 120 min after glucose
348 bolus for glucose measurement through glucometer (Accucheck Active[®], Roche
349 Diagnostic, Germany). Data were expressed as area under glycemic curve (AUC).

350 Similar procedure was carried out for intraperitoneal insulin tolerance test (*ip*ITT),
351 excepting animals were fed and received 1 UI/kg insulin (Humulin 70/30[®], Lilly,
352 USA). Glucose disappearance rate (kITT) was derived from ITT curve and
353 calculated as $0.693/t_{1/2}$ (50). Peripheral insulin sensitivity was inferred by
354 calculation of homeostasis model assessment (HOMA) Index (HOMA-IR = fasting
355 glucose (mM)·fasting insulinemia (μ U/ml)·22.5⁻¹) and HOMA Index of β -cell
356 function (HOMA-B = (fasting insulin (μ U/ml)·20)·(fasting glucose (mM) – 3.5)⁻¹) (51).
357 Hepatic IR was inferred from TyG index calculation [\ln ·(fasting glucose
358 (mg/dL)·fasting triglyceride (mg/dL))·2⁻¹] (52).

359 **Assessment of liver fat content**

360 Liver fat accumulation was assessed from 500 mg liver samples, as
361 previously described (53). Briefly, samples were homogenized with
362 chloroform/methanol solution (2:1) and resulting supernatant was paper-filtered
363 and diluted in 0.9% NaCl (5:1). The organic phase was collected, air-flow oven-
364 dried at 40 °C and for the measurement of the total fat content (mg) per tissue
365 mass (g). The total fat was resuspended in Triton X/methanol (2:1) for colorimetric
366 measurement of triglycerides and total cholesterol. Results were expressed as
367 triglycerides (mg) per tissue mass (g) and total cholesterol (mg) per tissue mass
368 (g).

369 **Gene expression by real time PCR (qPCR)**

370 Hippocampi samples ($n = 5$) were used for RNA extraction using Trizol[®]
371 (Invitrogen, Germany) as manufacturer's instructions. RNA samples (3 μ g) were
372 converted into cDNA using Super Script II Reverse Transcriptase[®] (Invitrogen,
373 Germany). The qPCR amplification and Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-
374 UDG (Invitrogen, Germany) detection were performed using the 7500 Realtime
375 PCR Applied Biosystems[®], USA. Reactions were incubated at 50 °C for 2 min and
376 95°C for 2 min followed by 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. To melt
377 curve stage, reactions were incubated at 95 °C for 15s, 60 °C for 60 min and 95 °C
378 for 15 s. Primers were designed using Primer Express[®] software (Applied
379 Biosystem, USA) and manufactured by Invitrogen, Brazil (Supplementary Table 1).

380 All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results were
381 expressed as the fold change (FC) values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time
382 amplification.

383 **Protein expression by immunoblotting**

384 Hippocampi samples ($n = 5$) were homogenized in lysis buffer containing
385 protease inhibitors (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin, and 10 mM PMSF). After
386 protein quantification by Bradford reagent method, aliquots (30 μg) were diluted in
387 sample buffer, subjected to 12% SDS–PAGE, and transferred to nitrocellulose
388 membranes. Detection of specific proteins was performed by incubating
389 membranes with primary antibodies [anti-Kdel (1:1000; Enzo Life Sciences, USA),
390 anti-Pdi (1:1000; Thermo Fisher Scientific, USA), anti-Chop (1:1000; Thermo
391 Fisher Scientific, USA) and anti-Parp-1 (1:2500; Calbiochem, USA)], followed by
392 peroxidase-conjugated secondary antibodies and revealed by chemiluminescence
393 method (peroxidase- H_2O_2 -luminol). Results were expressed as a relative density.
394 Equal amount of protein in each lane was confirmed by hybridization with an anti- β -
395 Actin (1:1000; Sigma Aldrich, USA).

396 **Statistical analysis**

397 Statistical analysis was conducted using GraphPad Prism 7.0 software
398 (GraphPad Software Inc., USA). Data were expressed as mean \pm SEM and
399 submitted to normality test (Kolmogorov-Smirnov) followed by parametrical
400 analysis through unpaired t test (one-tailed) or one-way ANOVA (post test
401 Newman-Keuls) for a significance level of 5% ($p < 0.05$).

402 **REFERENCES**

- 403 1. Alberti KGM, Zimmet P, Shaw J. The metabolic syndrome-a new worldwide
404 definition. *The Lancet*. 2005;366(9491):1059.
- 405 2. Alberti KG, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al.
406 Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the
407 International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention;
408 National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World
409 Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International
410 Association for the Study of Obesity. *Circulation*. 2009;120(16):1640-5.
- 411 3. Panza F, Frisardi V, Capurso C, Imbimbo BP, Vendemiale G, Santamato A, et
412 al. Metabolic syndrome and cognitive impairment: current epidemiology and
413 possible underlying mechanisms. *Journal of Alzheimer's disease*.
414 2010;21(3):691-724.
- 415 4. Moser MB, Moser EI. Functional differentiation in the hippocampus.
416 *Hippocampus*. 1998;8(6):608-19.
- 417 5. Strange BA, Witter MP, Lein ES, Moser EI. Functional organization of the
418 hippocampal longitudinal axis. *Nature Reviews Neuroscience*.
419 2014;15(10):655-69.
- 420 6. Lakhan SE, Kirchgessner A. The emerging role of dietary fructose in obesity
421 and cognitive decline. *Nutrition journal*. 2013;12(1):114.
- 422 7. Kuwabara T, Kagalwala MN, Onuma Y, Ito Y, Warashina M, Terashima K, et
423 al. Insulin biosynthesis in neuronal progenitors derived from adult hippocampus
424 and the olfactory bulb. *EMBO Mol Med*. 2011;3(12):742-54.
- 425 8. Picard F, Guarente L. Molecular links between aging and adipose tissue.
426 *International Journal of Obesity*. 2005;29:S36-S9.
- 427 9. Ahima RS. Connecting obesity, aging and diabetes. *Nature medicine*.
428 2009;15(9):996-7.
- 429 10. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER
430 stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2012;13(2):89-102.

- 431 11. Malhotra JD, Kaufman RJ, editors. The endoplasmic reticulum and the
432 unfolded protein response. *Seminars in cell & developmental biology*; 2007:
433 Elsevier.
- 434 12. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human
435 disease. *J Cell Biol.* 2012;197(7):857-67.
- 436 13. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foufelle F. New insights into ER stress-
437 induced insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism.*
438 2012;23(8):381-90.
- 439 14. Salvadó L, Palomer X, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Targeting endoplasmic
440 reticulum stress in insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism.*
441 2015;26(8):438-48.
- 442 15. Brown MK, Naidoo N. The endoplasmic reticulum stress response in aging and
443 age-related diseases. *Frontiers in physiology.* 2012;3.
- 444 16. Hetz, Mollereau B. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in
445 neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2014;15(4):233-49.
- 446 17. Pinto BAS, Melo TM, Flister KFT, França LM, Kajihara D, Tanaka LY, et al.
447 Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER
448 stress in young rats. *Metabolic brain disease.* 2016:1-11.
- 449 18. Cenquizca LA, Swanson LW. Spatial organization of direct hippocampal field
450 CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. *Brain research*
451 *reviews.* 2007;56(1):1-26.
- 452 19. McGinnis KM, Gnegy ME, Park YH, Mukerjee N, Wang KK. Procaspase-3 and
453 poly (ADP) ribose polymerase (PARP) are calpain substrates. *Biochemical and*
454 *biophysical research communications.* 1999;263(1):94-9.
- 455 20. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in
456 beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am J Clin Nutr.*
457 2004;79(4):537-43.
- 458 21. Bray GA. Fructose: pure, white, and deadly? Fructose, by any other name, is a
459 health hazard. *J Diabetes Sci Technol.* 2010;4(4):1003-7.
- 460 22. Tappy L, Le KA, Tran C, Paquot N. Fructose and metabolic diseases: new
461 findings, new questions. *Nutrition.* 2010;26(11-12):1044-9.

- 462 23. Kolderup A, Svihus B. Fructose metabolism and relation to atherosclerosis,
463 type 2 diabetes, and obesity. *Journal of nutrition and metabolism*. 2015;2015.
- 464 24. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's
465 guide. *Nature Reviews Neuroscience*. 2009;10(7):519-29.
- 466 25. Zhang Y, Fischer KE, Soto V, Liu Y, Sosnowska D, Richardson A, et al.
467 Obesity-induced oxidative stress, accelerated functional decline with age and
468 increased mortality in mice. *Arch Biochem Biophys*. 2015;576:39-48.
- 469 26. Stranahan AM, Norman ED, Lee K, Cutler RG, Telljohann RS, Egan JM, et al.
470 Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and
471 cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*. 2008;18(11):1085-8.
- 472 27. Agrawal R, Gomez-Pinilla F. 'Metabolic syndrome' in the brain: deficiency in
473 omega-3 fatty acid exacerbates dysfunctions in insulin receptor signalling and
474 cognition. *The Journal of physiology*. 2012;590(10):2485-99.
- 475 28. Jurdak N, Lichtenstein AH, Kanarek RB. Diet-induced obesity and spatial
476 cognition in young male rats. *Nutritional neuroscience*. 2008;11(2):48-54.
- 477 29. Greenwood CE, Winocur G. Learning and memory impairment in rats fed a
478 high saturated fat diet. *Behavioral and neural biology*. 1990;53(1):74-87.
- 479 30. Greenwood CE, Winocur G. Cognitive impairment in rats fed high-fat diets: a
480 specific effect of saturated fatty-acid intake. *Behavioral neuroscience*.
481 1996;110(3):451.
- 482 31. Huang T-T, Leu D, Zou Y. Oxidative stress and redox regulation on
483 hippocampal-dependent cognitive functions. *Archives of biochemistry and
484 biophysics*. 2015;576:2-7.
- 485 32. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*.
486 2006;444(7121):860-7.
- 487 33. Sims-Robinson C, Zhao S, Hur J, Feldman E. Central nervous system
488 endoplasmic reticulum stress in a murine model of type 2 diabetes.
489 *Diabetologia*. 2012;55(8):2276-84.
- 490 34. Naidoo N, Ferber M, Master M, Zhu Y, Pack AI. Aging impairs the unfolded
491 protein response to sleep deprivation and leads to proapoptotic signaling. *The
492 Journal of Neuroscience*. 2008;28(26):6539-48.

- 493 35. Hussain SG, Ramaiah KV. Reduced eIF2 α phosphorylation and increased
494 proapoptotic proteins in aging. *Biochemical and biophysical research*
495 *communications*. 2007;355(2):365-70.
- 496 36. Gavilan MP, Vela J, Castaño A, Ramos B, Juan C, Vitorica J, et al. Cellular
497 environment facilitates protein accumulation in aged rat hippocampus.
498 *Neurobiology of aging*. 2006;27(7):973-82.
- 499 37. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments:
500 signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication*
501 *and Signaling*. 2010;8(1):31.
- 502 38. Yamashima T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and
503 caspase in ischemic neuronal death of primates. *Progress in neurobiology*.
504 2000;62(3):273-95.
- 505 39. Phulwani NK, Kielian T. Poly (ADP-ribose) polymerases (PARPs) 1-3 regulate
506 astrocyte activation. *Journal of neurochemistry*. 2008;106(2):578-90.
- 507 40. Hayashi A, Kasahara T, Iwamoto K, Ishiwata M, Kametani M, Kakiuchi C, et al.
508 The role of brain-derived neurotrophic factor (BDNF)-induced XBP1 splicing
509 during brain development. *Journal of Biological Chemistry*.
510 2007;282(47):34525-34.
- 511 41. Hayashi A, Kasahara T, Kametani M, Kato T. Attenuated BDNF-induced
512 upregulation of GABAergic markers in neurons lacking Xbp1. *Biochemical and*
513 *biophysical research communications*. 2008;376(4):758-63.
- 514 42. Martínez G, Vidal RL, Mardones P, Serrano FG, Ardiles AO, Wirth C, et al.
515 Regulation of memory formation by the transcription factor XBP1. *Cell reports*.
516 2016;14(6):1382-94.
- 517 43. Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, et al. A
518 crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature*
519 *medicine*. 2009;15(9):1082-7.
- 520 44. Bernardis L, Patterson B. Correlation between 'Lee index' and carcass fat
521 content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *Journal of*
522 *Endocrinology*. 1968;40(4):527-8.

- 523 45. Hall C, Ballachey EL. A study of the rat's behavior in a field. A contribution to
524 method in comparative psychology. University of California Publications in
525 Psychology. 1932.
- 526 46. Srodulski S, Sharma S, Bachstetter AB, Brelsfoard JM, Pascual C, Xie XS, et
527 al. Neuroinflammation and neurologic deficits in diabetes linked to brain
528 accumulation of amylin. *Molecular neurodegeneration*. 2014;9(1):30.
- 529 47. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial
530 learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60.
- 531 48. Sanches JR, França LM, Chagas VT, Gaspar RS, dos Santos KA, Gonçalves
532 LM, et al. Polyphenol-rich extract of *Syzygium cumini* leaf dually improves
533 peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium L-
534 glutamate-induced obese rats. *Frontiers in pharmacology*. 2016;7.
- 535 49. Marcelino T, Longoni A, Kudo K, Stone V, Rech A, De Assis A, et al.
536 Evidences that maternal swimming exercise improves antioxidant defenses
537 and induces mitochondrial biogenesis in the brain of young Wistar rats.
538 *Neuroscience*. 2013;246:28-39.
- 539 50. Rafacho A, Roma L, Taboga S, Boschero A, Bosqueiro J. Dexamethasone-
540 induced insulin resistance is associated with increased connexin 36 mRNA and
541 protein expression in pancreatic rat islets. *Canadian journal of physiology and
542 pharmacology*. 2007;85(5):536-45.
- 543 51. Matthews D, Hosker J, Rudenski A, Naylor B, Treacher D, Turner R.
544 Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from
545 fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*.
546 1985;28(7):412-9.
- 547 52. Guerrero-Romero F, Simental-Mendía LE, González-Ortiz M, Martínez-
548 Abundis E, Ramos-Zavala MG, Hernández-González SO, et al. The product of
549 triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison
550 with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *The Journal of Clinical
551 Endocrinology & Metabolism*. 2010;95(7):3347-51.
- 552 53. França LM, Freitas LNC, Chagas VT, Coêlho CFF, Barroso WA, Costa GC, et
553 al. Mechanisms underlying hypertriglyceridemia in rats with monosodium L-

554 glutamate-induced obesity: evidence of XBP-1/PDI/MTP axis activation.
555 Biochemical and biophysical research communications. 2014;443(2):725-30.

556

557

558 ACKNOWLEDGMENTS

559 Authors are thankful to the Laboratory of Experimental Physiology's and
560 Laboratory of Vascular Biology's staff for all the technical support during
561 experimental procedures. This work was funded by Fundação de Amparo à
562 Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão – FAPEMA
563 through the grants PAEDT-00380/14, PAEDT-02085/15, ESTAGIO-05258/15,
564 UNIVERSAL-00523/14 and UNIVERSAL-00792/14. TMM and VRM received
565 fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico –
566 CNPq and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
567 CAPES, respectively.

568

569 AUTHOR CONTRIBUTIONS

570 B.A.S.P and A.M.A.P were responsible for the conception and study design.
571 B.A.S.P., T.M.M., K.F.T.F., L.M.F. and V.R.M. performed animal experiments,
572 biochemical and molecular biology protocols, and analyzed data. A.M.A.P., D.K.,
573 A.L.C. and S.R.F.P. supervised protocols execution and helped interpreting data.
574 F.R.M.L. critically discussed data. B.A.S.P and A.M.A.P. drafted the manuscript. All
575 authors read, critically discussed and approved the final manuscript.

576

577 COMPETING FINANTIAL INTERESTS

578 Authors declare the absence of any commercial or financial relationships that could
579 be construed as a potential conflict of interest.

580 **Figure legends**

581

582 **Figure 1. Morphometric parameters.** **A**, weight gain (g) and AUC; **B**, Lee index
 583 ($\text{g}^{1/3} \cdot \text{cm}^{-1} \times 100$); **C**, energy intake (Kcal/100g/day) and AUC; **D**, weight of
 584 retroperitoneal fat (g/100g BW); **E**, weight of periepididymal fat (g/100g BW); **F**,
 585 weight of mesenteric fat (g/100g BW); **G**, weight of liver (g/100g BW); **H**, fat
 586 deposited in liver (g/liver weight); **I**, weight of skeletal muscles (g/100g BW)
 587 assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and high-sucrose diet (HSD, n
 588 $= 7$) until 6-months-old from weaning. Points and bars represent mean \pm SEM
 589 (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

590

591 **Figure 2. Glucose-insulin axis function assessment.** **A**, Fasting blood glucose
 592 levels (mg/dL); **B**, blood glucose levels (mg/dL) during intraperitoneal glucose
 593 tolerance test (ipGTT); **C**, AUC of ipGTT; **D**, fed blood glucose levels (mg/dL); **E**,
 594 blood glucose levels (mg/dL) during intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT); **F**,
 595 blood glucose disappearance rate (KITT); **G**, serum insulin levels ($\mu\text{LU/mL}$); **H**,
 596 HOMA-B; **I**, HOMA-IR; **J**, serum triglyceride levels (mg/dL); **K**, serum free fatty
 597 acids (mM); **L**, TyG index assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and
 598 high-sucrose diet (HSD, $n = 7$) until 6-months-old from weaning. Points and bars
 599 represent mean \pm SEM (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p <$
 600 0.001 .

601

602 **Figure 3. Serum redox profile.** **A**, superoxide dismutase activity (U/mL); **B**,
 603 catalase activity (nmol/min/mL); **C**, glutathione peroxidase activity (nmol/min/mL);
 604 **D**, serum MDA (μM) assessed in rats fed a standard chow (CTR, $n = 7$) and high-
 605 sucrose diet (HSD, $n = 7$) until 6-months-old from weaning. Bars represent mean \pm
 606 SEM (unpaired t-test one-tailed). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

607

608 **Figure 4. Motor, behavioral and cognitive assessments.** **A**, motor skills
 609 assessment by time on rod (s) in rotarod test; **B**, spatial learning assessment by

610 latency time (s) to find the hidden platform in water maze test; **C**, memory
 611 assessment by time spent (s) in the correct quadrant in water maze test; **D**,
 612 behavioral assessment by frequency of total crosses, central and peripheral
 613 squares entries, rearings, groomings and defecation in open field test assessed in
 614 rats fed a standard chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-
 615 months-old from weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a
 616 standard chow (OLD, n = 7). Points and bars represent mean \pm SEM (One-way
 617 ANOVA Newman Keuls). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to
 618 CTR; + $p < 0.05$ when compared to OLD; and ## $p < 0.01$ when compared to HSD.
 619

620 **Figure 5. Expression of UPR pro-adaptive markers in hippocampus.** Relative
 621 mRNA expression of UPR sensors Ire1 α (**A**), Perk (**B**) and Atf6 (**C**); chaperones
 622 Grp78 (**D**), PdiA2 (**E**), Calnexin (**F**) and Calreticulin (**G**); neural plasticity Bdnf (**H**);
 623 and antioxidant defense Nrf2 (**I**) assessed in hippocampus of rats fed a standard
 624 chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from
 625 weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, n =
 626 7). All samples were normalized to the relative levels of GAPDH and results are
 627 expressed as the fold change values of $2^{-\Delta\Delta CT}$, as determined by real-time
 628 amplification. Bars represent mean \pm SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). * $p <$
 629 0.05 ; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when compared to CTR; ++ $p < 0.01$ when compared
 630 to OLD; and ### $p < 0.001$ when compared to HSD.

631

632 **Figure 6. Expression of cell death and senescence markers in hippocampus.**
 633 Relative mRNA expression of anti-apoptotic marker Bcl2 (**A**), and pro-apoptotic
 634 markers Chop (**B**) and Caspase 3 (**C**); Calpain presence inferred by PARP-1
 635 protein expression (**D**); and relative mRNA expression of senescence markers p53
 636 (**E**) and p21 (**F**) assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, n = 7)
 637 and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning, and middle-
 638 aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, n = 7). Gene
 639 expressions were normalized to the relative levels of GAPDH and results are

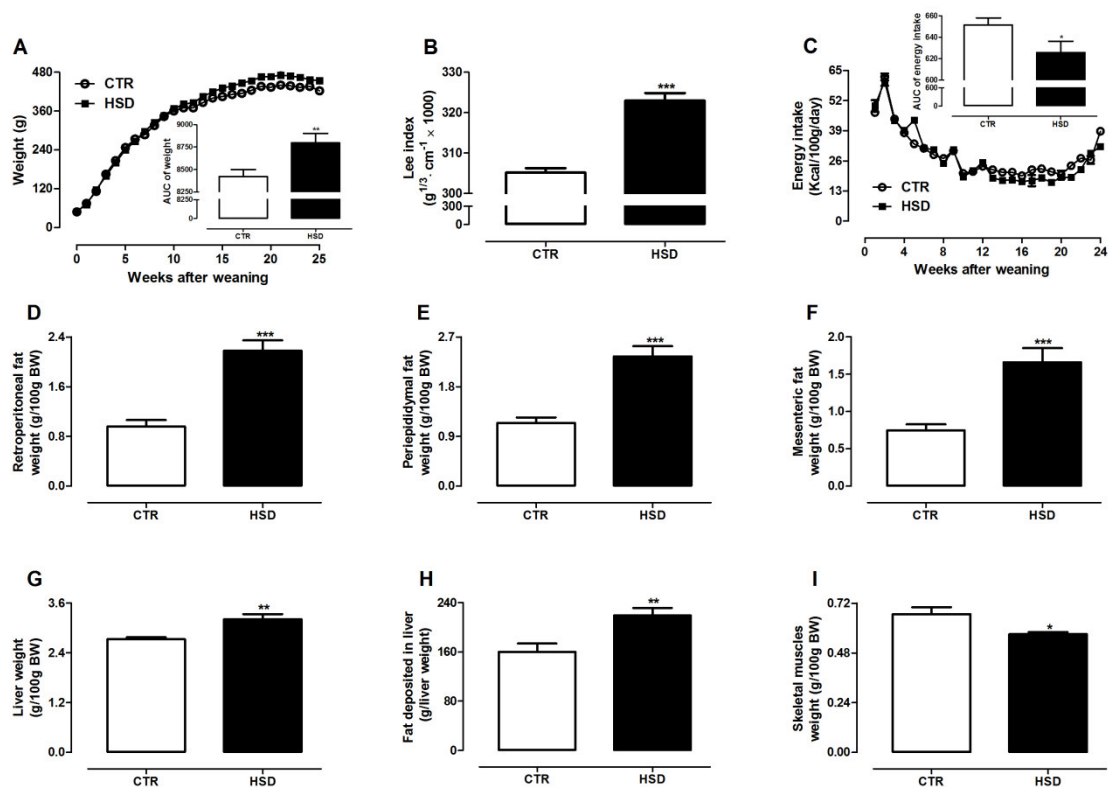
640 expressed as the fold change values of $2^{-\Delta\Delta CT}$ and protein expression are
 641 expressed as a relative density normalized by anti- β -Actin. Bars represent mean \pm
 642 SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ when
 643 compared to CTR; + $p < 0.05$, ++ $p < 0.01$ when compared to OLD; and # $p < 0.05$
 644 when compared to HSD.

645

646

647

Figure 1. Morphometric parameters.



648

649

650

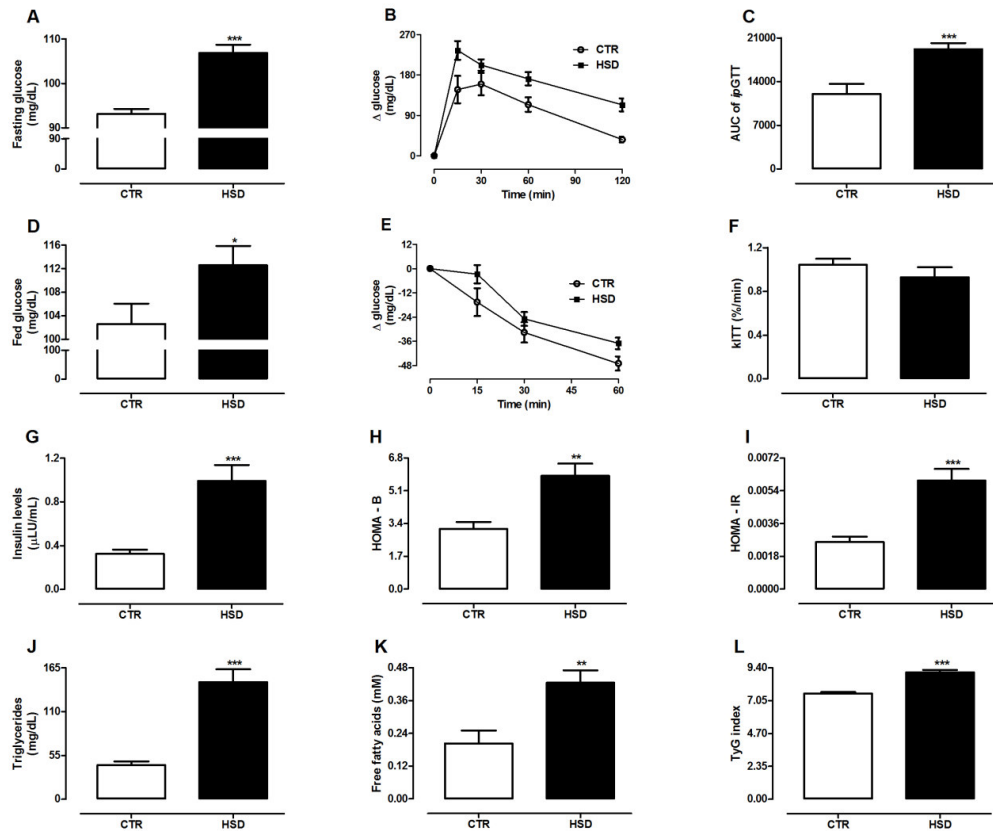
651

652

653

654

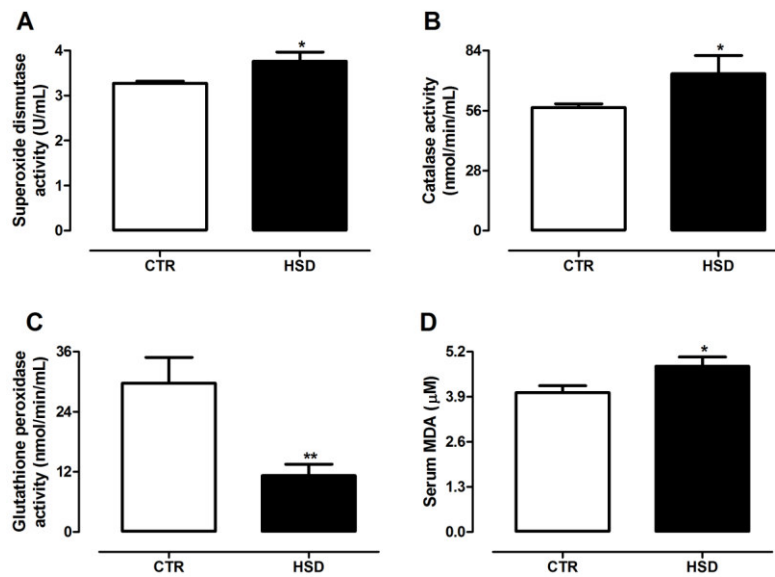
Figure 2. Glucose-insulin axis function assessment.



655

656

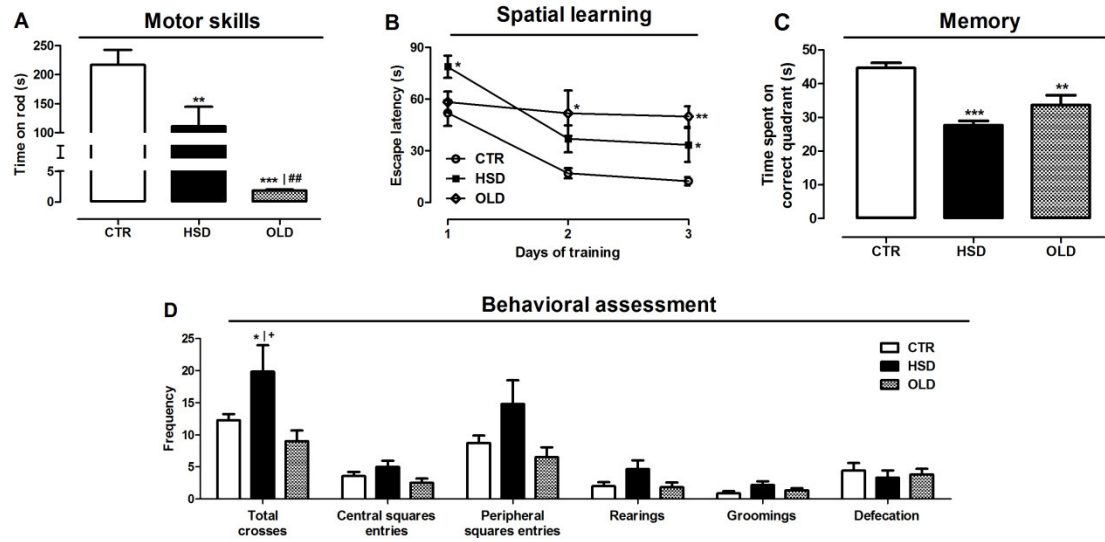
Figure 3. Serum redox profile.



657

658

Figure 4. Motor, behavioral and cognitive assessments.

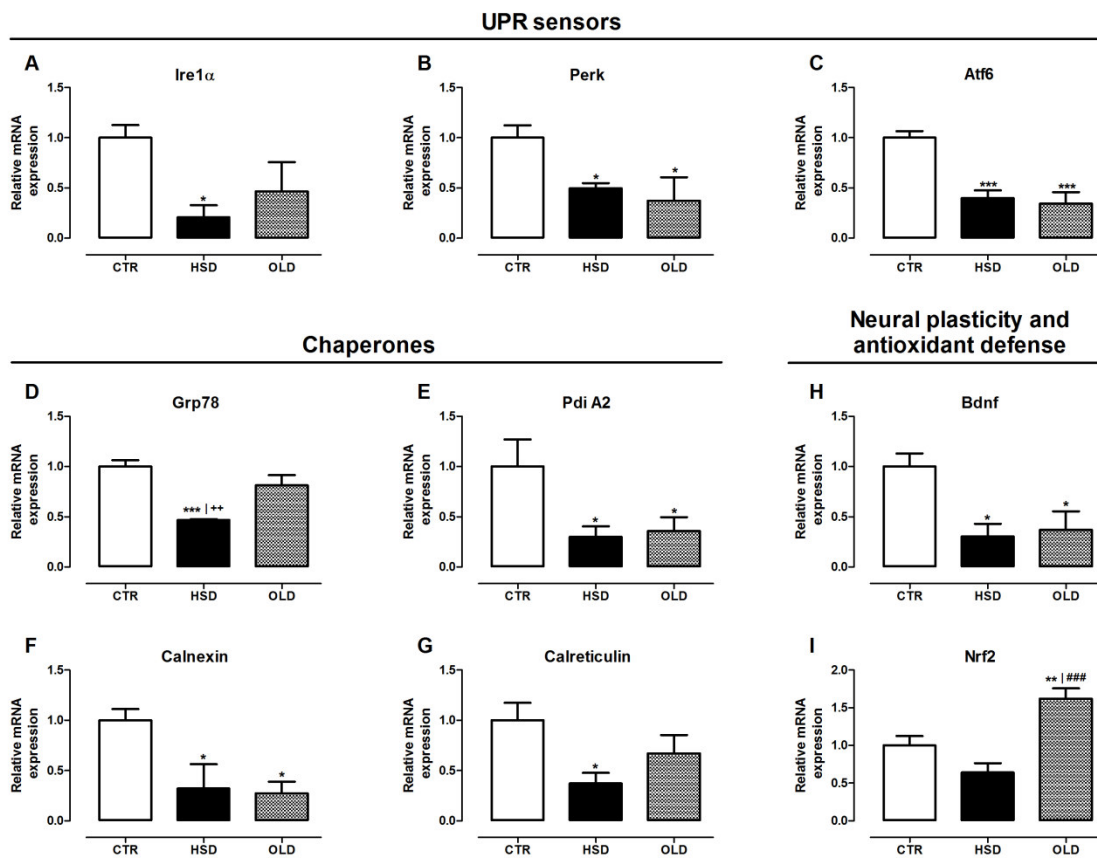


659

660

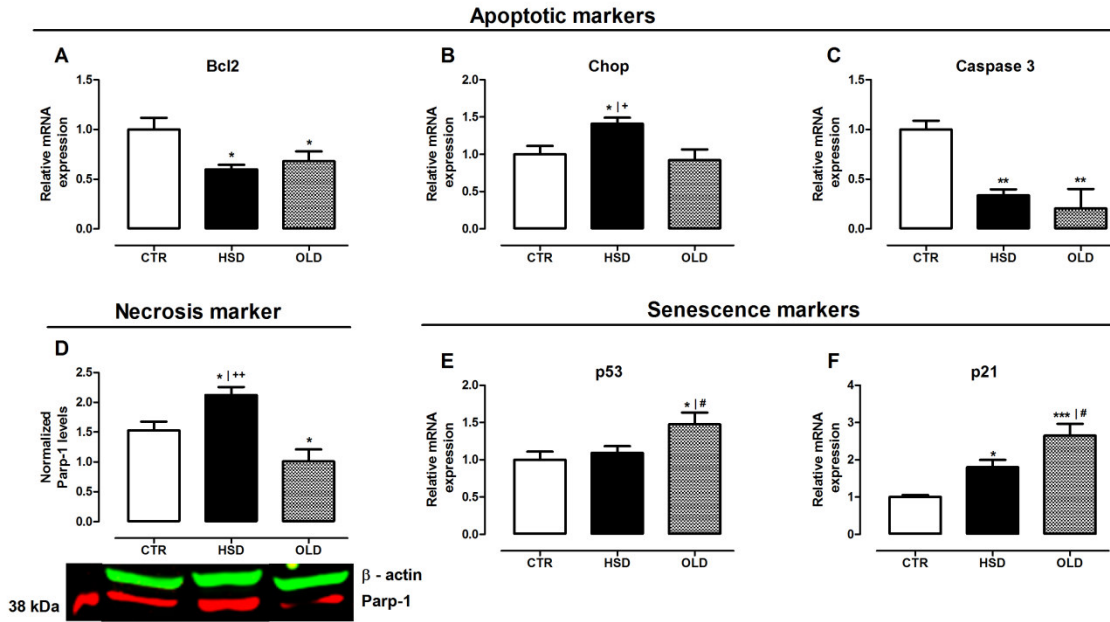
661

Figure 5. Expression of UPR pro-adaptive markers in hippocampus.



662

663 **Figure 6. Expression of cell death and senescence markers in hippocampus.**



664

665

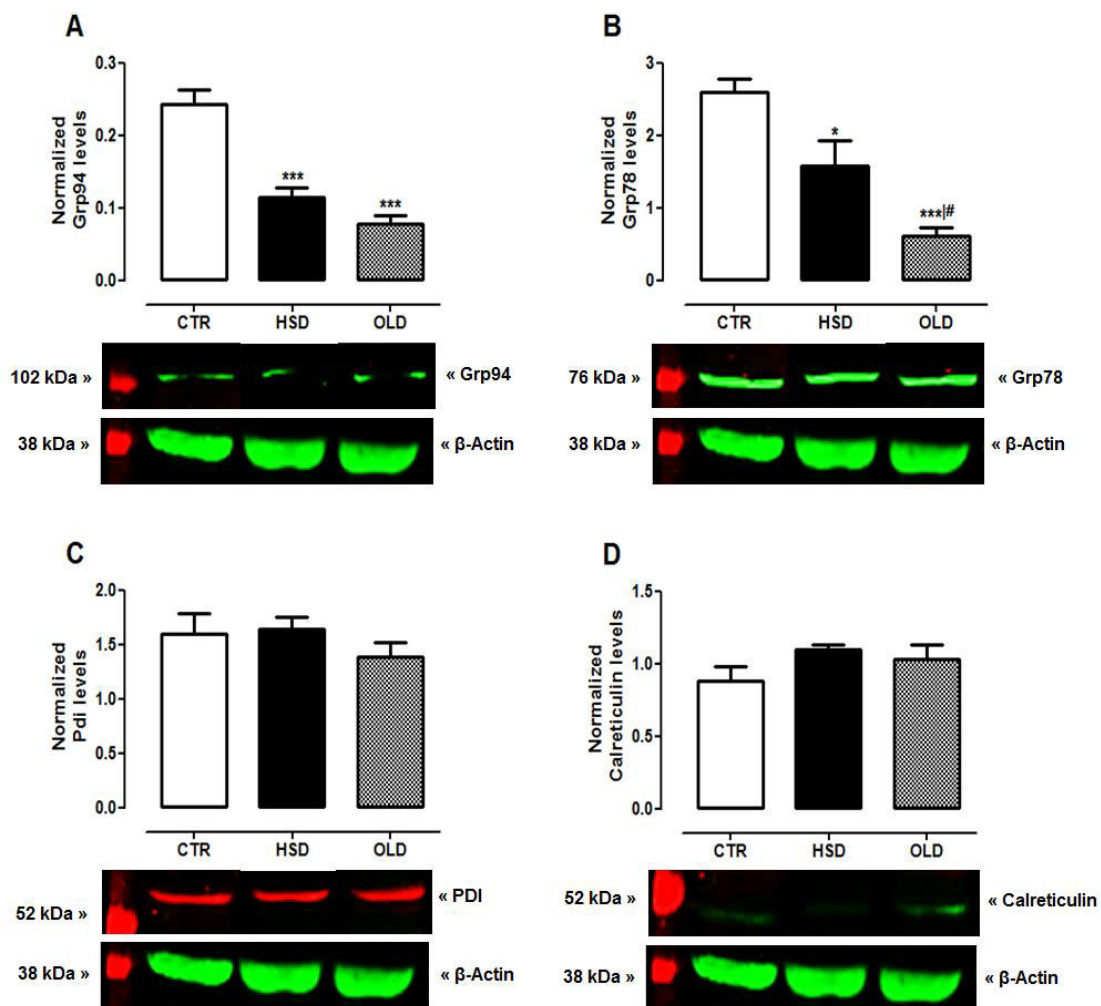
666 SUPPLEMENTARY INFORMATION

667 Table 1. Primers sequence

Genes*	Foward primer	Reverse primer	Amplicon	GenBank n^o
Gapdh	5'-GAGACAGCCGCATCTTCTTGT-3'	5'-CGACCTTCACCATCTTGTCTATGA-3'	62	NM_017008.4
Ire1 α	5'-GGATGTGAGTGACCGAATAGAAAA-3'	5'-TCCAAGTCCCGCACGAT-3'	60	NM_001191926.1
Perk	5'-GGCTGGTGAGGGATGGTAAA-3'	5'-TTGGCTGTGTAAGTGTGTCA-3'	64	NM_031599.2
Atf6	5'-TTCTCTGATGGCCGTGCAT-3'	5'-TGAAGATGACCCACAGAACCAA-3'	65	NM_001107196.1
Grp78	5'-AAAGAAGGTCACCCATGCAGTT-3'	5'-GCCGCTGTGCATCATTGA-3'	59	NM_013083.2
Pdi A2	5'-GCACCTGGTCACAGAATTCAAC-3'	5'-TGAGGATCCTGGCTGCAAA-3'	62	NM_001105775.2
Calnexin	5'-TGCGGTGGTGCCTACGT-3'	5'-GGAGTCTTGTCTGGAATTGATC-3'	74	NM_172008.2
Calreticulin	5'-GCCAGACACTGGTGGTACAGTTC-3'	5'-AATATCGACTGTGGGGGCG-3'	60	NM_022399.2
Bdnf	5'-CACTTTTGAGCACGTGATCGA-3'	5'-AGAAGGTTCCGGCCCAACG-3'	59	NM_001270630.1
Nrf2	5'-CCCATTGAGGGCTGTGATCT-3'	5'-GCCTTCAGTGTGCTTCTGGTT-3'	60	NM_031789.2
Bcl2	5'-GGGATGCCTTTGTGGAACATATG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	62	NM_016993.1
Chop	5'-TGGCACAGCTTGCTGAAGAG-3'	5'-TCAGGCGCTCGATTTCT-3'	54	NM_001109986.1
Caspase 3	5'-TTTGCGCCATGCTGAAACT-3'	5'-ACGAGTGAGGATGTGCATGAAT-3'	59	NM_012922.2
p53	5'-AAGACCAAGAAGGGCCAGTCTA-3'	5'-CAATGATCAAGAAAGTGGGGC-3'	61	NM_030989.3
p21	5'-CCTCCGCTGGGAACGTT-3'	5'-GCATAACTTCTGCTCAAGCACG-3'	56	NM_031550.1

668

669 * Gapdh: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Ire1 α : Inositol-requiring enzyme 1 alpha; Perk: Protein kinase RNA-like ER kinase; Atf6:
670 Activating transcription factor 6; Grp78: Glucose regulated protein 78; Pdi A2: Protein disulfide isomerase family A, member 2; Calnexin;
671 Calreticulin; Bdnf: Brain derived neurotrophic factor; Nrf2: Nuclear factor, erythroid derived 2, like 2; Bcl2: B-cell CLL/lymphoma 2; Chop: C/EBP-
672 homologous protein; Caspase 3: caspase 3; p53: Tumor protein p53; p21: Cyclin dependent kinase inhibitor 1A.

673 **Supplemental Figure 1.**

674

675

676 **Supplemental Figure 1. Protein expression of luminal ER-chaperones in**677 **hippocampus.** Protein expression of Grp94 (A), Grp78 (B), Pdi (C) and

678 Calreticulin (D) assessed in hippocampus of rats fed a standard chow (CTR, n =

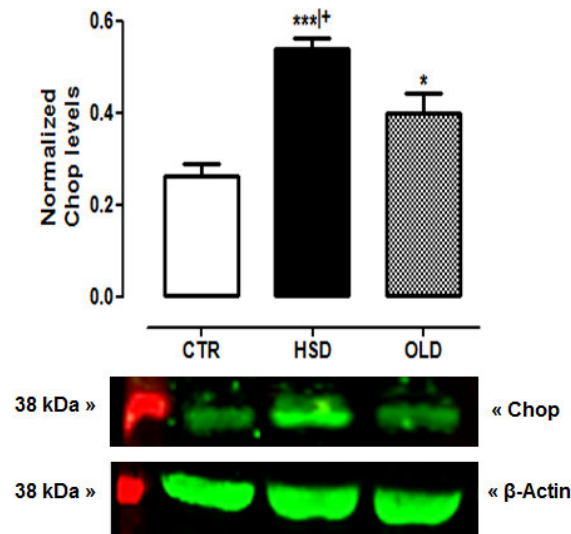
679 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from weaning, and

680 middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD, n = 7).

681 Proteins expressions are expressed as a relative density normalized by anti- β -682 Actin. Bars represent mean \pm SEM (One-way ANOVA Newman Keuls). *p <

683 0.05, ***p < 0.001 when compared to CTR; and #p < 0.05 when compared to

684 HSD.

685 **Supplemental Figure 2.**

686

687

688 **Supplemental Figure 2. Protein expression of Chop in hippocampus.**

689 Protein expression of Chop assessed in hippocampus of rats fed a standard

690 chow (CTR, n = 7) and high-sucrose diet (HSD, n = 7) until 6-months-old from

691 weaning, and middle-aged (20-months-old) animals fed a standard chow (OLD,

692 n = 7). Proteins expressions are expressed as a relative density normalized by

693 anti-β-Actin. Bars represent mean ± SEM (One-way ANOVA Newman Keuls).

694 *p < 0.05, ***p < 0.001 when compared to CTR; and +p < 0.05 when compared

695 to OLD.

696

697

698

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO	
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 14
PROJETO DE PESQUISA	Registro do CEUA: 14/13
O ANTILEISHMANIAL GLUCANTIME® CAUSA DANOS AO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO? UMA ABORDAGEM DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA MOELCULAR À AÇÃO DO FARMACO	Nº do parecer: 23115.012909-2013-41
	Data de entrada no CEUA: 09/09/2013
	Parecer: APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

I – Identificação

Título do projeto:		
O ANTILEISHMANIAL GLUCANTIME® CAUSA DANOS AO DNA POR ESTRESSE OXIDATIVO? UMA ABORDAGEM DOS GENES ENVOLVIDOS NA RESPOSTA MOELCULAR À AÇÃO DO FARMACO		
Identificação da equipe executora:		
Prof. Dra. Silma Regina Ferreira Pereira		
Prof. Dra. Flavia Raquel F. Nascimento		
Vanessa Ribeiro Moreira		
Instituição onde será realizado:		
Universidade Federal do Maranhão/Departamento de Patologia-NIBA		
Área temática:	Multicêntrico:	Data de recebimento:
Ciências Biológicas		09/09/13
Cooperação estrangeira:		Data de devolução
		06/12/13

II – Objetivos:

O presente projeto objetiva investigar o mecanismo de ação pelo qual o antimonial Glucantime[®] causa danos ao DNA, através da investigação de genes relacionados ao estresse oxidativo, em modelo *in vivo*.

III – Sumário do projeto:

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários e tendo o antimonial pentavalente Glucantime[®] como principal fármaco para o tratamento. O mecanismo de ação pelo qual o fármaco ainda não é claro, entretanto efeitos tóxicos induzidos por danos genéticos já são descritos. O presente projeto propõe realizar estudos que apontam os genes relacionados a via de formação de radicais de oxigênio como um provável mecanismo do fármaco em estudo.

IV – Comentário do relator frente à resolução resolução Nº 779 – CONSEPE e complementares em particular sobre:

O presente trabalho apresenta relevância propondo esclarecer o mecanismo de ação do antimonial Glucantime[®] através do estudo gênico relacionado a produção de espécies reativas de oxigênio. Os dados poderão esclarecer melhor o mecanismo de ação do fármaco, seu potencial citotóxico, bem como, gerar informações para novas estratégias terapêuticas.

V – Pendências

VI – Recomendações:

- a) Sugere-se substituir o método de eutanásia por deslocamento cervical para sobredose de anestésico, caso não seja possível justificar.
- b) Esclarecer o destino das carcaças dos animais.
- c) Atualização do cronograma.

VII – Parecer consubstanciado do CEUA

São Luís, ____ 14 ____ / ____ Fevereiro ____ / ____ 2014 ____



Profa Dra Lucilene Amorim Silva

Presidente do CEUA / UFMA