



Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

**Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida da
5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tione
sobre formas adaptativas livres de *Leishmania (L.) amazonensis*
e na infecção experimental**

Brasília – DF

2014

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

**Avaliação *in vitro* da atividade leishmanicida da
5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tione
sobre formas adaptativas livres de *Leishmania (L.) amazonensis*
e na infecção experimental**

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília – DF

2014

NÚBIA MARIA PEREIRA DE SOUSA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA 5-ETOXICARBONIL-4-(2-HIDROXIFENIL)-6-METIL-3,4-DIIDROPIRIMIDIN-2(1H)TIONA SOBRE FORMAS ADAPTATIVAS LIVRES DE *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS* E NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovado em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Prof. Dra. Marcela Lemos Brettas Carneiro (Membro Titular)

Prof. Dra. Tatiana Amabile de Campos (Membro Titular)

Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto (Membro Suplente)

Dedico este trabalho à minha família e amigos
que sempre estiveram comigo durante momentos
bons e difíceis de minha vida.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer inicialmente a Deus por ter iluminado e guiado meu caminho.

É muito bom agradecer várias pessoas que ao longo de dois anos compartilharam comigo momentos de tristeza, angustia, incerteza, cansaço, esperança e alegria.

Ao orientador Prof. Dr. José Raimundo Corrêa, por me aceitar como sua aluna e pela oportunidade, confiança, paciência, compreensão, tempo disposto e orientação.

Ao Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto, Coordenador do Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília, local onde se realizou a síntese do composto que viabilizou a realização deste trabalho.

À minha querida família, minha mãe Eleusa, meu pai Tomaz, minha irmã Naiara e ao meu marido Renato, por terem me apoiado e entendido meus momentos de ausência. Amo demais vocês!

À minha vó Maria com quem passei a maior parte de minha vida, obrigada por ter me criado, e definido o que sou hoje.

À vó Clemência e Maria Auxiliadora pelas orações e rezas.

À minha amada tia Carla, pelo seu exemplo profissional, que sempre me apoiou nos momentos que mais precisei e por sempre me estimular a estudar.

Ao tio Carlinhos por terem tantas vezes me incentivado a nunca parar de estudar. Muito obrigada pelas conversas e conselhos.

Às minhas amigas e companheiras de bancada Bruna, Natália Vasconcelos e Rafaela por terem me recebido tão bem quando eu cheguei no Laboratório de Microscopia Eletrônica. Aprendi demais com vocês não só cientificamente, mas me tornei uma pessoa melhor depois que vocês fizeram parte da minha vida. Em especial a Bruninha que com seu jeito meigo me ajudou tanto, não só me auxiliando nos experimentos, mas me deixando sempre motivada a continuar no Mestrado. Aprendi muito com você!

Aos meus amigos João, José Antônio, Daniela e Ingrid por terem dedicado seu tempo para me ajudar. Muito obrigada!

À minha parceira Misléia pelas várias trocas de informações e ideias em relação às leismanhias, que apesar das diferenças, no final a gente se entendia.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica Bárbara Yasmim, Cláudio, Edna, Elias, Joseilma, Karine, Lorena, Ludi, Márcia, Mari, Mayara, Natália Lemos, Rachel, Shaiane, Thatiane.

À profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus por permitir meu acesso ao Laboratório de Imunologia (UnB). Ao pessoal tão receptivo do Laboratório de Imunologia Elisabete, Danilo, Luciana, Shirley, Débora e, em especial, a Daniela e Mayara por tanta disposição e alegria em me ajudar; além da paciência em me ensinar.

Ao Tércio, Claudinei e Andrea pela troca de informações.

Ao Prof. Dr. Gustavo Adolfo Sierra Romero por permitir o acesso ao Laboratório do Núcleo de Medicina tropical e a técnica Renata pela atenção, simpatia e prontidão em sempre ajudar.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular.

À Universidade de Brasília pelo suporte e a estrutura física necessária para a realização do trabalho.

A CAPES, CNPq, FAPDF, DPP-UnB e Finatec pelo apoio financeiro.

Não importa onde você parou...
em que momento da vida você cansou...
o que importa é que sempre é possível
e necessário "RECOMEÇAR".
Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...
é renovar as esperanças na vida
e o mais importante...
acreditar em você de novo.
Carlos Drummond Andrade

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o ser humano e são causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. A quimioterapia é o único tratamento efetivo para a doença. No entanto, efeitos adversos, administração parenteral, tratamentos não responsivos, regimes de tratamento com altas doses por longos períodos e custos elevados dos esquemas de tratamento são fatores limitantes do uso destas drogas. Neste contexto, a prospecção de novos fármacos contra as leishmanioses possui uma grande importância para a saúde pública em muitos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. No presente estudo foi avaliada a atividade leishmanicida da 5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tione (codificado como 4p) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Este composto pertence à classe de heterocíclicos conhecidos como DHPMs (3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona ou -tione). O composto 4p apresentou efeito citotóxico contra as formas promastigotas, sendo a concentração inibitória (50%) dos parasitos é de 50 µM. O efeito antiproliferativo de 4p foi observado pela modificação dos índices celulares presentes nas diferentes fases da curva de crescimento das formas promastigotas tratadas. O tratamento com 4p induziu alterações morfológicas importantes em formas promastigotas e amastigotas avaliadas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados sugerem que o composto 4p na concentração de 50 µM interfere com os microtúbulos destes protozoários, produzindo várias alterações na membrana celular. E ainda promoveu alterações estruturais nas mitocôndrias. Ensaios de infecção experimental *in vitro* demonstraram que este composto é eficiente na eliminação dos parasitos intracelulares quando aplicados em regime de pré-tratamento, sendo também eficiente quando aplicados com a infecção já em curso. Assim, a classe das DHPMs pode representar uma arquitetura molecular promissora para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas alvo dirigido.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, Dihidropirimidinonas, Leishmanioses, Alterações ultraestruturais, *L. (L.) amazonensis*.

ABSTRACT

The leishmaniasis is an infectious and parasitic diseases that affects humans and is caused by several species of protozoa belonging to the *Leishmania* genus. Chemotherapy is the only effective treatment for this disease. Adverse effects, parenteral administration route, unresponsive treatments, treatment regimens with high doses for long periods and high costs of treatment are however limiting factors for a wide use of these drugs. In this context, the search for new drugs against leishmaniasis has a huge importance for the public health policy on many developing countries, including Brazil. In this present study it was evaluated the antileishmanial activity of 5-ethoxycarbonyl-4-(2-hydroxyphenyl)-6-methyl-3,4-dihidropirimidin-2(1H)-thione (codified as 4p) against promastigotes and amastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*. This compound belongs to a class of heterocyclic known as DHPMs (3,4dihidropirimidin-2 (1H)-one and thione). Compound 4p showed cytotoxic effects against the promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*, with a half minimal (50%) inhibitory concentration (IC₅₀) of 50 µM. Compound 4p caused an antiproliferative effect against this parasite significantly reducing the parasite cells number throughout all stages of the growth curve. Treatment with 4p also produced several ultrastructural changes on the promastigotes and amastigotes forms as depicted from scanning electron microscopy and transmission electron microscopy analyses. Our results suggest that compound 4p concentration of 50 µM appears to interfere with the protozoan microtubules affording several cellular membrane alterations. It was also showed ultrastructural disruption of the mitochondria. Experimental *in vitro* infection showed that this compound is effective to eliminate intracellular parasites when applied under pre-treatment schedule, as well, when applied during the ongoing infection. In this context, the class of DHPMs may represent a promising molecular architecture for the development of new antileishmanial target-directed agents.

Keywords: Antileishmanial activity, Dihydroprymidinone, Leishmaniasis, Ultrastructural alterations, *L. (L.) amazonensis*.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	1
Figura 2. Representação das formas adaptativas da <i>L.(L.) amazonensis</i> , observa-se a diferença no tamanho do corpo celular e do flagelo	3
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida da <i>Leishmania</i> sp. no inseto vetor e no hospedeiro mamífero	4
Figura 4. Representação tridimensional das formas adaptativas de <i>L. (L.) amazonensis</i> mostrando as principais organelas celulares	5
Figura 5. Estrutura do flagelo de <i>Leishmania</i> sp. em promastigotas e amastigotas	7
Figura 6. Diferentes formas clínicas da leishmaniose	12
Figura 7. Status endêmico da leishmaniose tegumentar americana, 2012	15
Figura 8. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil por ano (2007-2012).	16
Figura 9. Fórmula estrutural dos antimonias pentavalentes	18
Figura 10. Fórmula estrutural da anfotericina B	20
Figura 11. Fórmula estrutural da pentamidina	21
Figura 12. Fórmula estrutural da miltefosina	22
Figura 13. Fórmula estrutural da paromicina	23
Figura 14. Fórmula estrutural do núcleo das dihidropirimidinonas	26
Figura 15. Fórmula estrutural do composto 4p	32
Figura 16. Curva de crescimento das cepas <i>L. (L.) amazonensis</i> e <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	40
Figura 17. Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p	41
Figura 18. Curva de crescimento de promastigotas de crescimento de promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com 4p	42
Figura 19. Alterações morfológicas em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p e observadas através do MEV.	43
Figura 20. Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 24h com o composto 4p e observadas através do MET.	44
Figura 21. Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 48h com o composto 4p e observadas através do MET.	45
Figura 22. Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 72h com o composto 4p e observadas através do MET.	46
Figura 23. Obtenção de formas amastigotas axênicas	47
Figura 24. Produção de formas amastigotas axênicas	48
Figura 25. Reversão da forma amastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i> para forma promastigota <i>in vitro</i>	49

observadas através da microscopia de luz	
Figura 26. Reversão da forma amastigota de <i>L. (L.) amazonensis</i> para forma promastigota <i>in vitro</i> observadas através do MEV.	50
Figura 27. Alterações morfológicas em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p observadas por MEV	51
Figura 28. Alterações ultraestruturais em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 24h com o composto 4p e observadas através do MET.	52
Figura 29. Alterações ultraestruturais em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 48h com o composto 4p e observadas através do MET.	53
Figura 30. Alterações ultraestruturais em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas por 72h com o composto 4p e observadas através do MET.	54
Figura 31. Curva tempo dependente dos macrófagos peritoneais tratados	55
Figura 32. Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p diminui a infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP.	56
Figura 33. Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p diminui a infecção por <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP.	57
Figura 34. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento de macrófagos infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	59
Figura 35. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento de macrófagos infectados com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	60
Figura 36. Detecção de hemólise em eritrócitos humanos (O ⁺) por método <i>in vitro</i>	65

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Série histórica de casos de LTA confirmados no DF, no período de 2010 a 2012	17
Tabela 2: Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p.	41

LISTA DE ABREVIATURAS

BOD	Demanda bioquímica de Oxigênio
DAPI	Dihidrocloreto de 4',6-Diamidino-2-Fenilindole
DHPMs	Dihidropirimidinonas
DMSO	Dimetilsulfóxido
GFP	Green Fluorescent Protein
IC ₅₀	Concentração inibitória capaz de inibir e 50% o crescimento celular
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM	Leishmaniose Cutâneomucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NNN	Novy-MacNeal-Nicolle
4p	Dihidropirimidinona com 2-hidroxi-benzaldeído
PBS	Tampão fosfato salino
SFB	Soro fetal bovino
UnB	Universidade de Brasília
WHO	<i>World Health Organization</i>

ÍNDICE GERAL

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O gênero <i>Leishmania</i>	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Morfologia	2
1.2. Ciclo biológico	3
1.3. Organização estrutural	5
1.3.1. Membrana Plasmática	6
1.3.2. O Citoesqueleto	6
1.3.3. O Flagelo	7
1.3.4. Mitocôndria e Cinetoplasto	7
1.3.5. Núcleo	8
1.3.6. Aparato de Golgi	8
1.3.7. Reticulo endoplasmático (regiões lisas e rugosas)	9
1.3.8. Glicossomos	9
1.3.9. Megassomos	9

1.3.10. Acidocalcissomos	10
1.4. <i>Leishmania</i> GFP	10
1.5. <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> e a leishmaniose	11
1.5.1. Aspectos gerais	11
1.5.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e suas formas clinicas	11
a)Leishmaniose Cutanea Localizada(LCL)	13
b)Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	13
c)Leishmaniose Cutânea Disseminada	14
d) Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM)	14
1.6. Aspectos epidemiológicos	15
1.7. O Tratamento das leishmanioses	17
1.7.1. Antimoniais pentavalentes	17
1.7.2. Anfotericina B	20
1.7.3. Pentamidinas	21
1.7.4. Miltefosina	22
1.7.5. Paromomicina	23
1.8. Microtúbulos como alvo quimioterápico	23
1.9. Dihidropirimidinona e seus derivados	25
2. JUSTIFICATIVA	27
3. OBJETIVOS	28
3.1. Objetivo Geral	28
3.1. Objetivos Específicos	28

4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1. Reagentes e equipamentos	29
4.2. Cultivo dos parasitos	30
4.3. Curva de crescimento	30
4.4. Animais	31
4.5. Síntese da 3,4-dihidropirimidinona com 2-hidroxi-benzaldeído	31
4.6. Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p	32
4.6.1. Análise da interferência do composto 4p na curva de crescimento das formas promastigotas da <i>L. (L.) amazonensis</i>	32
4.6.2. Análise das alterações morfológicas e ultraestruturais produzidas pelo composto 4p em promastigotas da <i>L. (L.) amazonensis</i>	33
4.7. Teste do potencial leishmanicida do composto 4p sobre as formas amastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i>	33
4.7.1. Produção de amastigotas axênicas	33
4.7.2. Diferenciação das formas amastigotas axênicas em promastigotas	33
4.7.3. Análise das alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo composto 4p em amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	34
4.8. Análise por Microscopia de Luz	
4.9. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura	34
4.10. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão	35
4.11. Obtenção de macrófagos peritoneais	35
4.12. Análise de citotoxicidade em macrófagos peritoneais tratados com o composto 4p	36
4.13. Ensaios <i>in vitro</i> com formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis GFP</i>	36

4.13.1. Análise do pré-tratamento dos macrófagos peritoneais e do tratamento após infecção de macrófagos peritoneais por formas promastigotas da <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	36
a) Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com composto 4p	37
b) Tratamento de macrófagos peritoneais com composto 4p após infecção com <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	37
4.14. Análise qualitativa por meio da microscopia de fluorescência da interação <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP e macrófagos peritoneais	38
4.15. Análise quantitativa por citometria de fluxo da interação <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP e macrófagos peritoneais	38
4.16. Teste de Hemólise	38
4.17. Análises Estatísticas	39
5. RESULTADOS	39
5.1. Determinação da curva padrão de crescimento para <i>L. (L.) amazonensis</i>	39
5.2. Teste da avaliação da viabilidade das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o composto 4p e determinação do IC ₅₀	40
5.3. O composto 4p apresenta atividade antiproliferativa sobre a formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	41
5.4. O composto 4p provoca alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	42
5.5. Conversão <i>in vitro</i> de formas promastigotas para formas amastigotas	46
5.6. As formas amastigotas diferenciadas <i>in vitro</i> conservam a capacidade de retornar a forma promastigota	48
5.7. O composto 4p provoca alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i>	50
5.8. O composto 4p apresentou citotoxicidade semelhante a anfotericina B sobre macrófagos peritoneais	54

5.9. O pré-tratamento dos macrófagos com o composto 4p diminui a infecção produzida por <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	54
5.10. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento após infecção de macrófagos de macrófagos com promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> GFP	58
5.11. O composto 4p não apresenta atividade hemolítica	61
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	69
8. PERSPECTIVAS	70
9. REFERÊNCIAS	71
10. ANEXO	71

1. INTRODUÇÃO

1.1. O gênero *Leishmania*

1.1.1. Classificação

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem causadas por várias espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania*. Taxonomicamente o gênero *Leishmania* pertence ao Reino Protozoa, Filo *Sarcomastigophora*, Subfilo *Mastigophora*, Classe *Zoomastigophora*, Ordem *Kinetoplastida*, Subordem *Trypanosomatina*, Família *Trypanosomatidae*. As espécies desse gênero podem ser subdivididas em dois subgêneros: *L.(Viannia)* e *L.(Leishmania)*, as quais diferem principalmente no sítio de desenvolvimento do parasito dentro dos insetos vetores (MISHRA *et al.*, 2009; SIQUEIRA, 2011). As espécies do subgênero *Viannia* desenvolvem-se primeiramente no intestino posterior dos vetores e depois migram para o intestino médio e anterior, denominado secção peripilária. Já as do subgênero *Leishmania* desenvolvem-se apenas no intestino anterior e médio, denominado secção suprapilária (LAINSON e SHAW, 1998).

O gênero *Leishmania* é formado por mais de 30 espécies, das quais 20 são patogênicas para os humanos (BAÑULS *et al.*, 2007; CUPOLILLO *et al.*, 2000; NEUBER, 2008). Atualmente, no Brasil são reconhecidas sete espécies dermatrópicas de leishmanias (Figura 1) causadoras de doença humana, sendo as principais espécies: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(V.) braziliensis* e, mais recentemente, as espécies *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *L.(V.) shawi* (LAINSON, 2010; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

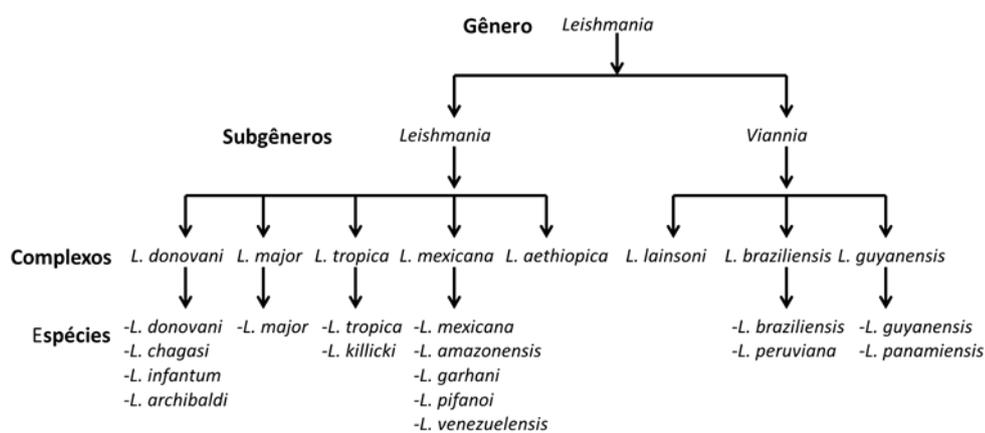


Figura 1. Taxonomia do gênero *Leishmania*. (Adaptado de MISHRA *et al.*, 2009)

1.1.2. Morfologia

O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários unicelulares, que possuem um ciclo de vida heteroxênico (digenético), ou seja, se desenvolvem em dois hospedeiros diferentes e se apresentam sob duas formas de desenvolvimento: a forma promastigota, encontrada no trato digestivo do hospedeiro invertebrado e a forma amastigota, parasita intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado (ALCOLEA *et al.*, 2010; BAÑULS *et al.*, 2007). Estas formas adaptativas representam uma estratégia adotada pelos parasitos para sobreviver às mudanças nas condições ambientais encontradas em seus hospedeiros, como variações na disponibilidade e tipo de nutrientes, pH, temperatura e oxigênio. Porém, se diferem em seus requerimentos nutricionais, taxa de crescimento, habilidade em se dividir, na expressão regulada de suas moléculas de superfície e na sua morfologia (BESTEIRO *et al.*, 2007; TSIGANKOV *et al.*, 2014).

As formas amastigotas são células que podem apresentar seu formato ovalado, esférico ou fusiforme, com diâmetro variando de 3,0 – 6,5 x 1,5 – 3,0 µm (comprimento x largura), as quais se localizam em vacúolos no interior dos macrófagos do hospedeiro infectado, onde se multiplicam por divisões binárias (Figura 2A). Não há flagelo livre, mas somente um rudimento que é encontrado no interior da bolsa flagelar. O citoplasma contém todas as organelas membranosas e estruturas tipicamente presentes nas células eucarióticas como: núcleo grande, esférico ou ovóide; aparato de Golgi, retículo endoplasmático, mitocôndria e ribossomos, podendo ainda ser encontrados vacúolos e inclusões citoplasmáticas. Nestes parasitos, as mitocôndrias apresentam uma diferença marcante na forma de organizar o seu material genético. O DNA mitocondrial está condensado e empacotado na forma de círculos concatenados denominados de maxicírculos e minicírculos. Este material compactado ocupa uma posição definida dentro da célula do parasita, ficando logo abaixo da bolsa flagelar e esta região foi denominada de cinetoplasto (HATAM *et al.*, 2013; MICHALICK e RIBEIRO, 2011).

As formas promastigotas são extracelulares, móveis e alongadas, medindo entre 16,0-40,0 x 1,5-3,0 µm (comprimento x largura), apresentam um único núcleo, com formato arredondado ou oval. O cinetoplasto é anterior ao núcleo e o flagelo longo torna-se livre à partir da porção anterior da célula. No intestino do inseto as formas promastigotas se multiplicam por divisão binária longitudinal. No inseto vetor duas formas de promastigotas podem ser encontradas: as formas multiplicativas, mas não infectivas aos mamíferos, que são denominadas de promastigotas procíclicas (Figura 2B); e as formas não multiplicativas,

capazes de infectar mamíferos, denominadas promastigotas metacíclicas (Figura 2C), que são encontradas na parte anterior do intestino e na probóscide dos flebotomíneos. As promastigotas metacíclicas possuem diâmetro do corpo menor em relação às promastigotas procíclicas e flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo (MICHALICK; RIBEIRO, 2011). As diferenças morfológicas entre as promastigotas procíclica e metacíclica são mostradas na Figura 2.

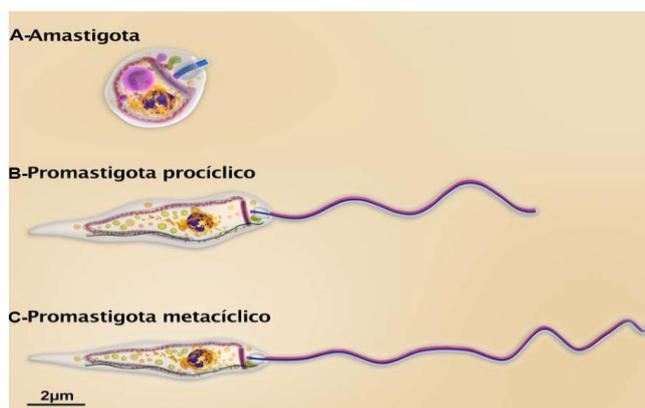


Figura 2. Representação das formas adaptativas da *L.(L.) amazonenses* onde observa-se a diferença no tamanho do corpo celular e do flagelo. (A) Amastigota; (B) Promastigota procíclica; (C) Promastigota metacíclica. (Adaptado de TEXEIRA *et al.*, 2013).

1.2. Ciclo biológico

A leishmaniose pode ser transmitida para humanos e outros hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo por fêmeas infectadas de flebotomíneos da subfamília Phlebotominae, pertencentes aos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo) (ROBERTS e JANOVY, 2000). A saliva do inseto possui diversos componentes biológicos ativos, como anticoagulante, vasodilatador e antiagregante plaquetário, os quais favorecem o fluxo de sangue, o acúmulo linfático no local e facilita o repasto sanguíneo. Possui também fatores com ação quimiotática para monócitos e células imunorreguladoras com capacidade de interagir com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo sua ação efetora na destruição dos parasitos (BESTEIRO *et al.*, 2007, MICHALICK e RIBEIRO, 2011). As formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelo inseto vetor na área da lesão que é provocada para a obtenção de sangue. Os parasitos presentes no sangue regurgitado penetram no tecido do vertebrado pela área da lesão e são fagocitados por células do sistema fagocítico mononuclear iniciando a fase de desenvolvimento intracelular do parasito. Nesta fase, ocorre

a fusão entre os fagossomas contendo as leishmanias interiorizadas e os lisossomos formando o fagolisossoma, ambiente no qual ocorrerá à conversão das formas promastigotas metacíclicas nas formas amastigotas. Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas na eliminação de agentes infecciosos, as leishmanias apresentam mecanismos capazes de subverter a capacidade microbicida destas células, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico, multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para o tecido onde poderão infectar outros macrófagos, propagando a infecção (SERAFIM *et al.*, 2012; VANNIER-SANTOS *et al.*, 2002). O inseto vetor ao realizar o repasto sanguíneo ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas que se transformam novamente em formas promastigotas, primeiramente procíclicas, posteriormente metacíclicas infectivas, completando o ciclo de vida do parasito (BESTEIRO *et al.*, 2007). O ciclo biológico da *Leishmania sp* está representado na Figura 3.

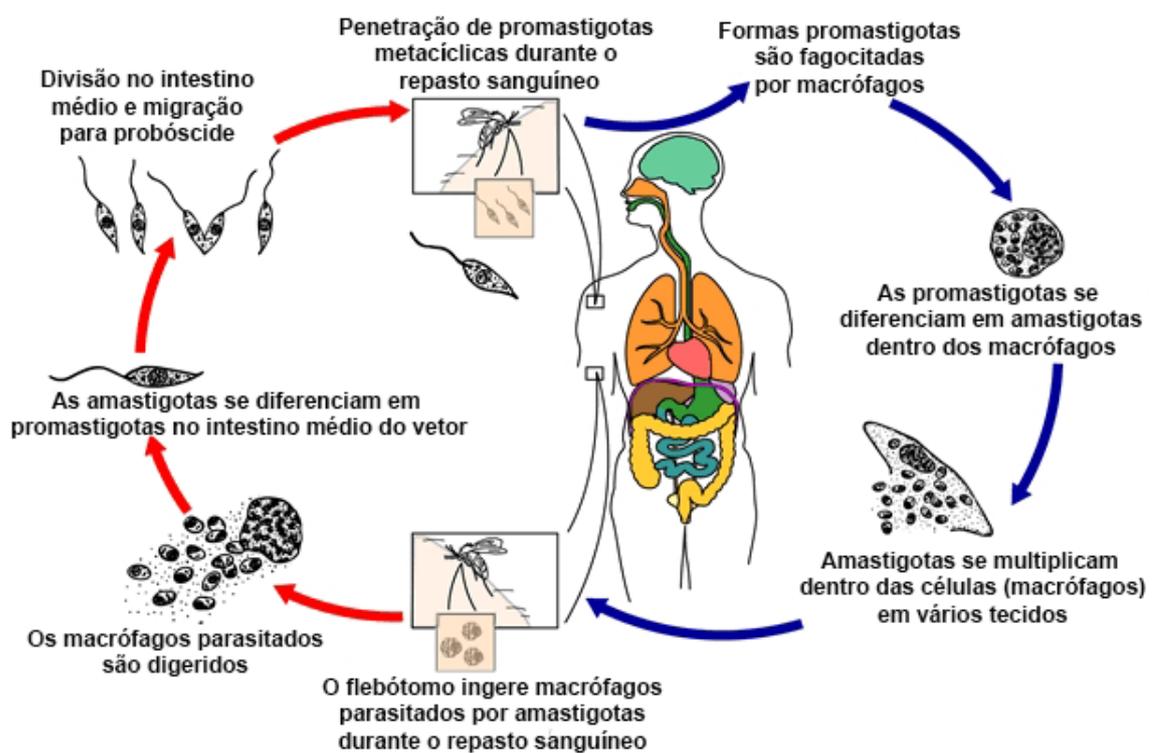


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de vida da *Leishmania sp.* no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Adaptado de (<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>).

1.3. Organização estrutural

Protozoários tripanossomatídeos, como as leishmanias, apresentam estruturas comuns às demais células eucariotas como retículo endoplasmático rugoso e liso, aparato de Golgi, mitocôndria e microtúbulos. No entanto, apesar destes aspectos comuns, estes protozoários apresentam sutis diferenças que podem ser exploradas como possíveis alvos terapêuticos. Os tripanossomatídeos possuem também outras organelas que lhe são peculiares como os glicossomas, megassomos, acidocalcissomos. Estudos mostram que nessas organelas existem vias metabólicas únicas e vitais para a interação parasito-hospedeiro e que podem ser utilizadas como alvos terapêuticos (DE SOUZA, 2008). Da Silva e colaboradores (2012) demonstraram que a compartimentalização adequada da arginase no glicossoma da *Leishmania amazonensis* é importante para a atividade e para possibilitar que o parasita infecte o hospedeiro. Outro exemplo são os microtúbulos, pois nestes parasitos estas estruturas estão organizadas logo abaixo da membrana celular formando um arcabouço que se associa a membrana plasmática sendo denominado de microtúbulos subpeliculares. Desta forma, diversos fármacos com atividade antitumorais, antifúngicos e anti-helmínticos que interferem com a dinâmica dos microtúbulos poderiam ser testados quanto a sua eficácia contra os microtúbulos das *Leishmanias* (revisado por JAYANARAYAN e DEY, 2002). A Figura 4 mostra as principais estruturas das formas adaptativas amastigotas e promastigotas da *L. (L.) amazonensis*.

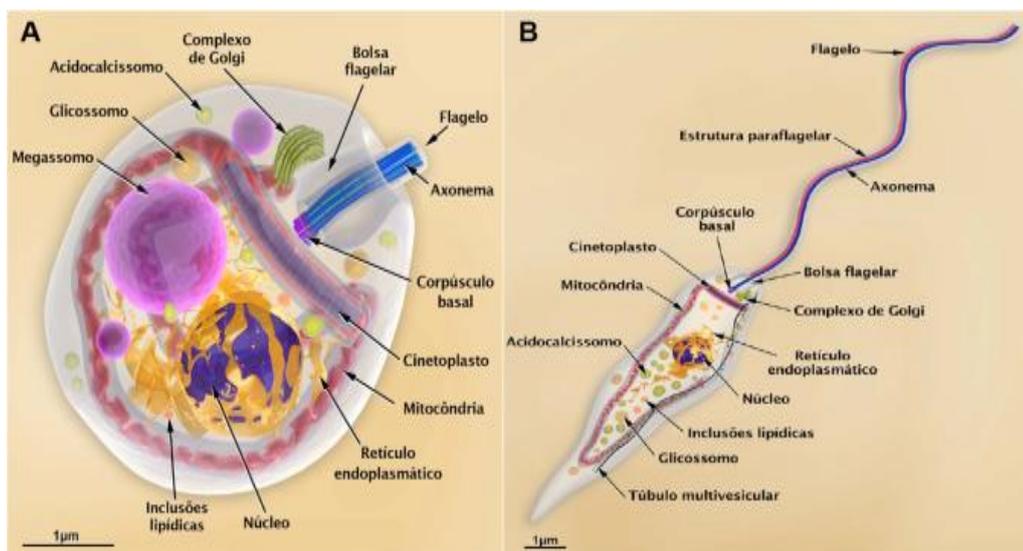


Figura 4. Representação tridimensional das formas adaptativas de *L. (L.) amazonensis* mostrando as principais organelas celulares. Amastigota (A) e promastigota (B). (Adaptado de TEXEIRA *et al.*, 2013).

1.3.1. Membrana Plasmática

A superfície de membrana dos protozoários da ordem Kinetoplastida é dividida em três subdomínios estruturalmente e funcionalmente distintos: a membrana flagelar, a bolsa flagelar e a membrana plasmática do corpo celular. Estas membranas são fisicamente contíguas, e em conjunto, constituem a superfície da membrana plasmática do parasita. Cada domínio possui uma membrana especializada com funções diferentes e com composição proteica e lipídica variada. A membrana flagelar tem a função de recobrir os microtúbulos do axonema. A membrana que envolve a bolsa flagelar, entretanto, não está associada ao citoesqueleto, formando assim, o principal sítio de trocas com o meio externo do parasito, sendo responsável pela absorção de nutrientes e secreção de proteínas. A membrana plasmática que envolve o corpo da célula está associada aos microtúbulos subpeliculares e nas espécies de leishmania é encontrado abundantemente um complexo lipofosfoliglicano (LPG) e uma metaloprotease, a gp63, que são moléculas importantes para a interação parasito-hospedeiro (LANDFEAR e IGNATUSHCHENKO, 2001; OLIVIER *et al.*, 2012).

1.3.2. O Citoesqueleto

Os tripanossomatídeos possuem parte do citoesqueleto localizado geralmente sob a membrana plasmática, representados pelos microtúbulos subpeliculares, e participa de atividades celulares essenciais, tais como: (1) a manutenção e determinação da forma celular entre as diferentes fases do ciclo biológico; (2) o processo de divisão celular e (3) na motilidade celular (KOHL e GULL, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2014).

Os microtúbulos são os principais constituintes do citoesqueleto em leishmania e são classificados em três classes: flagelar, envolvidos no processo de locomoção; mitótico, relacionados com a divisão celular e subpelicular, que auxilia na divisão celular e na modulação da forma celular (GADELHA *et al.*, 2013; revisado por JAYANARAYAN e DEY, 2002).

A actina é uma proteína do citoesqueleto abundante em células eucarióticas e exerce importante papel em diversos processos celulares como na motilidade celular, contratilidade, morfologia celular e no processo de fagocitose. Nas espécies de Leishmania, a actina está amplamente distribuída, sendo encontrada no flagelo, bolsa flagelar, núcleo, cinetoplasto e ainda associada aos microtúbulos subpeliculares (HATAM *et al.*, 2013; SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004).

1.3.3. O Flagelo

O citoesqueleto flagelar das formas promastigotas de *Leishmania* emerge da bolsa flagelar, e consiste de um axonema clássico, que é organizado a partir do conjunto de nove pares de microtúbulos externos e um par central, apresentando uma estrutura filamentosa denominada de haste paraflagelar (PFR), que está associada a ancoragem do axonema ao corpo da célula (Figura 5). Em contraste com as promastigotas, que possuem um longo e móvel flagelo, a forma amastigota de leishmania exibe um curto flagelo sem PFR que se limita ao domínio da bolsa flagelar (GADELHA *et al.*, 2013). O flagelo é uma organela multifuncional, pois promove motilidade ao parasita, está envolvido na fixação do parasita ao intestino do vetor e apresenta função sensorial (LANDFEAR e IGNATUSHCHENKO, 2001; ROTUREAU *et al.*, 2009).

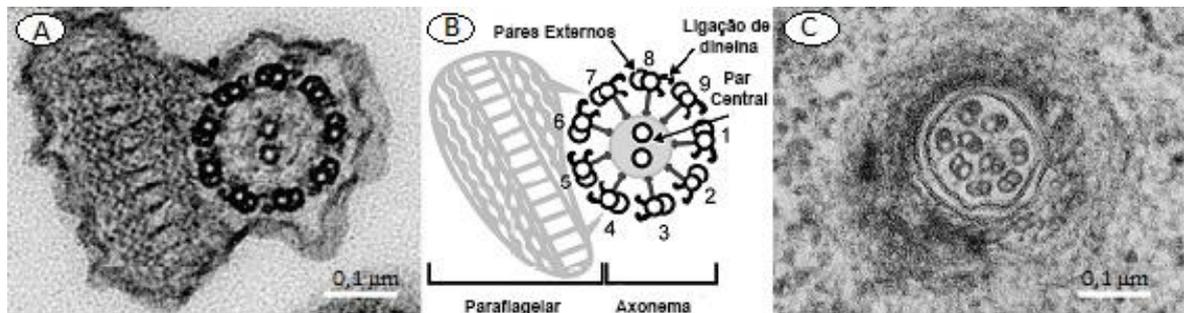


Figura 5. Estrutura do flagelo de *Leishmania* sp. em promastigotas e amastigotas. (A) Axonema de promastigotas. (B) Desenho esquemático do axonema de promastigotas. (C) Axonema de amastigotas. Adaptado de GLUENZ *et al.*, 2010.

1.3.4. Mitocôndria e Cinetoplasto

Os protozoários tripanossomatídeos, dentre os quais se incluem os gêneros patogênicos para o homem *Trypanosoma* e *Leishmania*, possuem uma única mitocôndria (FIDALGO e GILLE, 2011). A mitocôndria, no que diz respeito à densidade de sua matriz, bem como a forma e número de cristas, é bastante diversa em comparação aos demais organismos eucarióticos, principalmente em relação aos organismos multicelulares. Geralmente a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática percorrendo todo o corpo do parasita abaixo dos microtúbulos subpeliculares (DE SOUZA, ATTIAS e RODRIGUES, 2009; HATAM *et al.*, 2013).

A mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida, possui uma região especializada denominada cinetoplasto, que resulta da denominação da ordem. Geralmente, o

cinetoplasto é encontrado próximo ao corpúsculo basal que está localizado na base do flagelo, porém não relacionado à motilidade. O cinetoplasto consiste em uma estrutura condensada em forma de disco composto de uma rede de milhares de DNA circulares topologicamente interligados formando o DNA mitocondrial (kDNA). A rede contém dois tipos de moléculas de DNA: os maxicírculos presentes em algumas cópias (20 a 50) e os minicírculos representados por milhares de cópias (5.000-10.000) (DEGRAVE *et al.*, 1994; PEREIRA e BRANDÃO, 2013).

O bom funcionamento desta estrutura é de extrema importância para a sobrevivência dos parasitas (MEHTA e SHAHA, 2004). Quando o parasito é submetido a estresse que acarreta danos mitocondriais, ocorre a sua morte por apoptose. Alguns estudos demonstraram que a ação de várias substâncias sobre a mitocôndria destes protozoários pode induzir a sua morte por apoptose (FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2013).

1.3.5. Núcleo

O núcleo é bem delimitado, possui um cariossomo central ou excêntrico, a cromatina apresenta distribuição variável e possui um nucléolo. A membrana nuclear possui poros nucleares, sendo que a membrana externa apresenta continuidade com a membrana do retículo endoplasmático conforme encontrado nas demais células eucarióticas. O núcleo apresenta forma variável. Nas formas amastigotas é grande e arredondado, ocupando cerca de um terço do corpo do parasito. Nas formas flageladas, promastigotas, o núcleo é arredondado ou oval, e está situado na região mediana ou ligeiramente na porção anterior do corpo (MICHALICK e RIBEIRO, 2011).

1.3.6. Aparato de Golgi

O Aparato de Golgi está localizado próximo à bolsa flagelar, é formado por um sistema de 3 a 10 cisternas e vesículas na porção trans. O aparato de Golgi está envolvido com a glicosilação e sulfatação de proteínas, estando relacionado com o tráfego de vesículas e biogênese de lisossomos (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

1.3.7. Retículo endoplasmático (regiões lisas e rugosas)

É encontrado nos vários estágios do desenvolvimento da *Leishmania* e está presente por todo o corpo celular e, muitas vezes, está concentrado na região periférica próximo ao microtúbulos subpeliculares e a mitocôndria. As regiões lisas e rugosas do retículo endoplasmático estão envolvidas na síntese de lipídeos e proteínas, respectivamente, em conformidade com as demais células eucarióticas (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

1.3.8. Glicossomos

Os glicossomos são um tipo especial de peroxissomo, possuem formato esférico, com diâmetro de aproximadamente 0,7 μm , apresentam uma matriz homogênea densa, sendo encontrados aleatoriamente por todo o corpo celular. Possuem em seu interior a maior parte das enzimas da via glicolítica, e uma variedade de enzimas envolvidas em diferentes processos celulares, como o metabolismo de peróxidos, β -oxidação de ácidos graxos, gliconeogênese, biossíntese de lipídeos (fosfolipídeos e esteróis), biossíntese de pirimidina, síntese de aminoácidos, dentre outras. A forma amastigota parece conter um número maior de enzimas, o que indica variação no metabolismo celular entre as formas adaptativas (COLASANTE *et al.*, 2013; revisado por OPPERDOES e COOMBS, 2007).

1.3.9. Megassomos

Os megassomos são grandes estruturas que variam em forma e tamanho, podendo alcançar o diâmetro do núcleo da célula. Possuem no seu interior fosfatase ácida e cisteína-proteinase correspondendo a um lisossomo típico. Sua matriz não é homogênea, podendo apresentar perfis de membrana, inclusões eletrondensas e vesículas. São encontrados na forma amastigota de algumas espécies do gênero *Leishmania*, sendo o destino final de todas as macromoléculas capturadas no meio extracelular através dos processos endocíticos do parasito. Já nas formas promastigotas, possuem pequenas vesículas eletrólucidas que acumulam cisteína protease, consideradas precursoras dos megassomos (DE SOUZA, 2002; DE SOUZA *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

1.3.10. Acidocalcissomos

Os acidocalcissomos são estruturas levemente alongadas com diâmetro médio de 600 nm, sendo distribuídos por toda a célula. São organelas ácidas, ricas em cálcio e polifosfatos, por possuírem canais e bombas de íons. A estas organelas é atribuída a função de manutenção do equilíbrio de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco e ferro, além delas também participarem do controle do pH e osmorregulação, juntamente com o vacúolo contrátil. A quantidade e o diâmetro de acidocalcissomos variam de acordo com as espécies de leishmanias e com as diferentes etapas de sua metaciclo genese (CORRÊA *et al.*, 2007; DOCAMPO *et al.*, 2005; MORENO e DOCAMPO, 2009).

1.4. Leishmania GFP

A clonagem do gene GFP (*Green Fluorescent Protein*, do inglês) em 1991 da água-viva *Aequorea victoria* desencadeou várias aplicações para GFP na área de Biologia e Medicina. A proteína GFP é constituída de 238 aminoácidos e é intrinsecamente fluorescente, isto é, não necessita de substrato ou cofatores (CHALFIE *et al.*, 1994) para emissão de luz. Quando expressa em células procarióticas ou eucarióticas, produz uma fluorescência verde após a excitação das células por luz azul ou UV (MISTELI e SPECTOR, 1997). A GFP possui várias propriedades favoráveis a seu uso como gene repórter (confere marcação específica às células), incluindo localização citoplasmática, baixa toxicidade e fácil visualização e quantificação (CHALFIE *et al.*, 1994; CHALFIE, 1995).

O gene repórter GFP tornou-se uma ferramenta promissora e amplamente utilizada para triagem de drogas em vários modelos, devido sua alta sensibilidade, especificidade e flexibilidade. Na avaliação de compostos com potencial atividade leishmanicida é de extrema importância a homogeneidade e estabilidade das cepas transfectadas com GFP, as quais quando acopladas à citometria de fluxo ou microscopia de fluorescência, fornecem resultados mais sensíveis, específicos e rápidos do que os ensaios convencionais (PULIDO *et al.*, 2012). A expressão de GFP pode facilitar o monitoramento do destino e do número de amastigotas em infecções em macrófagos ou em modelos animais (HA *et al.*, 1996).

A expressão de GFP tem sido amplamente utilizada para a geração de um grande número de espécies de leishmania como no caso de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* (HA *et al.*, 1996); *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* (KAMAU *et al.*, 2001; SINGH e DUBE, 2004); *L. (L.) amazonensis* (CHAN *et al.*, 2003; OKUNO *et al.*, 2003); *L. (L.) mexicana*, *L. (L.)*

aethiopica, *L. (L.) tropica* e *L. (L.) major* (PATEL *et al.*, 2014). Neste trabalho foi utilizado a cepa *L.(L.) amazonensis* GFP.

1.5. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a leishmaniose

1.5.1. Aspectos gerais

As leishmanioses são um grupo de doenças tropicais negligenciadas causadas por parasitas do gênero *Leishmania* e que podem ser classificadas em três formas clínicas principais: (1) cutânea, (2) mucocutânea e (3) visceral (ALVAR *et al.*, 2012; DAVID e CRAFT, 2009). Classicamente, de acordo com critérios geográficos, as leishmanioses foram divididas em leishmanioses do Velho Mundo, que abrange a Europa, África e Ásia; as leishmanioses do Novo Mundo, que correspondem a América e Oceania (MASMOUDI *et al.*, 2013). No novo mundo, coletivamente, as leishmanioses cutânea e mucocutânea são referidas como Leishmaniose Tegumentar (GOTO e LINDOSO, 2010).

Em humanos a leishmaniose é a segunda doença mais importante transmitida por protozoário, atrás unicamente da malária (DAVIDSON, 2005). Sendo endêmica em 98 países, a leishmaniose representa um importante problema de saúde pública, principalmente nos países das Américas do Sul e Central, África e Ásia (ALVAR *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). Atualmente, a estimativa é de 1,3 milhões de novos casos com letalidade entre 20.000 a 30.000 pessoas por ano. Deste total mundial, cerca de 0,2 a 0,4 milhão dos novos casos são de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,3 milhão são de leishmaniose tegumentar americana (WHO, 2014).

1.5.2. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e suas formas clínicas

No Brasil a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece maior atenção, devido ao risco de ocorrência de deformidades que podem ser produzidas nos seres humanos. Tais agravos apresentam um grande impacto psicológico nos doentes principalmente devido à exclusão social que acabam por gerar. Esta complexa situação tem amplos reflexos nos campos social e econômico da vida dos indivíduos doentes, uma vez que na maioria dos casos a leishmaniose está relacionada com atividade ocupacional destas pessoas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A leishmaniose cutânea pode ser caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas (até 20 lesões) confinadas na derme e com a epiderme ulcerada (Figura 6). A densidade de parasitos nas bordas da úlcera formada é grande nas fases iniciais da infecção,

com tendência à escassez nas úlceras crônicas. Além das úlceras típicas, podem evoluir para formas vegetantes verrucosas ou framboesiformes. No Brasil, as espécies que têm sido encontradas parasitando humanos são: *L. (V.) braziliensis*, que provoca lesões conhecidas por úlcera de Bauru, ferida brava, ferida seca e bouba; *L. (V.) guyanensis*, que causa lesões cutâneas conhecidas por *pian bois*, úlcera única do tipo “cratera de lua” e metástases; *L. (L.) amazonensis*, que pode causar tanto as lesões ulceradas simples e limitadas, com muitos parasitos nas bordas da lesão, como também a forma da doença conhecida como cutânea difusa (DESJEUX, 2004) e a *L.(V.) laisoni* que produz úlcera cutânea única (REIS e CONTIJO, 2011).



Figura 6. Diferentes formas clínicas da leishmaniose. (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose cutânea difusa. (C) Leishmaniose cutânea disseminada. (D) Leishmaniose cutaneomucosa. Fotos de J. Costa, CPqGM/FIOCRUZ, Bahia, retiradas de TEXEIRA *et al.*, 2013.

Na região da lesão provocada pela *L. (L.) amazonensis*, os macrófagos encontrados estão intensamente parasitados, abrigando um grande número de formas amastigotas no interior dos fagolisossomas. As lesões geralmente não apresentam cura espontânea, sendo necessário o tratamento quimioterápico. A ocorrência de recidivas é comum e a resposta imune do paciente frente ao parasita não é eficaz para o controle da infecção (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; PRINA *et al.*, 1993). Curiosamente, Abreu-Silva *et al.* (2004) demonstraram que camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* apresentaram

alterações patológicas similares as encontradas na leishmaniose visceral causada por *L. (L.) infantum*.

A doença causada pela espécie *L. (L.) amazonensis* é normalmente uma zoonose na qual os vetores e reservatórios são silvestres. Embora a infecção humana por esta espécie de parasita não seja considerada frequente, a mesma tem sido identificada no Brasil nas regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste (NEGRÃO, 2013). Dorval *et al.* (2006) relataram casos autóctones de LTA associados com a infecção por *L. (L.) amazonensis* no município de Bela Vista, Mato Grosso do Sul. Sendo também encontrada na Bolívia, Peru, Equador, El Salvador, Colômbia, Venezuela, Panamá e Guiana Francesa (NEGRÃO, 2013; WEIGLE; SARAIVA, 1996).

O principal inseto vetor da *L. (L.) amazonensis* é o *Lutzomyia flaviscutellata*, sendo encontrado em matas úmidas nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Para, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo. Outros flebotomíneos vetores são *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Estas espécies possuem atividade noturna, o que justifica uma menor frequência de infecção humana, sendo restrita a caçadores e pescadores que se expõem na floresta à noite. Os igapós, capoeiras e várzeas são locais favoráveis para que ocorra a infecção, desde que haja mamíferos reservatórios suficientes e a presença de vetores (REIS; GONTIJO, 2011). Os principais reservatórios de *L. (L.) amazonensis* são os roedores: *Proechimys guyannensis* e *Oryzomys capito*; *Neacomys*, *Nectomyse* e *Dasyprocta*, os marsupiais *Marmosa*, *Metachirus*, *Didelphis Philander*, e a raposa *Cerdocyon thous* (LAINSON, 2010; REIS e GONTIJO, 2011).

a) Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

Nesta forma clínica ocorre o desenvolvimento de uma lesão cutânea indolor, de formato arredondado, tamanho variado (milímetros a centímetros), podendo ser ulcerosa ou não e geralmente são encontradas em regiões corporais expostas (Figura 6A). As lesões são de fundo granuloso e avermelhado e bordas elevadas, que podem ainda apresentar infecções secundárias. (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

b) Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

É uma forma clínica rara, porém grave e inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e sua evolução é lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas contendo grande número de amastigotas (Figura 6B). A LCD no

Brasil é causada pela *L. (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A LCD ocorre em pacientes com deficiência imunológica, em que a resposta imune celular está deprimida com relação a antígenos de *Leishmania*, resultando em um estado de anergia imunológica frente à infecção estabelecida. A doença caracteriza-se por curso crônico e progressivo por toda a vida do paciente, não respondendo aos tratamentos convencionais (REIS e GONTIJO, 2011).

c) Leishmaniose Cutânea disseminada

A forma disseminada da LTA foi descrita em 1986, e é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem vários segmentos corporais, envolvendo com frequência a face e o tronco (Figura 6C). Inicia-se com uma ou várias lesões localizadas com as características clássicas de úlcera de fundo granuloso e bordas elevadas, seguida da disseminação do parasito provavelmente por via hemática ou via linfática, que se estabelece em poucos dias, causando lesões disseminadas, sendo que, pode resultar em várias lesões. O indivíduo infectado pode apresentar acometimento mucoso concomitante e manifestações sistêmicas como febre, mal-estar geral, dores musculares, emagrecimento, anorexia, entre outros. A resposta ao tratamento apresenta resultados satisfatórios, embora a maioria dos pacientes requeira uma ou mais series adicionais de tratamento para alcançar a cura clínica. Esta forma rara de apresentação da leishmaniose cutânea foi descrita em pacientes com HIV (AIDS). As duas espécies reconhecidas como causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

d) Leishmaniose Cutaneomucosa (LCM)

A forma clássica de LCM é secundária à lesão cutânea, com início insidioso e pouca sintomatologia, resultando em lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosa e cartilagens (Figura 6 D). Acredita-se que a forma mucosa da leishmaniose possa ser causada pela migração das leishmanias ou seus antígenos da região de penetração na pele para as mucosas nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe, traqueia e mais raramente, pode atingir as conjuntivas oculares, ânus e mucosas de órgãos genitais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). As graves mutilações produzidas por este tipo de lesão nos pacientes geram dificuldades para respirar, falar e se alimentar. Pode ainda ocorrer complicações respiratórias por infecções secundárias, o que se não tratado adequadamente poderá levar o paciente ao óbito (REIS e

CONTIJO, 2011). A LCM acomete com mais frequência pessoas do sexo masculino e faixas etárias usualmente mais altas do que a LC. O agente etiológico causador da LMC, no Brasil é a *L.(V.) braziliensis*, entretanto já foram descritos casos na literatura atribuídos a *L. (L.) amazonensis* e alguns raros casos relatados na região da Amazônia de lesões cutaneomucosa causada por *L.(V.) guyanensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.6. Aspectos epidemiológicos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2014), nos últimos 5 anos, cerca de 1,0 milhão de casos de LTA foram informados. Aproximadamente 220 mil casos de LTA são reportados oficialmente a cada ano. No entanto, estima-se que apenas cerca de dois terços dos países realmente notificam os dados de incidência, sendo que os dados mais dispersos encontram-se na África, principalmente devido às subnotificações (ALVAR *et al.*, 2012).

A LTA é a forma da doença mais amplamente distribuída, para a qual cerca de um terço dos casos ocorrem em três regiões: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental (Figura 7). Os dez países com o maior número de casos são o Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru. Juntos estes países representam de 70 a 90% da incidência global estimada da LTA (ALVAR *et al.*, 2013; STOCKDALE e NEWTON, 2013). As infecções humanas são encontradas também em 16 países da Europa incluindo a França, Itália, Grécia, Espanha e Portugal (WHO, 2010).

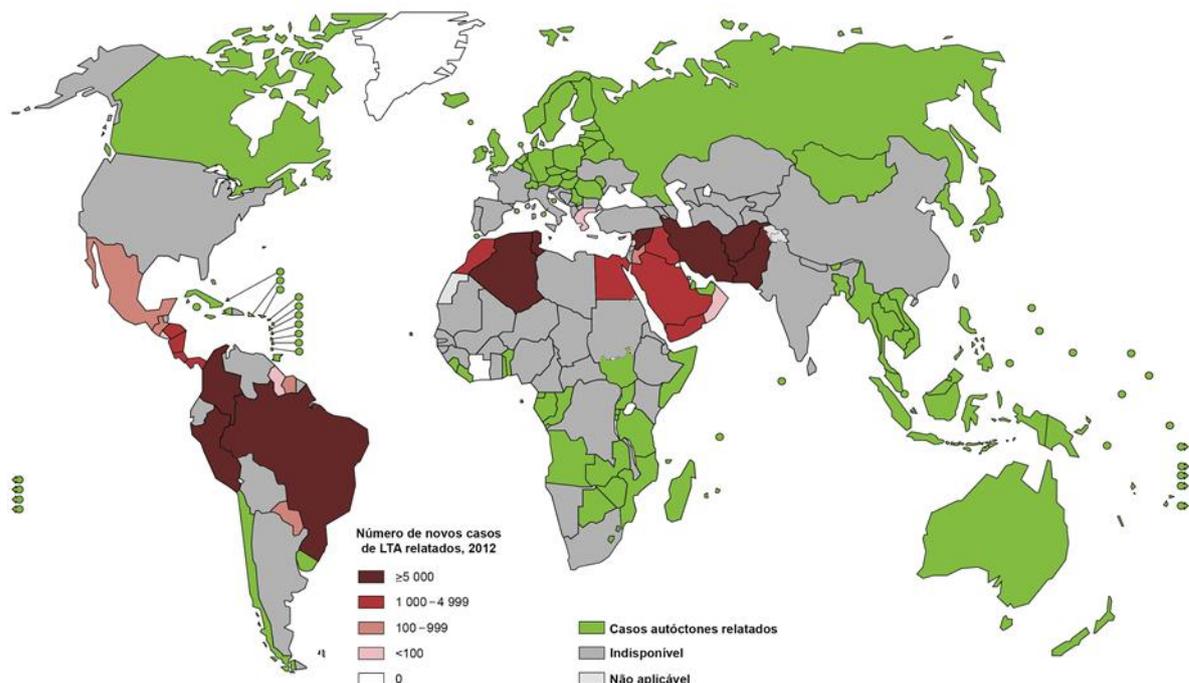


Figura 7. Status endêmico da leishmaniose tegumentar americana publicado em 2012. (Adaptado WHO)

Estima-se que 0,7 a 1,3 milhão de novos casos de leishmaniose tegumentar americana ocorram anualmente em todo o mundo. Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã e República Árabe da Síria, juntos, são responsáveis por dois terços dos novos casos de LTA em todo o globo (WHO, 2014).

No Brasil, a LTA apresenta ampla distribuição com casos autóctones em todas as regiões geográficas brasileiras (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; NEGRÃO 2013). No Brasil, de 2001 a 2010, ocorreram 180.140 casos confirmadamente autóctones de LTA, com média anual de 18.000 casos em território nacional. Sendo que, destes casos registrados em território nacional a região Norte é responsável por 35,60%; região Nordeste 22,94%, região Centro Oeste e no Distrito Federal por 16,31%; região Sudeste 9,17% e região Sul, 1,95% (NEGRÃO, 2013).

No período de 2007 a 2012 foram registrados no Brasil 138.603 casos de leishmaniose tegumentar (Figura 8) sendo que cerca de 40% dos casos foram registrados só na região Norte. No período analisado, aproximadamente 40% dos casos ocorreram na faixa etária de 20-39 anos, e em relação ao gênero, aproximadamente 70% dos casos foram encontrados no sexo masculino. Em 2012 foram registrados 24.539 casos de LTA, demonstrando que o número de casos aumentou em comparação a anos anteriores (SINAN/SVS/MS, 2014).

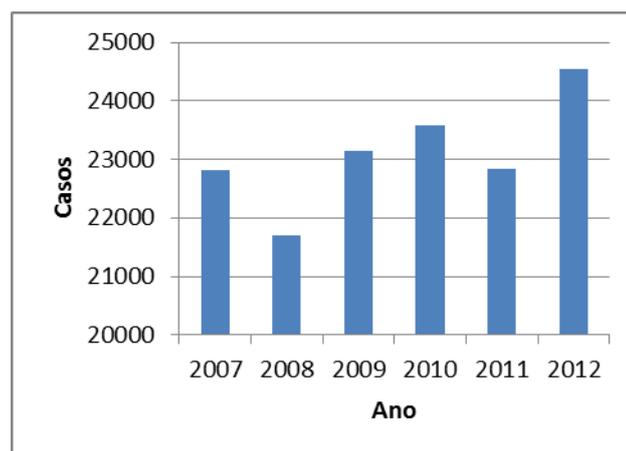


Figura 8. Incidência da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil por ano (2007-2012). Fonte: SINAN/SVS/MS, 2014. Dados organizados pela autora Núbia Maria Pereira de Sousa.

No Distrito Federal, 186 casos de LTA foram registrados no período de 2010 a 2012, sendo que 22 casos foram autóctones do DF, conforme visto na Tabela 1 (Informativo

Epidemiológico das Leishmanioses no DF, 2013). Dados parciais referentes a 2013 mostram que seis casos de LTA foram registrados no DF, dos quais três (50%) foram autóctones do DF. As populações mais expostas à LTA no DF estão concentradas em áreas rurais e de expansões urbanas, que apesar de bem urbanizadas, possuem vegetação, quintais extensos, com canil e, às vezes, galinheiro, o que favorece a presença de hospedeiros naturais e vetores da leishmania na área peridomicílio (Boletim anual GDF, 2013).

Tabela 1. Série histórica de casos de LTA confirmados no DF no período de 2010 a 2012. (Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF, 2013).

Ano	Confirmados	Autóctones	Importados	Ignorados
2010	88	12	62	14
2011	47	5	40	2
2012	51	5	43	3

1.7. O Tratamento das leishmanioses

1.7.1. Antimoniais pentavalentes

No Brasil os compostos antimoniais sob a forma de sais trivalentes (antimônio trivalente – Sb^{III}), chamado tártaro emético (tartarato de potássio e antimônio) foram utilizados na clínica médica pela primeira vez no tratamento da leishmaniose tegumentar em 1912 pelo médico brasileiro Gaspar Vianna (RATH *et al.*, 2003). Para a leishmaniose visceral, os derivados de Sb^{III} só foram utilizados em 1915 na Itália e Índia (MURRAY *et al.*, 2005). Após a década de 40, o uso clínico do Sb^{III} foi interrompido por causa dos efeitos adversos, e pela descoberta de compostos menos tóxicos como os complexos de antimônio pentavalente Sb^V (BERMAN, 2003).

Os sais de antimônio pentavalente (Figura 9) são os medicamentos de primeira escolha, em virtude de sua comprovada eficácia terapêutica no tratamento de todas as formas clínicas de leishmaniose. O tratamento baseia-se principalmente no uso endovenoso ou intramuscular do Antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) no Novo Mundo e Estibogluconato de sódio (Pentostan®) no Velho Mundo e países de língua inglesa (HEPBURN, 2003, revisado por MICHELETTI e BEATRIZ, 2012). No Brasil o antimoniato-*N*-metil glucamina é fornecido gratuitamente para o tratamento dos doentes pelo Ministério da Saúde. O protocolo específico de tratamento varia dependendo das condições clínicas associadas a cada caso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Visando padronizar o esquema

terapêutico, a Organização Mundial da Saúde recomenda que a dose do antimonial pentavalente seja calculada em $\text{mg Sb}^{\text{V}}/\text{Kg}/\text{dia}$.

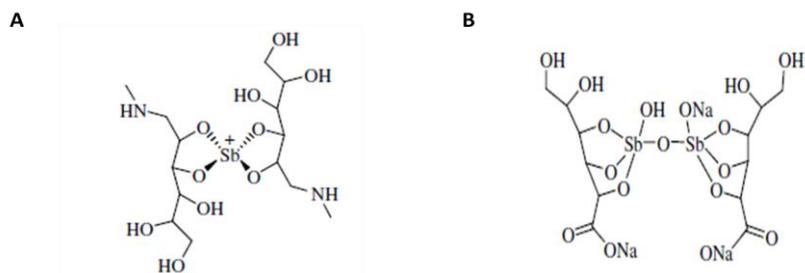


Figura 9. Fórmula estrutural dos antimonias pentavalentes. *N*-metil glucamina (A) e Estibogluconato de sódio (B). (FREZARD *et al.*, 2008)

A farmacocinética de antimonias pentavalentes indica que quando administrado intravenosamente cerca de 80% é eliminado entre 6-8 h. Por outro lado, quando administrados via intramuscular sua cinética pode ser dividida em três fases, sendo a fase inicial de absorção com meia vida de 0,85 h, seguida por uma fase de eliminação rápida com meia vida de 2,02 h e finalmente, uma fase de eliminação mais lenta com meia vida de cerca de 76 h (GIL *et al.*, 2007). A fase terminal lenta pode ser resultado da conversão *in vivo* do Sb^{V} para Sb^{III} , a qual pode contribuir ao mesmo tempo para a maior toxicidade e para a ação eficaz da droga (DAVIDSON, 1998). Até o momento, não existe conduta terapêutica ideal para as leishmanioses, contudo os antimonias têm representado a base principal de tratamento nas últimas décadas, apresentando-se como a melhor opção terapêutica (NAME *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação dos antimonias pentavalentes ainda não está bem esclarecido. Muitos estudos mostram que seus mecanismos de ação parecem envolver diversos aspectos metabólicos do parasito. Berman e colaboradores (1985) demonstraram que antimonias pentavalentes inibem a enzima fosfofrutoquinase, envolvida na síntese de nucleotídeos trifosfatados. Por outro lado também foi demonstrado que Sb^{V} forma complexos com ribonucleosídeos, e que essa interação poderia ter implicações no mecanismo de ação dos antimonias (DEMICHELI *et al.*, 2002). Chakraborty e Majumder (1988) evidenciaram que o estibogluconato de sódio é capaz de inibir a enzima topoisomerase II purificada de *L. (L.) donovani*. Foi demonstrado por Lucumi *et al.* (1998) que o tratamento de promastigotas de *L. (L.) panamensis* com antimonias pentavalentes é capaz de estabilizar complexos DNA-proteína o que está de acordo com a inibição da topoisomerase I. Ainda sugere-se que o antimoniato de meglumina seja uma pró-fármaco, convertida no interior do macrófago em

Sb^{III}, composto tóxico para as formas amastigotas de *Leishmania* spp (ROBERTS *et al.*, 1995). Sereno e Lemestre (1997) demonstraram que o Sb^{III} foi substancialmente mais potente que o Sb^V para ambas as formas promastigotas e amastigotas axênicas, de três espécies de *Leishmania*, corroborando com a hipótese da conversão metabólica *in vivo* do Sb^V para Sb^{III}. Miekeley e colaboradores (2002) estudaram a biotransformação após administração intramuscular de *N*-metil glucamina em pacientes com leishmaniose. Eles observaram que inicialmente havia a presença de Sb^V na urina e plasma dos pacientes tratados. Já a quantidade de Sb^{III} aumentou especialmente na fase de eliminação lenta da droga, sugerindo uma bioedução da forma pentavalente para trivalente mais tóxica. Este achado apoia a hipótese de que a forma Sb^{III} pode ser a responsável pela toxicidade deste a longo prazo e pela sua ação terapêutica.

Além desses mecanismos, foi mostrado que o composto trivalente parece interferir no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e na glicólise do parasito levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelular (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; RATH *et al.*, 2003). Existe na forma amastigota uma metaloprotease zinco dependente, que poderia ser inativada se o antimônio substituísse o zinco nesta enzima, a qual por sua vez, é essencial para o desenvolvimento do parasito (BANGS *et al.*, 2001). Outras enzimas do parasito, nomeadas redutase tiol dependente (TDR1) e arsenato redutase (ACR2), mostraram-se capazes de converter Sb^V a Sb^{III} dentro da célula, sugerindo a possível participação de enzimas do parasito nesse processo (DENTON *et al.*, 2004). Há ainda evidências de que antimoniais poderiam agir desencadeando apoptose (SERENO *et al.*, 2001)

Vale ressaltar que algumas particularidades na composição química dos antimoniais pentavalentes podem contribuir para seus efeitos farmacológicos. Por exemplo, os carboidratos, como o ácido glicônico, presentes nos antimoniais pentavalentes, são capazes de formar complexos solúveis em água com o antimônio, o que pode facilitar a distribuição da droga nos macrófagos do hospedeiro (ROBERTS *et al.*, 1995).

Dentre os efeitos adversos que podem ocorrer com o uso dos antimoniais destacam-se: dor no local da injeção (GASSER *et al.*, 1994), artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, adinamia, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema, insuficiência renal aguda (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), pancitopenia (MASMOUDI *et al.*, 2005), elevações das transaminases hepáticas, polineuropatia reversível, anemia hemolítica, choque e morte súbita (MARGARET *et al.*, 2012).

Os efeitos adversos observados com o uso da anfotericina B são a febre, náuseas, vômitos, hipotassemia, flebite no local da infusão, anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), dor muscular, tremor, calafrios, reações anafiláticas, trombocitopenia (KHAW e PANOSIAN, 1995), hipocalcemia, hipomagnesemia, anemia, insuficiência hepática e zumbido (RANG *et al.*; 2011).

Anfotericina B lipossômica (AmBisome®), complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet®) e dispersão coloidal de anfotericina B (Amphocil®) são formulações novas, consideradas de custos mais elevados, no entanto, mais efetivas, e que apresentam baixa toxicidade renal, sendo mais seguras que a anfotericina B convencional (LIMA e SOUZA, 2005).

No Brasil a anfotericina B está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no tratamento da leishmaniose visceral. Entretanto, não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar, sendo então considerada uma droga “*off label*”, ou seja, uso não aprovado, que não consta na bula do medicamento. A anfotericina B é considerada como fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose em gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.7.3. Pentamidinas

As pentamidinas (Figura 11) são diamidinas aromáticas que vem sendo utilizadas como drogas de segunda escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas. Esse fármaco é indicada para os casos não responsivos aos antimoniais, embora, também leve a efeitos adversos significativos e requeira a administração parenteral (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). São comercializadas para uso humano nas seguintes formulações: Isotionato (Di-B-Hidroxietano Sulfonato) e Mesilato (Di-B-Hidroxi metil-Sulfonato) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

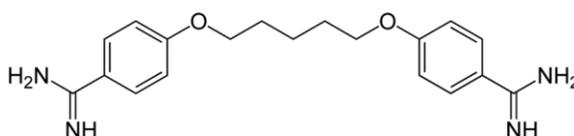


Figura 11. Fórmula estrutural da pentamidina. (BARRETT e CROFT, 2012)

O modo de ação das pentamidinas não está bem esclarecido, estudos mostram que esta molécula parece interferir com o transporte de aminoácidos, na síntese de poliaminas, podem

ligar-se ao DNA do cinetoplasto do parasito e diminuem o potencial de membrana mitocondrial (revisado por KAUR e RAJPUT, 2014; revisado por SANDS *et al.*; 1985).

As reações adversas mais frequentes com o uso da pentamidina são dor, induração, abscessos no local da aplicação, náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaleia, hipotensão, lipotimia, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), dispnéia, taquicardia, erupções cutâneas, tromboflebite, trombocitopenia, anemia, neutropenia, elevação de enzimas hepáticas e nefrotoxicidade (VÖHRINGER e ARASTÉH, 1993), toxicidade pancreática (MASMOUDI *et al.*, 2005), havendo também alguns relatos de morte súbita (RATH *et al.*, 2003). O uso de pentamidina é contraindicado em caso de gestação, *diabetes mellitus*, insuficiência renal, insuficiência hepática, doenças cardíacas e em crianças com peso inferior a 8 kg (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

1.7.4. Miltefosina

A miltefosina (Figura 12) foi originalmente desenvolvida como um agente anticâncer. Sua atividade antiprotozoária foi demonstrada na década de 80 e apresentou uma elevada atividade contra *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*. Em 2002 o fármaco foi aprovado na Índia como o primeiro tratamento ativo por via oral para a leishmaniose visceral, e vem apresentando bons resultados clínicos para a forma cutânea da doença (MARGARET *et al.*, 2012).

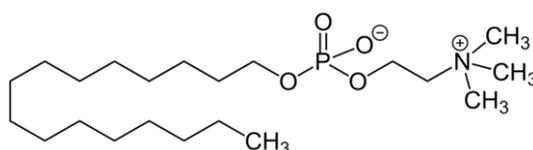


Figura 12. Fórmula estrutural da miltefosina. (BARRETT; CROFT, 2012)

A miltefosina, uma hexadecilfosfocolina, interage com a membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA. Este fármaco modula a permeabilidade e a fluidez da membrana, a composição lipídica, o metabolismo dos fosfolipídios e a propagação do sinal de transdução. Por fim, induz a morte do parasita por apoptose (SINGH; SIVAKUMAR, 2004; COSTA FILHO *et al.*, 2008).

Os efeitos adversos que podem ocorrer com o uso da miltefosina são: vômitos e diarreia, elevações dos níveis séricos de transaminase hepática e creatina. Estes efeitos são tipicamente brandos e reversíveis e se extinguem rapidamente após a interrupção do uso do fármaco (MARGARET *et al.*, 2012). Esta droga apresenta potencial efeito teratogênico, não

devendo ser administrada a mulheres grávidas ou com possibilidade de gravidez (BHATTACHARYA *et al.*, 2004).

A miltefosina (Impavido®) é bem absorvida por via oral e distribui-se por todo o corpo humano. Não existem dados de farmacocinética detalhados, com exceção de que a miltefosina apresenta um longo período de meia-vida em humanos, variando entre 150-200 h (MARGARET *et al.*, 2012). Devido a sua longa meia-vida, pode ocorrer facilmente seleção de parasitos resistentes a miltefosina, o que vem sendo relatado na Índia, país onde esta droga é extensivamente utilizada (revisado por ASHOK *et al.*, 2014).

1.7.5. Paromomicina

A paromomicina (Figura 13) é um antibiótico aminoglicosídeo, também chamado aminosidina, e é produzido pelo *Streptomyces rimosus*. Os tratamentos tópicos com pomadas ou injeções intramusculares contendo paromomicina têm sido utilizados com sucesso contra a leishmaniose cutânea ou visceral, respectivamente. Este composto apresenta atividade leishmanicida quando utilizado sozinho ou em combinação com outras drogas (FERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

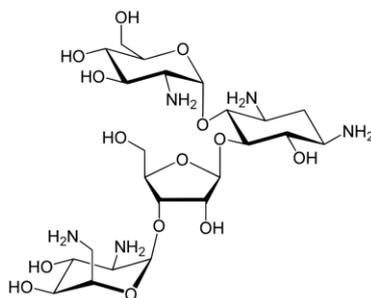


Figura 13. Fórmula estrutural da paromomicina. (BARRETT; CROFT, 2012)

A ação da paromomicina foi demonstrada em promastigotas de *L. (L.) donovani*, as quais apresentaram modificações na síntese de RNA e em lipídios polares da membrana, o que promoveu alterações na fluidez da mesma (MAAROUF *et al.*, 1997). Fernández e colaboradores (2011) demonstraram que a paromomicina inibe a síntese de proteínas nas formas promastigotas e conseqüentemente produz redução da taxa de proliferação do parasita. Apesar de bem tolerada, é potencialmente nefrotóxica e ototóxica, podendo causar surdez irreversível, além de ser contraindicada durante a gravidez (MARGARET *et al.*, 2012).

1.8. Microtúbulos como alvo quimioterápico

Os microtúbulos são polímeros proteicos que compõem o citoesqueleto e estão envolvidos em atividades essenciais para a sobrevivência das células eucariotas, tais como manutenção da forma da célula, polaridade, sinalização, transporte de vesículas e divisão celular (PEREZ, 2009). Estas proteínas são os alvos celulares de muitos fármacos anticancerígenos, antifúngicos e anti-helmínticos (revisado por JAYANARAYAN e DEY, 2002; PROTA *et al.*, 2014). A notável importância dos microtúbulos para a divisão celular fez destas estruturas um desejável alvo, contra o qual diversos compostos foram e continuam sendo desenvolvidos para uso como agentes quimioterápicos voltados para a inibição do processo de divisão rápida das células tumorais. De maneira geral os inibidores da dinâmica dos microtúbulos são classificados em dois grupos principais: (1) agentes estabilizadores de microtúbulos e (2) desestabilizadores dos microtúbulos. O primeiro grupo age impedindo a despolimerização dos microtúbulos interferindo com a sua dinâmica, necessária para a replicação celular, bloqueando, assim, o processo de divisão. Neste grupo, estão incluídos os taxanos (paclitaxel e docetaxel) e as epotilonas (como a ixabepilona). Os agentes desestabilizadores de microtúbulos, que agem inibindo a polimerização destas estruturas incluem os alcaloides da vinca (como a vimblastina, vincristina, vinorelbina), a halicondrina B e a colchicina (HUSZAR *et al.*, 2009; PEREZ, 2009; PROTA *et al.*, 2014). Devido à perturbação de vias celulares dependentes dos microtúbulos, como o transporte nos axônios, a neurotoxicidade é um efeito adverso observado em pacientes que fazem uso destes agentes antimetabólicos (CHABNER *et al.*, 2006).

A exploração dos microtúbulos como alvo antiparasitário é baseado no direcionamento seletivo do fármaco para os microtúbulos do parasito. As tubulinas dos seres humanos e parasitas têm significativas diferenças na sequência de aminoácidos primários e nas suas propriedades de polimerização. O conhecimento destas diferenças pode auxiliar no desenvolvimento de fármacos inibidores dos microtúbulos de forma mais eficaz e específica (revisado por JAYANARAYAN e DEY, 2002; PEREZ, 2009).

A griseofulvina é um fármaco antifúngico com ação sobre várias espécies de fungos dermatófilos. Esta droga inibe o processo de mitose nos fungos através de sua ligação com microtúbulos rompendo, assim, a organização do fuso mitótico. Os efeitos adversos observados com o uso de griseofulvina são alterações gastrintestinais, cefaleia, fotossensibilidade e reações alérgicas (RANG *et al.*, 2011).

Um dos principais grupos de anti-helmínticos usados clinicamente são os benzimidazóis substituídos. Este grupo de agentes de amplo espectro inclui o mebendazol, o tiabendazol e o albendazol. Considera-se que eles atuem através da inibição da polimerização da beta-tubulina helmíntica, interferindo assim nas funções dependentes dos microtúbulos. Possuem atividade inibitória seletiva, sendo 250-400 vezes mais efetivos na produção deste efeito no tecido helmíntico do que no tecido dos mamíferos. Os efeitos adversos observados são alterações gastrintestinais, cefaléia, tonturas, sonolência e reações alérgicas (RANG *et al.*, 2011).

Na tentativa de se obter novas opções terapêuticas para o tratamento da leishmaniose, muitos fármacos inibidores da dinâmica dos microtúbulos foram avaliados quanto sua possível ação leishmanicida, devido à massiva presença dos microtúbulos subpeliculares dos protozoários tripanosomatídeos. Os benzimidazóis foram investigados em relação a sua ação leishmanicida em *L. (V.) panamensis* e *L. (L.) major*, porém foram observadas pouca ou nenhuma atividade leishmanicida (KATIYAR *et al.*, 1994; TRAVI e OSORIO, 1998). Werbovetz e colaboradores (1999) realizaram a purificação de tubulina de leishmania e observaram que vimblastina possui a capacidade de se ligar à tubulina do parasito. No entanto, isto não ocorre com o uso da colchicina. Estes autores demonstraram que não ocorre ligação entre colchicina e tubulina de leishmania. Nas formas amastigotas o taxol apresentou o melhor efeito relacionado à inibição do crescimento.

A trifluralina, um herbicida, e seus análogos também apresentam a capacidade de se ligar à tubulina. Vários estudos foram realizados e demonstraram o seu efeito na diminuição no crescimento e diferenciação de diferentes espécies de parasitos, entre elas, espécies de *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum* e *Toxoplasma gondii* (CALLAHAN *et al.*, 1996; CHAN e FONG, 1994; ESTEVES *et al.*, 2010; revisado por TRAUB-CSEKO *et al.*, 2001).

1.9. Dihidropirimidinona e seus derivados

Nas últimas décadas a classe das 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas ou -tionas (também conhecidas como DHPMs) e seus derivados passaram a receber bastante atenção devido à suas diversas propriedades farmacológicas e terapêuticas, podendo se destacar suas atividades antiviral (KIM *et al.*, 2012), antifúngica (SINGH *et al.*, 2008) antibacteriana (RAJU *et al.*, 2011), anti-hipertensiva (KAPPE, 2000), antimitótica (KAAN *et al.*, 2010),

anticancerígena (RAJU *et al.*, 2011; BLASCO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2013), entre outras.

As DHPMs são normalmente sintetizadas por uma reação multicomponente (*Multicomponent Reaction* (MCR), do inglês) descoberta originalmente por Pietro Biginelli em 1891 (BIGINELLI, 1891), em que a síntese clássica compreende a reação de condensação entre um aldeído (usualmente aromático), um composto 1,3-dicarbonílico (normalmente acetoacetato de etila), ureia (ou tioureia), e um catalisador.

Mesmo produzindo DHPMs por um método simples e direto, a reação de Biginelli permaneceu inexplorada por anos (KAPPE, 1993). A demonstração das várias atividades biológicas das DHPMs e seus derivados promoveu um crescente interesse na síntese destes compostos através de modificações na reação de Biginelli (KAPPE, 2000). A partir disso, várias propostas e metodologias foram testadas, baseadas em alterações nas condições da reação, diferentes catalisadores e variações nos componentes da reação (ALVIM *et al.*, 2013; NARADAJ *et al.*, 2014,). Além da obtenção de moléculas com potencial bioativo, mantendo-se o núcleo DHPM e variando os substituintes (Figura 14), os diferentes protocolos utilizados visam a obtenção de reações mais rápidas, com melhor rendimento e menor formação de resíduos (ALVIM *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2013).

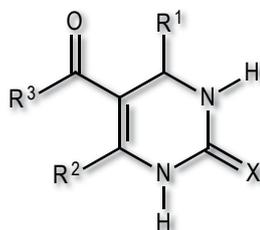


Figura 14. Fórmula estrutural do núcleo das dihidropirimidinonas. (RAMOS *et al.*, 2013)

A descoberta do Monastrol (um derivado DHPM bioativo), a primeira pequena molécula permeável à célula contendo o núcleo DHPM, aumentou significativamente o interesse por esta classe de compostos e proporcionou o desenvolvimento de diversos compostos com potencial atividade antitumoral, além da investigação de outras atividades biológicas (MAYER *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2013). Entretanto, poucos estudos foram feitos no sentido de determinação da atividade antiprotozoária das DHPMs. Chiang e colaboradores (2009) demonstraram que nove compostos derivados de DHPMs, podem inibir a replicação de *Plasmodium falciparum* em eritrócitos humanos. Finalmente, Singh e colaboradores (2009) avaliaram o efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* por via oral de um

análogo de DHPM, o 4-fluoro-fenil-6-metil-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-etil-carboxilato, e concluíram que a citotoxicidade observada contra *Leishmania donovani* é desencadeada pela morte celular programada mediada pela perda da integridade da membrana plasmática.

2. JUSTIFICATIVA

A maioria dos fármacos antiprotozoários existentes já são utilizados há várias décadas. Apesar de ter ocorrido avanços no conhecimento em relação à biologia dos parasitos, à resposta imune do hospedeiro e aos mecanismos das patologias, ainda não há agentes que apresentem resultados satisfatórios para tratar importantes infecções causadas por protozoários; como a tripanossomíase africana, a doenças de chagas e as leishmanioses. A toxicidade é um problema comum a praticamente todos os antiprotozoários mais potentes. Devido à necessidade do uso de doses cada vez mais altas em decorrência da crescente resistência dos parasitos, o uso das poucas opções terapêuticas disponíveis está em risco. Infelizmente, grande parte dessas doenças atinge populações de baixa renda em países em desenvolvimento e, portanto há pouco incentivo econômico para que a indústria farmacêutica desenvolva novos compostos antiparasitários (BEATRIZ, 2012; MARGARET *et al.*, 2012, revisado por MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; MORAN *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2013).

Há vários anos, os antimoniais pentavalentes são utilizados como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. No entanto, efeitos adversos, administração parenteral, tratamentos não responsivos, regimes de tratamento com altas doses por longos períodos e custos elevados dos esquemas de tratamento são fatores limitantes do uso desta droga. Os fármacos utilizados como segunda escolha para o tratamento da leishmaniose são a anfotericina B e a pentamidina, no entanto, estes compostos também apresentam alta toxicidade sistêmica produzindo vários efeitos adversos no paciente (CHAKRAVARTY e SUNDAR, 2010; TIUMAN *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, poucos foram os avanços obtidos para o tratamento das leishmanioses. Como terapias mais recentemente desenvolvidas temos o uso da anfotericina B em apresentação lipossomal (BERMAN *et al.*, 1998; CROFT *et al.*, 2006; MONDAL *et al.*, 2014) e o surgimento do primeiro medicamento de uso oral para o tratamento de leishmaniose, a miltefosina (MOHEBALI *et al.*, 2007; MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Neste contexto, diversos grupos em todo o mundo vêm trabalhando para o

desenvolvimento de novos compostos com propriedades leishmanicidas, seja através de síntese orgânica ou pela prospecção de novas substâncias naturais.

Além disso, o entendimento mais profundo da biologia do parasita contribui constantemente para a identificação de possíveis novos alvos terapêuticos. Este conhecimento também contribui para as inovações das terapias já existentes, com o surgimento de novas combinações e apresentações. Devido ao arsenal terapêutico restrito para o tratamento das leishmanioses e a falta de vacinas eficientes para prevenir esta doença, o desenvolvimento de novos compostos com atividade contra de forma eficiente, segura e de baixo custo é uma prioridade e de papel estratégico para o Brasil (revisado por MICHELLITI e BEATRIZ, 2012). Assim, este trabalho visou à análise da atividade do 5-etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tione (codificado neste trabalho como 4p) contra *L. (L.) amazonensis*, um composto sintetizado e caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa como um potente inibidor da dinâmica dos microtúbulos em células de mamíferos (GUIDO, 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

-Avaliar *in vitro* a ação leishmanicida do composto 4p contra formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e determinar sua atividade na infecção experimental *in vitro*.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade do composto 4p e sua influência sobre a curva de crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*;

- Obter formas amastigotas axênicas *in vitro* à partir de formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis*;

- Verificar a capacidade de diferenciação das formas amastigotas axênicas obtidas em formas promastigotas;

- Avaliar através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) as alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p;
- Avaliar a citotoxicidade do composto 4p sobre macrófagos peritoneais;
- Avaliar qualitativamente por meio da microscopia confocal de varredura a LASER e quantitativamente através da citometria de fluxo a atividade do composto 4p no pré-tratamento e no pós-tratamento de macrófagos peritoneais experimentalmente infectados com *L. (L.) amazonensis*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e equipamentos

O composto 4p usado nos ensaios foi sintetizado e cedido pelo Laboratório de Química Medicinal & Tecnológica (LaQuiMeT) da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto. Schneider's Insect Medium, M199, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA); RPMI (Roswell Park Memorial Institute), soro fetal bovino (SFB), e Sulfato de Geneticina (Geneticin®), GIBCO - Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA); Sulfato de Gentamicina (Garamicina®), Schering-Plough. MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), Molecular Probes - Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA); DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole), Invitrogen - Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). DMSO da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Meio anti-decaimento de fluorescência, ProLong Gold Antifade da Invitrogen - Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). Panótico Rápido - LB Laborclin (Paraná, BR). Centrífuga 5424R - Eppendorf (Hamburg, Germany). Centrífuga Heraeus, Megafuge 16 R - Thermo Scientific (USA). Estufa incubadora para demanda bioquímica de oxigênio - BOD (FANEM, modelo 347CD). Microscópio Carl Zeiss Axio Vert. A1 (Germany). Microscópio Axiophot, câmera Axiocam MRc - Zeiss (Germany). Microscópio Confocal de Varredura a LASER TCS SP5 Leica (Wetzlar, HE, Germany). Microscópio Eletrônico de Varredura Jeol® JSM 7001F e Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® 1011 (JEOL, Tokyo, Japão). Spectramax M5 (Molecular Devices, LLC, EUA). Citômetro de fluxo BD FACSVerser (BD Biosciences, Inc.). Programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices, LLC, EUA); programa FlowJo v.5.2.7, (Tree

Star, Inc.); programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc), programa Excel® (Microsoft).

4.2. Cultivo dos parasitos

As espécie *Leishmania Leishmania amazonensis* [*L. (L.) amazonensis*] da cepa MHOM/BR/PH8 e *Leishmania Leishmania amazonensis* [*L. (L.) amazonensis*] GFP (*Green Fluorescent Protein*) são mantidas sob criopreservação no laboratório de Microscopia Eletrônica, Universidade de Brasília (UnB). Para a descriopreservação, as formas promastigotas foram transferidas para meio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), mantidas por três dias e em seguida transferidas para o meio de cultivo Schneider's Insect mantidas a 26 °C, até que os parasitos atingissem novamente a fase *log* de crescimento.

As formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis* MHOM/BR/PH8 foram cultivadas em meio Schneider's Insect completo (pH 7,4 e suplementado com 5% de soro fetal bovino-SFB, e 0,2% de sulfato de gentamicina). A cepa *L. (L.) amazonensis* GFP foi mantida em meio M199 completo (pH 7,4 e acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1 mg/mL sulfato de geneticina). Para a manutenção dos parasitos foram realizados passagens para meio novo a cada 3 dias.

As formas amastigotas axênicas utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir da diferenciação *in vitro* das formas promastigotas. Para isso, a *L. (L.) amazonensis* foi mantida em meio Schneider's Insect (pH 5,5), suplementado com 5% de SFB, 0,2% de sulfato de gentamicina e mantidas a 32 °C.

4.3. Curva de crescimento

Para se estabelecer o perfil de crescimento e das espécies *Leishmania (L.) amazonensis* da cepa MHOM/BR/PH8 e *L. (L.) amazonensis* GFP, os parasitos foram semeados à partir de cultura de células em fase estacionária, em garrafa para cultivo celular (25 cm²) na concentração inicial de 1×10^6 parasitos/mL. O dia da realização do cultivo foi considerado o primeiro dia da cultura, a partir desta data foram realizadas contagens diárias dos parasitos por com auxílio da câmara de Neubauer no microscópio Axio Vert. A1. Foi realizados 3 experimentos independentes e todas as contagens foram feitas em triplicata, e a viabilidade celular foi determinada com a utilização do método de exclusão de Tripan (azul de Trypan 0,4%). Foram realizados três experimentos independentes.

Após o estabelecimento do perfil de crescimento dos parasitos, as leishmanias foram utilizadas na sua fase estacionária de crescimento, que corresponde a uma cultura rica de formas promastigotas metacíclicas, que são as formas infectivas.

4.4. Animais

Foram utilizados nos ensaios camundongos machos da linhagem Swiss, não isogênicos, com cerca de cinco meses de idade, fornecidos pela Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus, UnB. Os camundongos foram mantidos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, que possui infraestrutura adequada e supervisão de um médico veterinário responsável. Os camundongos foram mantidos em gaiolas, em temperatura ambiente sob controle de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h), alimentados com ração própria para a espécie e hidratação com água potável e fresca *ad libitum*.

O projeto de pesquisa desenvolvido nesse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade sob o número de registro CEUA/UnB 137959/2013.

4.5. Síntese do 5-Etoxicarbonil-4-(2-hidroxifenil)-6-metil-3,4-diidropirimidin-2(1H)-tione

O composto 4p (Figura 15) é um derivado DHPM que foi sintetizado seguindo o procedimento descrito Ramos e colaboradores (2013). A síntese foi desenvolvida e realizada no Laboratório de Química Medicinal & Tecnológica (LaQuiMeT) da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto, protegida pela patente sob pedido de número BR102012021717-1. A atividade biológica deste derivado foi determinada pelo nosso grupo no Laboratório de Microscopia Eletrônica (RAMOS *et al.*, 2013). O composto foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) para uma concentração estoque de 100 mM, filtrado em membrana de nylon de 0,22 µm e armazenados a 4 °C até o uso.

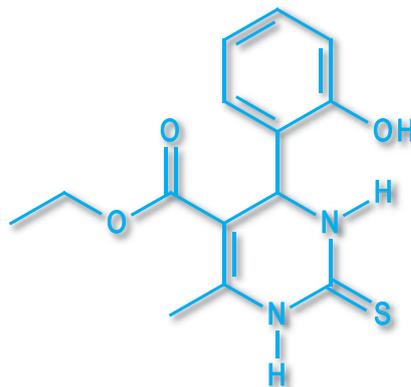


Figura 15. Fórmula estrutural do composto 4p ($C_{14}H_{16}N_2O_3S$, massa molar = 292,0882 g/mol).

4.6. Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p

A atividade do composto 4p sob a viabilidade de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi avaliada através do método colorimétrico MTT. Em uma placa de 96 poços, foram feitas diluições do composto em concentrações decrescentes (100 μ M a 0,78 μ M) em meio de cultivo líquido Schneider's Insect completo, de forma que o volume final por poço ficasse em 100 μ L. Nestes poços foi colocado $1,0 \times 10^5$ promastigotas da *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento. As promastigotas incubadas apenas com o meio de Schneider foram utilizadas como controle de células viáveis. Após o período de 48 h de incubação das promastigotas com a droga, foram adicionados 33 μ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço, e a placa foi incubada por 4 h em estufa a 26 °C, protegida da luz. Em cada poço foi adicionado 50 μ L de DMSO, a fim de solubilizar os cristais de formazan. A leitura de absorbâncias foi realizada no comprimento de onda 570 nm no equipamento Spectramax M5. As diluições foram realizadas em triplicata e cada teste foi feito em três experimentos independentes.

A IC_{50} (concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada após 48 h de cultivo. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O cálculo do IC_{50} foi realizado utilizando-se o programa Excel® (Microsoft).

4.6.1. Análise da interferência do composto 4p na curva de crescimento das formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis*

Para analisar a interferência que o composto 4p exerce sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, foram realizadas culturas com concentração de $1,0 \times 10^6$

promastigotas/mL. As promastigotas foram mantidas em meio Schneider's Insect contendo composto 4p na concentração de 50 μ M, que corresponde a IC₅₀ calculada. O controle negativo foi feito com meio Schneider's Insect completo utilizando o volume correspondente de DMSO. O número de parasitos foi determinado em câmara de Neubauer, em intervalos de 24 h, por 8 dias consecutivos. A viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão de Tripán (azul de Trypan 0,4%). Foram realizados 2 experimentos independentes, sendo que cada contagem foi realizada em triplicata.

4.6.2. Análise das alterações morfológicas e ultraestruturais produzidas pelo composto 4p em promastigotas da *L. (L.) amazonensis*

As formas promastigotas foram coletadas à partir de uma cultura em fase estacionária e tratadas em placas de 6 poços com 50 μ M do composto 4p diluído em meio de cultura líquido Schneider completo, a concentração final de parasitos foi ajustada para $1,0 \times 10^6$ leishmanias/mL em cada poço. Como controle negativo foi utilizado DMSO em meio de cultura líquida Schneider's Insect completo. As amostras foram coletadas para análise nos tempos de 24, 48 e 72 h de tratamento e processadas para microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

4.7. Teste do potencial leishmanicida do composto 4p sobre as formas amastigotas *L. (L.) amazonensis*

4.7.1. Produção de amastigotas axênicas

A cultura de amastigotas axênicas foi obtida à partir de uma cultura em fase estacionária inicial de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de modo que a concentração final da cultura fosse de $5,0 \times 10^6$ parasitos/mL. O cultivo foi feito em meio Schneider, pH 5,5 e suplementado com 5% SFB, e mantidas a 32 °C, em estufa incubadora de demanda bioquímica de oxigênio - BOD (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998; TEIXEIRA *et al.*, 2002). O quarto dia da cultura foi escolhido para ser analisado, uma vez que apresentava já apresentava grande quantidade leishmanias na forma amastigotas. Foi realizado microscopia de luz e o processamento para o MEV.

4.7.2. Diferenciação das formas amastigotas axênicas em promastigotas

A capacidade das formas amastigotas axênicas procedentes da cultura obtida (item 4.7.1) em se diferenciar novamente para formas promastigotas foi investigada. Amastigotas axênicas

geradas pelo protocolo descrito no item 4.7.1 foram centrifugadas a 400 g por 5 min, e colocadas em meio Schneider's Insect, pH 7,4 e suplementado com 5% SFB e mantidas a 26 °C. Alíquotas desta cultura foram diluídas em Azul de Trypan a cada 24 h, com a finalidade de observar a viabilidade celular, sendo que, o quarto dia de cultura foi escolhido para ser processado para análise na microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. No quarto dia de cultura a maioria das células já se encontravam na forma promastigota. O grupo controle para este ensaio foi a utilização de parasitos obtidos de uma cultura de *L. (L.) amazonensis* que não sofreu o processo de transformação *in vitro* para a forma amastigota.

4.7.3. Análise das alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo composto 4p em amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

O protocolo descrito no item 4.7.1 foi utilizado para obtenção das formas amastigotas. Estas formas amastigotas foram cultivadas em placa de seis poços e no terceiro dia de cultivo foi adicionado o composto 4p resultando em uma concentração de 50 µM. No controle negativo foi adicionado DMSO, que é o diluente do composto 4p. Os parasitos provenientes do grupos experimentais controle e tratamento foram coletados nos tempos de 24, 48 e 72 h de cultivo, e em seguida as amostras foram processadas rotineiramente para análise em microscopia eletrônica de varredura e microscopia eletrônica de transmissão.

4.8. Análise por Microscopia de luz

As formas amastigotas foram transformadas à partir de uma cultura de formas promastigotas. Para microscopia de luz foi realizado um esfregaço direto das culturas em lâminas de vidro e a secagem foi realizada a temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram coradas com panótico rápido. A análise morfológica foi feita em microscópio Axiophot (Zeiss) e as imagens obtidas através da câmera Axiocam MRc (Zeiss).

4.9. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura

Para microscopia eletrônica de varredura, as formas promastigotas e amastigotas da *L. (L.) amazonensis* foram centrifugadas 400 g por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e em seguida o material foi lavado por 2 vezes com PBS. Após a retirada do sobrenadante, as células foram fixadas por 24 h a 4 °C em glutaraldeído 2,5% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M e pH 7,2. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M e adicionadas em lamínulas de vidro (18 x 18 mm) previamente

recobertas com poli-*L*-lisina para adesão dos parasitos. As amostras foram pós-fixadas em solução (1:1) contendo 0,8% de ferricianeto de potássio e 1% de tetróxido de ósmio por 30 min à temperatura ambiente e protegida da luz. Posteriormente, foi realizada desidratação em série com acetona em concentrações crescentes a 50%, 70%, 90%, e 100% (2 vezes), por 5 min cada etapa. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico, montadas em *stubs*, metalizadas com platina e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Jeol® JSM 7001F.

4.10. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram centrifugadas por 400 g por 5 min. Em seguida, as células foram lavadas por duas vezes em PBS e fixadas em solução contendo glutaraldeído 2,0 %, paraformaldeído 2%, 5 mM CaCl₂ e sacarose 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 a 4 °C por 24 h. As amostras foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com cacodilato de sódio 0,1 M e pós-fixadas por 1 h em tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% (1:1). A contrastação *in block* foi realizado com solução aquosa de acetato de uranila 0,5%, 4 °C por 24 h, protegido da luz. As amostras foram submetidas à desidratação em série de acetona em concentrações crescentes a 50%, 70%, 90%, e 100% (duas vezes), por 5 min cada etapa. Após a desidratação as células foram lentamente embebidas em resina Spurr's diluídas em acetona 100% na seguinte proporção 1:2, 1:1, 2:1 (resina: acetona). Em seguida, o material foi colocado em resina pura 6 h e depois em formas de silicone para polimerização a 64 °C por 72 h. Cortes ultrafinos foram realizados no ultramicrotomo (Leica®) e posteriormente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. As amostras foram analisadas e as imagens adquiridas em Microscópio Eletrônico de Transmissão Jeol® 1011 operando a 80 kV.

4.11. Obtenção de macrófagos peritoneais

Camundongos *Swiss* machos (aproximadamente 5 meses de idade) foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Ao cessar os movimentos cardiorespiratórios, foi realizado assepsia da pele do animal com álcool 70%. Com auxílio de uma tesoura, foi realizada a exposição do peritônio e uma pequena abertura no mesmo. Foi adicionado 10 mL de PBS a 4 °C no espaço intraperitoneal com auxílio da pipeta de Pasteur. O peritônio dos animais foi gentilmente massageado e o PBS foi aspirado. O tampão recuperado continha as células imunes residentes do peritônio dos animais. Em seguida, o tampão recuperado contendo as

células imunes foi centrifugado a 400 g por 10 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de meio RPMI 1640 completo (suplementado com 10% soro fetal bovino e 25 µg/mL de gentamicina). As células obtidas foram quantificadas na câmara de Neubauer e a viabilidade foi determinada com uso de azul Tripán (0,4%).

4.12. Análise de citotoxicidade em macrófagos peritoneais tratados com o composto 4p

Em placas de 96 poços, foram adicionados $4,0 \times 10^4$ macrófagos peritoneais por poço em meio RPMI completo, com um volume final de 200 µL por poço. Para adesão celular as células foram incubadas em estufa 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ durante 24 h. Após este período o sobrenadante foi removido e foi adicionado a cada poço 200 µL do composto 4p diluído em meio de cultura RPMI completo, obtendo uma concentração final de 50 µM. Como controle negativo foi utilizado macrófagos incubados apenas com o meio RPMI completo com o diluente DMSO. Para o controle positivo foi utilizado com anfotericina B (0,2 µg/mL). Foi analisado o efeito dos tratamentos nos tempos de 24, 48 e 72 h, sendo que a cada 12 h o meio de cultura foi trocado mantendo-se a mesma concentração do composto. Após os tempos correspondentes, o sobrenadante foi substituído por uma solução contendo MTT diluído em RPM (15 µL de MTT (5mg/mL) com 135 µL de RPMI por poço), cuja incubação ocorreu por 4 h na estufa de cultivo. Após este período, o sobrenadante foi descartado e os sais de formazan formados foram diluídos com DMSO. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 595 nm.

4.13. Ensaios *in vitro* com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* GFP

4.13.1. Análise do pré-tratamento dos macrófagos peritoneais e do tratamento após infecção de macrófagos peritoneais por formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis* GFP

Para microscopia de fluorescência, foram semeados $3,0 \times 10^5$ macrófagos por poço em placa de 24 poços e cada poço continha uma lamínula redonda (13 mm) estéril para a adesão dos macrófagos. Para análise por citometria de fluxo, foram semeados $7,0 \times 10^5$ macrófagos por poço em placa de 6 poços. As placas foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 h para a adesão das células. Todas as análises foram feitas à partir de três experimentos independentes. Em seguida foi feito o pré-tratamento (4.13.1.A) ou tratamento pós-infecção (4.13.1.B) e as células foram processadas como descrito em 4.14 e 4.15. As análises de

fluorescência foram realizadas através do microscópio confocal a LASER e as análises de citometria de fluxo foram realizadas através do citômetro de fluxo BD FACSVersé.

A) Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com composto 4p

As células foram pré-tratadas por 24 h com composto 4p (50 μ M diluído em RPMI completo), sendo que a cada 12 h o meio de cultura foi trocado mantendo-se a mesma concentração do composto. O controle negativo foi feito com RPMI completo com o diluente DMSO. Como controle positivo foi utilizado a anfotericina B (0,2 μ g/mL). Após este tempo o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37 °C para remoção da droga. As leishmanias foram diluídas em RPMI ou RPMI com composto 4p e adicionadas aos poços na proporção de 5:1 (leishmanias: célula) e foram incubadas por 4 h na estufa de cultivo celular. Após este período o poços foram lavado por 2 vezes com PBS para a remoção das leishmanias não aderidas, e novamente foi adicionado RPMI completo ou RPMI completo com composto 4p na concentração de 50 μ M (totalizando 96 h de tratamento), sendo que o meio de cultivo foi trocado a cada 12 h. As células foram mantidas na estufa de cultivo celular por 72 h. Após este período os poços foram lavados 3 vezes com PBS.

B) Tratamento de macrófagos peritoneais com composto 4p após infecção com *L. (L.) amazonensis* GFP

As leishmanias foram adicionadas aos poços na proporção de 5:1 (leishmanias: célula) e foram incubadas por 4 h e mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% de CO₂. Após este tempo o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37 °C para remoção das leishmanias que não foram aderidas. Após 48 h da evolução da infecção as células foram tratadas com composto 4p (50 μ M). O tratamento teve duração de 48 h sendo que a cada 12 h o meio de cultura contendo o composto na mesma concentração inicial foi trocado. Como controle positivo foi feito com anfotericina B (0,2 μ g/mL). O controle negativo foi feito com RPMI completo com o diluente DMSO. Após este período os poços foram lavados três vezes com PBS.

4.14. Análise qualitativa por meio da microscopia de fluorescência da interação *L. (L.) amazonensis* GFP e macrófagos peritoneais

Para a análise dos macrófagos infectados com *Leishmanias* GFP, as células foram fixadas em formalina 3,7% por 15 min em temperatura ambiente, em seguida as células lavadas por 3 vezes em PBS. Para a visualização do núcleo, as células foram incubadas com DAPI em concentração final de 300 nM. As lâminas foram montada com lamínulas e meio de montagem anti-decaimento da fluorescência ProLong Gold Antifade. A análise foi realizada em microscópio confocal de Varredura a LASER Leica TCS SP5.

4.15. Análise quantitativa por citometria de fluxo da interação *L. (L.) amazonensis* GFP e macrófagos peritoneais

Para a quantificação de macrófagos em cultura infectados com *Leishmanias* GFP as células foram removidas por raspagem com auxílio do raspador de células e ressuspendidas em 1 mL PBS e mantidas no gelo. Em seguida as amostras foram centrifugadas 300 g por 10 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspendido em 300 µL de PBS. As amostras foram analisadas no Citômetro de fluxo BD FACSVerse com aquisição de 10.000 eventos.

4.16. Teste de Hemólise

O teste de hemólise revela a capacidade hemolítica do analito, neste caso o composto 4p. Para isso, foi coletado em tubo de citrato sangue venoso humano de doadores saudáveis, tipo O positivo. O composto 4p foi testado na concentração de 50 µM, diluído em PBS, e como droga de referência foi utilizado anfotericina B, na concentração 0,06 µg/mL diluída em PBS. Para o controle negativo (0% hemólise) foi utilizado DMSO diluído em PBS (0,5%) e como controle positivo (100% hemólise) foi uma solução de triton-X diluído em água destilada (2%). Adicionou-se em tubo falcon 0,1 ml da solução dos analitos ou do controle negativo com 0,9 ml de sangue. Para o controle positivo foi adicionado 5 mL da solução de triton-X (2%) com 0,9 mL de sangue. As amostras foram levadas ao vortex por 2-3 s. Em seguida, foram incubadas a 37 °C durante 1 h. Em seguida, as amostras foram lavadas por 4 vezes com PBS, para isso foi adicionado 5 mL de PBS (37 °C), centrifugadas por 5 min a 800 g à temperatura de 25 °C. Para liberar a hemoglobina a partir das hemácias intactas foi adicionado 4 ml de água destilada, levadas ao vortex 2-3 segundos, e centrifugadas durante 5 min a 800 g. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi diluído, uma parte do

sobrenadante em 4 partes de água destilada em placa de 96 poços. A absorbância foi determinada a 540 nm no equipamento Spectramax M5. Para o cálculo da porcentagem de hemólise a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(\text{absorbância do teste} - \text{absorbância do controle 0\% hemólise})}{(\text{absorbância do 100\% hemólise} - \text{absorbância do 0\% hemólise})}$$

Sendo que valores < 10% indicam que o composto é não-hemolítico e valores > 25%, indicam atividade hemolítica (REED e YALKOWSDY *et al.*, 1985; AMIN e DANNENFELSER, 2006).

4.17. Análises estatísticas

As análises dos dados foram realizadas utilizando o teste ANOVA “One Way” com pós-teste Bonferroni e teste *t* de Student para dados não paramétricos e pareados. As análises estatísticas foram feitas no *Software GraphPad Prism*. Valores de *p* < 0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação da curva padrão de crescimento para *L. (L.) amazonensis*

A determinação de curva de crescimento é um passo essencial para a determinação da fase infectante do parasito. Neste sentido foi estabelecida a curva de crescimento para *L. (L.) amazonensis* e GFP. A curva de crescimento estabelecida para os parasitos apresentou perfil típico conforme amplamente descrito para *L. (L.) amazonensis*, o padrão da curva de crescimento mostra claramente as seguintes fases da proliferação celular: logarítmica, que pode ser identificada entre os dias 1 a 4; estacionária, que compreende o período do dia 5 ao dia 7 e de declínio, que começa a partir do dia 7. Similarmente, ambas as cepas testadas alcançaram a fase estacionária no período entre do dia 5 ao dia 7 de cultivo celular (Figura 16). A *L. (L.) amazonensis* selvagem apresentou um crescimento mais rápido *L. (L.) amazonensis* GFP (Figura 16).

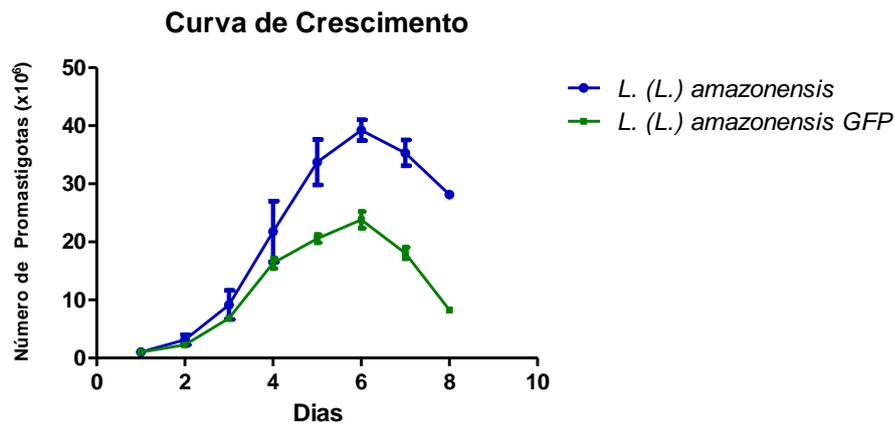


Figura 16. Curva de crescimento das cepas *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) amazonensis GFP*. O eixo X representa os dias de cultivo e o eixo Y o número de células ($\times 10^6$) para se obter o número exato de células em cultivo por mL. Cada ponto representa a média \pm SEM da triplicata.

5.2. Teste da avaliação da viabilidade das formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p e determinação do IC₅₀

Foi avaliada pela técnica de MTT a viabilidade das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p. Os resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular posterior ao tratamento dos parasitos por 48 h foram utilizados para a determinação do IC₅₀ para este composto. O composto 4p apresentou redução da viabilidade celular estatisticamente significativa contra populações da *L. (L.) amazonensis* enriquecidas em formas promastigotas metacíclicas, nas concentrações de 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M com tratamento de 48 h (Figura 17). A partir desta análise, foi calculado o IC₅₀ que ficou estabelecido como sendo de 50 μ M nas condições testadas (Tabela 2).

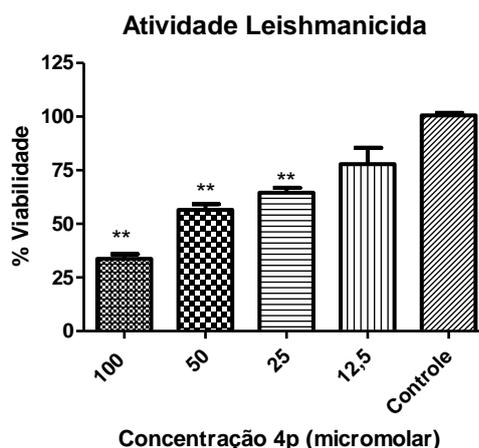


Figura 17. Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p. O gráfico mostra a média ± SEM de 3 experimentos independentes. Teste *t* pareado com ***p* < 0,01.

Tabela 2. Teste de avaliação da viabilidade das formas promastigotas *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p. Após incubação por 48 h com diferentes concentrações (100µM a 0,78µM) do composto 4p o valor do IC₅₀ foi calculado. O resultado representa a média ± SEM de três experimentos independente.

Composto	IC ₅₀ (µM)
4p	50 ± 2,25

5.3. O composto 4p apresenta atividade antiproliferativa sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

O efeito do composto 4p sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi monitorado por 8 dias consecutivos. Na Figura 18, pode-se observar que a cultura de promastigotas foi sensível ao composto a partir do terceiro dia de tratamento, apresentando resultados altamente significativos (*p* < 0,001). Sendo que à partir do quinto dia, a proliferação celular diminui aproximadamente 50%. Apesar do composto 4p ter interferido com a taxa de proliferação celular, as formas promastigotas tratadas mantiveram o perfil da curva semelhante à curva padrão estabelecida para *L. (L.) amazonensis*. Na curva obtida com as leishmanias submetidas ao tratamento pode ser observada uma fase logarítmica de crescimento até o dia 4, fase estacionária do dia 5 ao dia 7, e em seguida começa a fase de declínio.

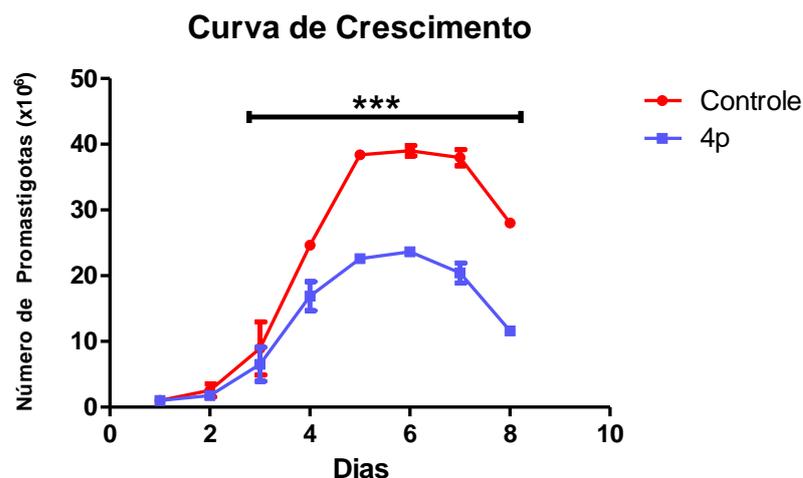


Figura 18. Curva de crescimento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com 4p. As formas promastigotas foram tratadas com 50 μ M do composto 4p e no controle negativo foi usado DMSO. Cada ponto representa a média \pm SEM de dois experimentos independentes. ANOVA, pós-teste Bonferroni. *** $p < 0,001$.

5.4. O composto 4p provoca alterações morfológicas e ultraestruturais em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

Análises ultraestruturais através da microscopia eletrônica de varredura de células tratadas com IC₅₀ do composto 4p mostraram significativas alterações morfológicas nos parasitos. Dentre as alterações observadas, destacamos a perda da forma alongada das células e alterações drásticas observadas na membrana celular dos parasitas em relação ao controle não tratado. No tempo de 24 h, não foram observadas alterações pronunciadas na morfologia das promastigotas tratadas (Figura 19B e 19C). Já no tempo de 48 h de tratamento foi observado o enrugamento da superfície da membrana plasmática das células e a perda do formato alongado do corpo celular do parasita (seta azul) (Figura 19E e 19F). Foi observada no tempo de 72 h de tratamento a perda a forma alongada do corpo celular das promastigotas (cabeça de seta verde) e a presença de flagelo deformado, com a extremidade achatada (seta vermelha) (Figura 19H e 19I).

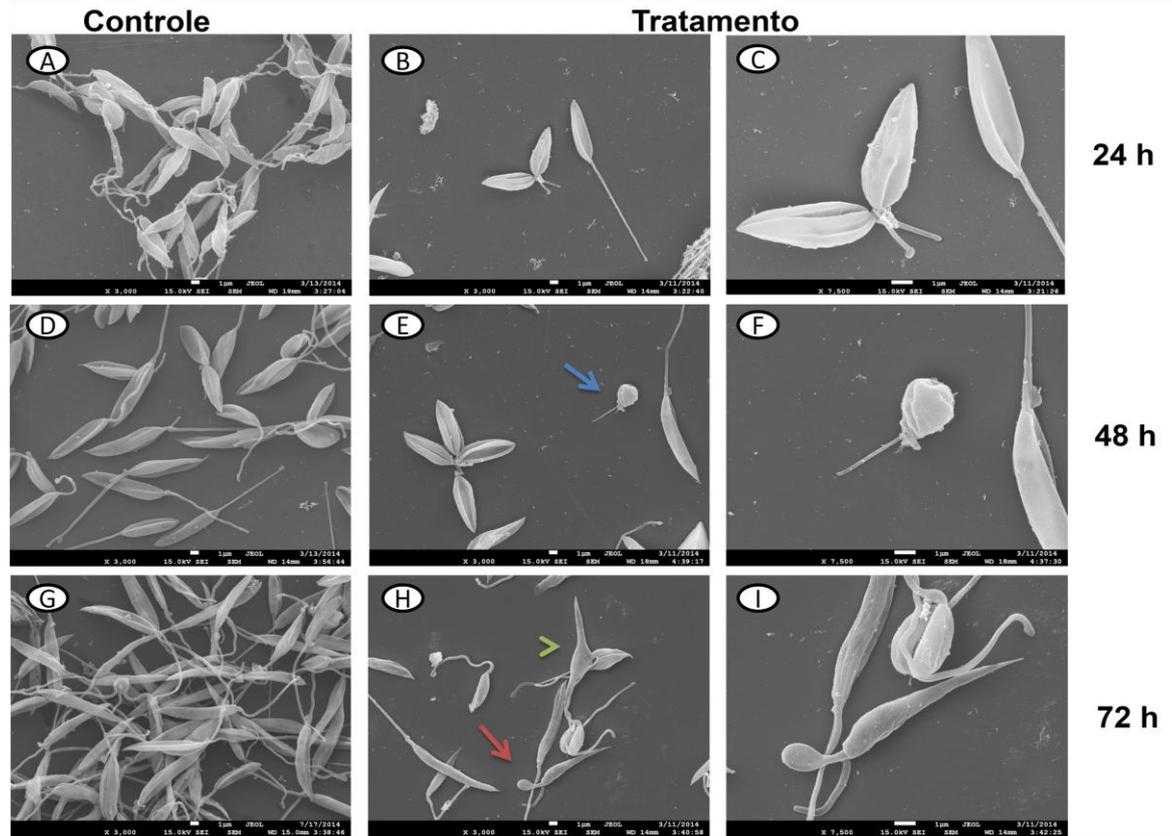


Figura 19. Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p e observadas através do MEV. (A) Promastigotas sem tratamento, controle 24 h. (B) Promastigotas tratadas por 24 h. (C) Detalhe da imagem B. (D) Promastigotas sem tratamento, controle 48 h. (E) Promastigotas tratadas por 48 h, notar alteração na forma e enrugamento do corpo celular (seta azul). (F) Detalhe da imagem E. (G) Promastigotas sem tratamento, controle 72 h. (H) Promastigotas tratadas por 72 h, observar alteração no formato do corpo celular (cabeça de seta verde) e alteração no flagelo (seta vermelha). (I) Detalhe da imagem H. Barra de referência 1 µm (A-I).

As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas por 24 h, 48 h, 72 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 20 (A e C) mostra a fotomicrografia da forma promastigota controle 24 h apresentando morfologia alongada, citoplasma homogêneo e presença de corpúsculo lipídico. O núcleo apresenta morfologia bem preservada. Perfis normais da mitocôndria também podem ser observados. O cinetoplasto, região da mitocôndria onde se concentra o DNA mitocondrial é encontrado na base da bolsa flagelar onde o flagelo emerge. As promastigotas tratadas com 4p por 24h (Figura 20B e 20D) apresentaram relevantes alterações ultraestruturais. O núcleo destes parasitos apresentou um contorno extremamente irregular o que sugere uma redução no seu volume. A mitocôndria apresentou um grande aumento de volume (inchada) com as cristas mitocondriais totalmente desorganizadas e em reduzido número. Foi também observada, no interior da mitocôndria, a

presença de estruturas circulares de membrana que são morfologicamente descritas como figuras de mielina. Ocorreu ainda o acúmulo de diversos vacúolos distribuídos por todas as regiões da célula.

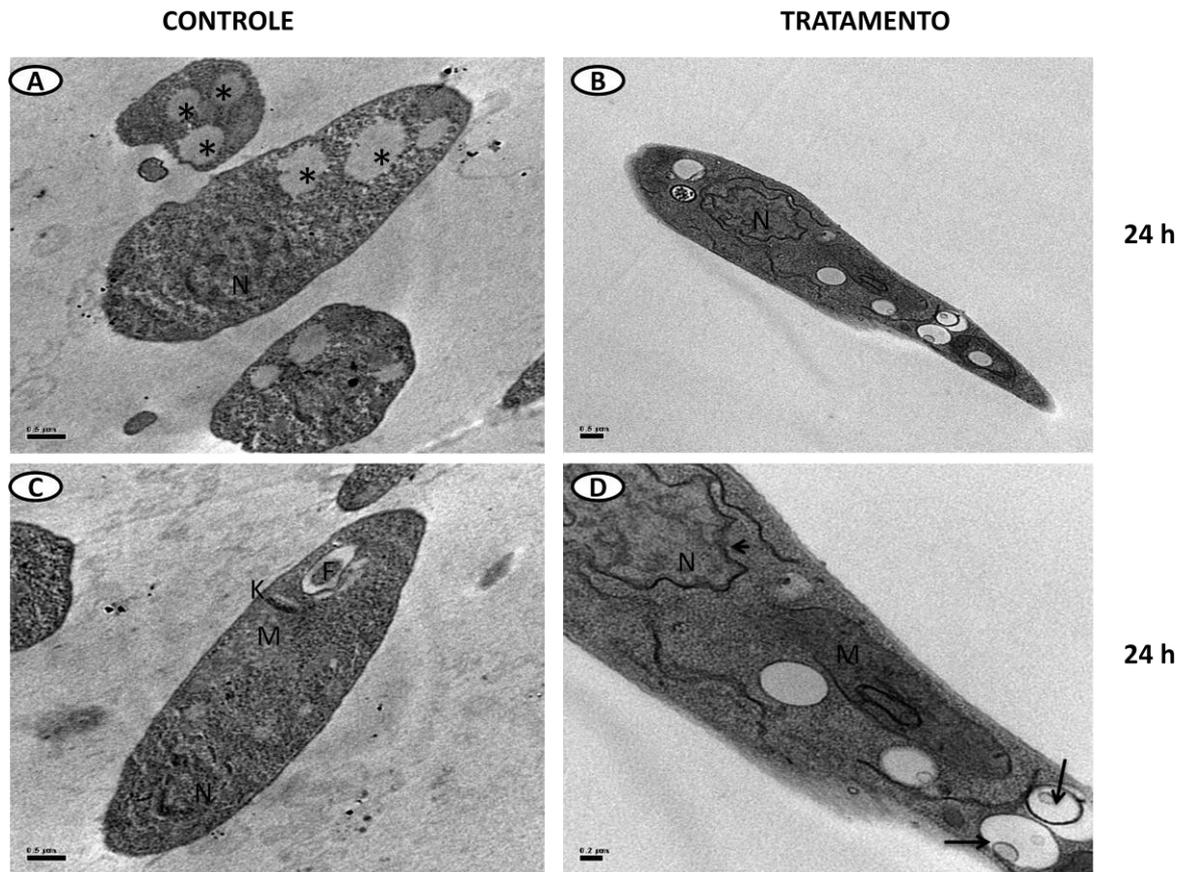


Figura 20. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 24 h com o composto 4p e observadas através do MET. (A) Promastigota controle. Note a presença de corpúsculo lipídico (asterisco), núcleo. (B) Promastigota tratada com 4p, núcleo desorganizado e membrana irregular. (C) Promastigota controle. Observar o flagelo, cinetoplasto, mitocôndria e núcleo. (D) Promastigota tratada. Note a presença de vacúolos (seta preta). (K) Cinetoplasto, (M) mitocôndria, (N) núcleo. Barras: (A-C) 0,5 µm, (D) 0,2 µm.

O controle 48 h mostra formas promastigotas alongadas com cinetoplasto evidente (Figura 21A e 21C), bolsa flagelar com aspecto normal, citoplasma granuloso sem vacúolos e a presença de corpúsculos lipídicos. O tratamento 48 h promoveu a eliminação de um grande número de parasitas, ficando apenas a estrutura de membrana e microtúbulos subpeliculares vazia (Figura 21B, ver as setas). Diversas outras células parecem apresentar a divisão celular bastante comprometida com bipartição incompleta e citoplasma com grandes vacúolos (Figura 21B). Outras formas promastigotas mostraram a mitocôndria com alterações drásticas,

grande aumento de volume e cinetoplasto organizado de forma extremamente atípica (no formato da letra “V”) o que sugere erro durante a sua duplicação (Figura 21D).

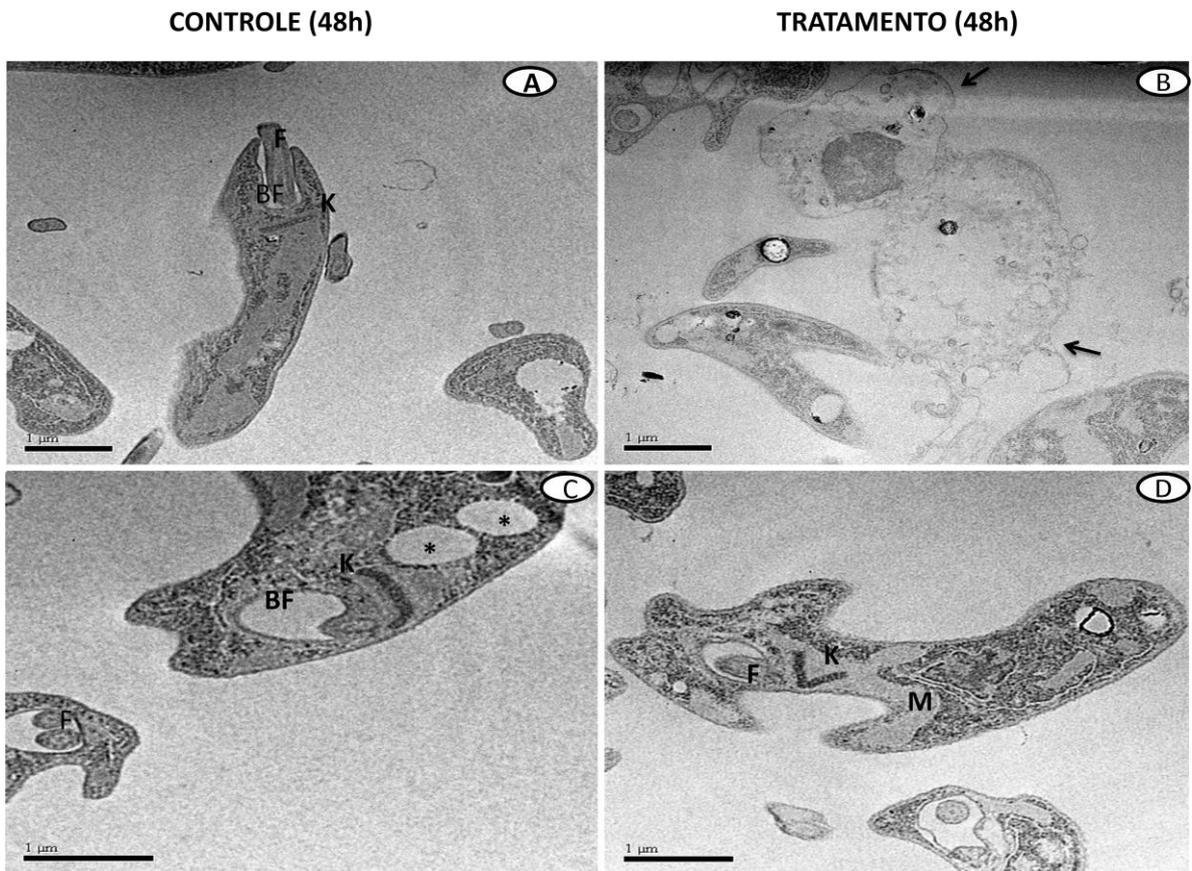


Figura 21. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 48 h com o composto 4p e observadas através de análises de MET. (A) Promastigota controle. Note o cinetoplasto, a bolsa flagelar e o flagelo. (B) Promastigota tratada com 4p. Observa-se no citoplasma espaços vazios e restos celulares. Nota-se também a delimitação da membrana plasmática (ver as setas). (C) Promastigota controle. Note a bolsa flagelar e os corpúsculos lipídicos. (D) Promastigota tratada. Note o cinetoplasto alterado e a mitocôndria inchada. (BF) bolsa flagelar, (F) flagelo, (K) cinetoplasto, (M) mitocôndrias. Barras: (A-D) 1 μm.

Na Figura 22A e 22C se visualiza a fotomicrografia da forma promastigota controle (72 h) apresentando morfologia alongada, núcleo íntegro, citoplasma granuloso e homogêneo. O tratamento após 72 h levou a uma acentuada redução do número de parasitos levando ao surgimento de formas promastigotas contendo apenas a membrana plasmática associada ao microtúbulos subpeliculars com o a região do citoplasma totalmente esvaziado (Figura 22B). As demais células apresentaram grandes vacúolos distribuídos pelo seu citoplasma. Notou-se que nestes vacúolos elementos granulares foram constantemente observados (Figura 22D).

Todas as alterações morfológicas e ultraestruturais observadas são compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular do parasito (ver Figuras 20, 21 e 22).

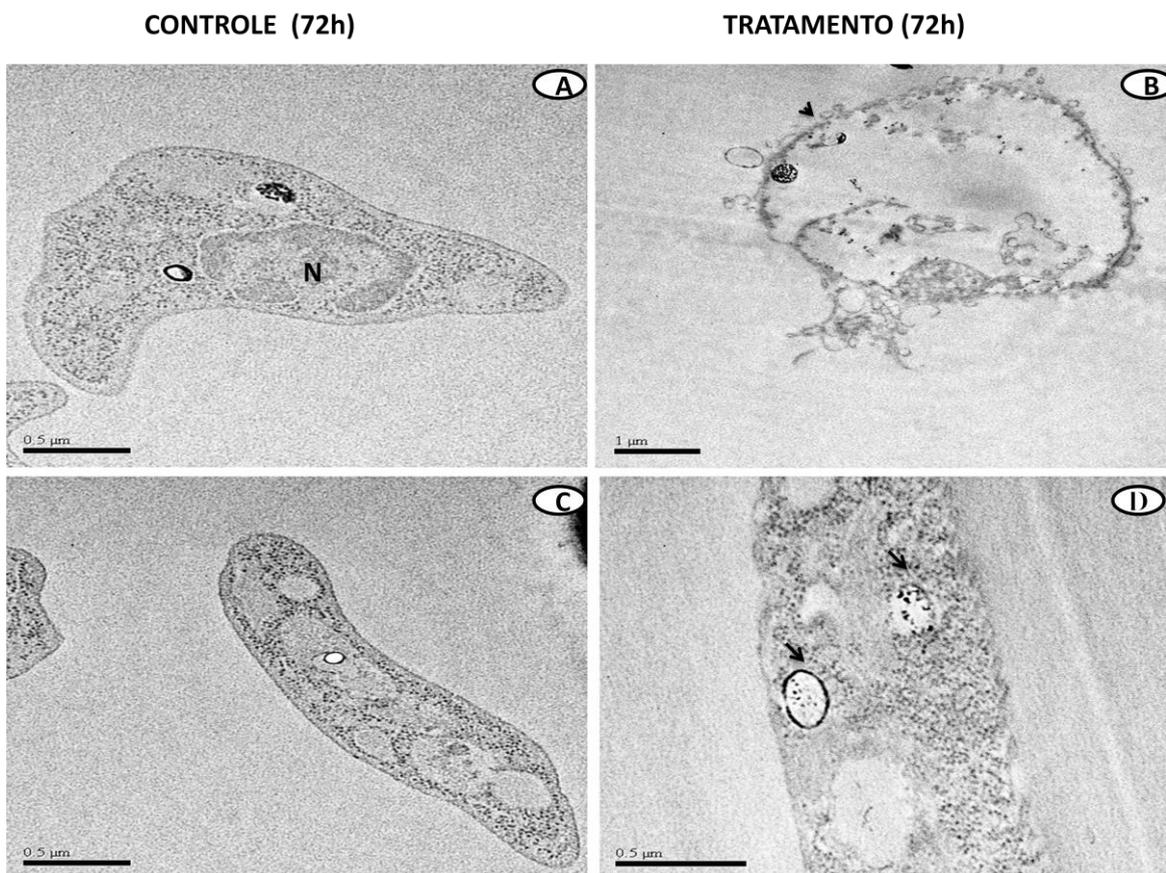
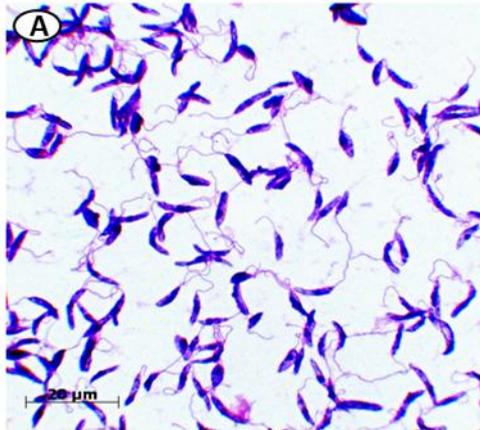


Figura 22. Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 72 h com o composto 4p e observadas através de análises de MET. (A) Promastigota controle. Nota-se o núcleo preservado. (B) Promastigota tratada com 4p. Nota-se citoplasma com espaços vazios e restos de membrana. Observa-se também a delimitação da membrana plasmática (ver as setas). (C) Promastigota controle. Nota-se uma morfologia alongada preservada. (D) Promastigota tratada. Nota-se constantemente a presença de vacúolos com material granular no seu interior (seta preta). (M) mitocôndria. Barras: (A, C, D) 0,5 μm, (B) 1 μm.

5.5. Conversão *in vitro* de formas promastigotas para formas amastigotas

As formas amastigotas obtidas pelo processo de diferenciação *in vitro* foram analisadas quanto a sua morfologia através da microscopia eletrônica de varredura (Figura 23). Os parasitos obtidos apresentaram morfologia ovalada, arredondada, e ausência de flagelo livre (Figura 23B).

Promastigota



Amastigota

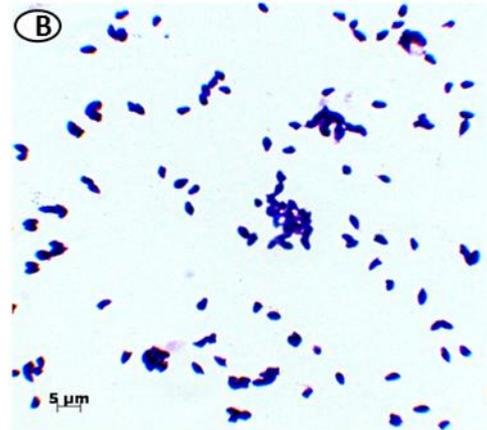


Figura 23. Obtenção de formas amastigotas axênicas. A cultura de amastigotas axênicas foi obtida à partir de uma cultura em fase estacionária inicial de promastigotas de *L. (L) amazonensis* observadas na microscopia de luz. (A) Forma promastigotas. (B) Forma amastigota no dia 4 de cultura e sem flagelo exteriorizado. Barra de referência: 20 μm (A) e 5 μm (B).

As formas amastigotas obtidas pelo processo de diferenciação *in vitro* foram analisadas quanto a sua morfologia através de observação em microscopia eletrônica de varredura (Figura 24A). Os parasitos obtidos apresentaram morfologia ovalada (ver a cabeça de seta verde), arredondada (ver a cabeça de seta azul), e ausência de flagelo livre, sendo esta a principal característica morfológica que distingue amastigotas de promastigotas. Entretanto, no dia 4 de cultura das formas amastigotas axênicas ainda é encontrado leishmanias com flagelo livre (ver a seta vermelha).

Promastigota

Amastigota

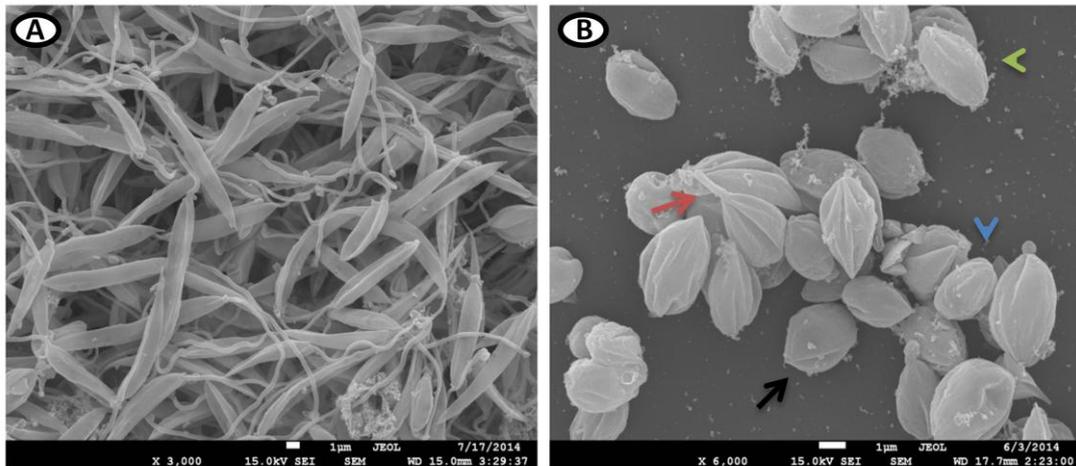


Figura 24. Produção de formas amastigotas axênicas. A cultura de amastigotas axênicas foi obtida à partir de uma cultura em fase estacionária inicial de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, observadas no MEV. (A) Forma promastigotas; (B) Forma amastigota no dia 4 de cultura, amastigotas sem flagelo exteriorizado (seta preta) com forma arredonda (cabeça de seta azul), ovalada (cabeça de seta verde) observar a presença de leishmania com flagelo exteriorizado (seta vermelha). Barra de referência 1 µm (A, B).

5.6. As formas amastigotas diferenciadas *in vitro* conservaram a capacidade de retornar a forma promastigota

Amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* produzidas foram capazes de reverter sua forma para a forma promastigota, de forma dependente a modificações nas condições de cultivo celular. A Figura 25 mostra parasitos no dia 4 da cultura.

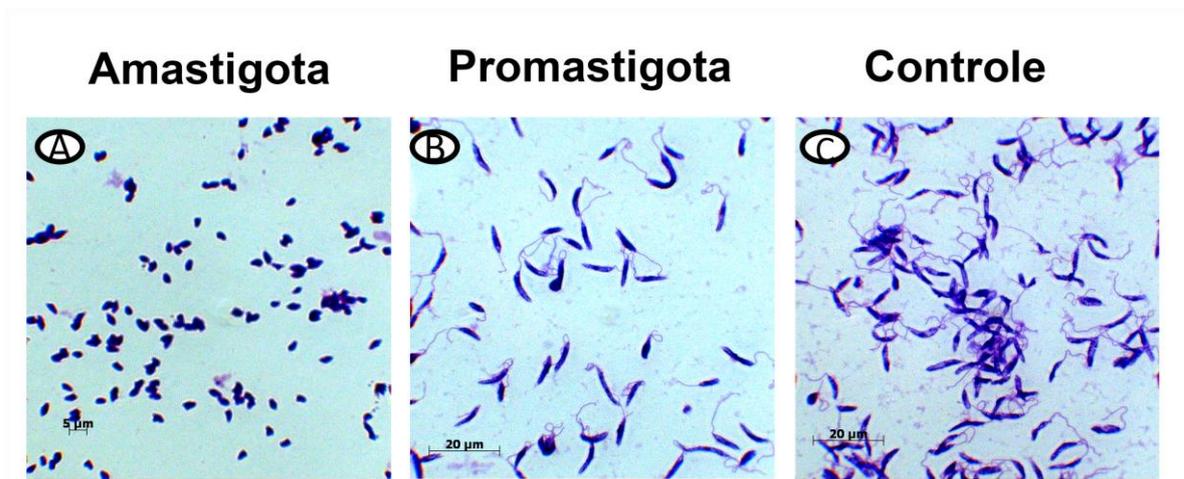


Figura 25. Reversão da forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* para forma promastigota *in vitro* observadas através da microscopia de luz. Amastigotas axênicas de *L. amazonensis* transferidas para o meio de cultivo Schneider's Insect, pH 7,4 e mantidas a 26 °C. (A) Amastigotas axênicas. (B) Promastigotas obtidas por conversão da forma amastigota. (C) Promastigotas que não sofreram processo de transformação para amastigota axênica. Barra de referência 5 µm (A), 20 µm (B e C).

Amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* produzidas foram capazes de reverter para a forma promastigota, de forma dependente a modificações nas condições de cultivo celular. No dia 4 da cultura no processo de transformação, a maioria da cultura estava constituída de formas promastigotas. No entanto, mesmo neste período, algumas formas amastigotas ainda puderam ser encontradas (ver seta azul) (Figura 26B). A morfologia das formas promastigotas que foram obtidas do processo de transformação cíclica foi típica. Estas células apresentaram corpo celular alongado (seta verde) e flagelo exteriorizado (seta vermelhas), estruturalmente semelhante às formas promastigotas que não sofreram o processo de diferenciação (Figura 26C).

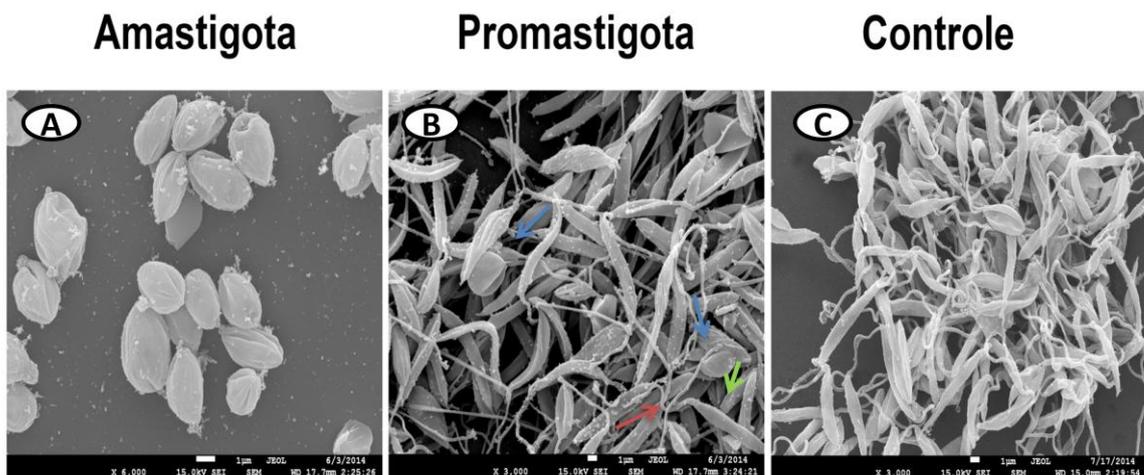


Figura 26. Reversão da forma amastigota de *L. (L.) amazonensis* para forma promastigota *in vitro*. Amastigotas axênicas de *L. amazonensis* transferidas para o meio de cultivos Schneider's Insect, pH 7,4 e mantidas a 26 °C. (A) Amastigotas axênicas. (B) Promastigotas obtidas por conversão da forma amastigota. Observa-se a presença de flagelo longo (ver a seta vermelha), corpo celular alongado (ver seta verde), presença de formas amastigotas (ver as setas azuis). (C) Promastigotas que não sofreram processo de transformação para amastigota axênica. Barra de referência 1 µm para (A), (B) e (C).

5.7. O composto 4p provoca significativas alterações morfológicas e ultraestruturais em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A MEV permitiu observar as alterações nas formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p. No tempo de 24 h de tratamento foi observada a presença de elevações, formação de bolhas na membrana (Figura 27B e 27C - ver as setas verdes) no corpo celular das formas amastigotas. Após 48 h de tratamento foi notada a existência de amastigotas com corpo celular deformado quando comparadas com o controle não tratado apresentando um volume ou muito aumentado ou extremamente reduzido (Figura 27, E e F seta azul). No tempo de 72 h de tratamento foi observado majoritariamente amastigotas com um anormal alargamento da bolsa flagelar e alterações na membrana celular (Figura 27H e 27I).

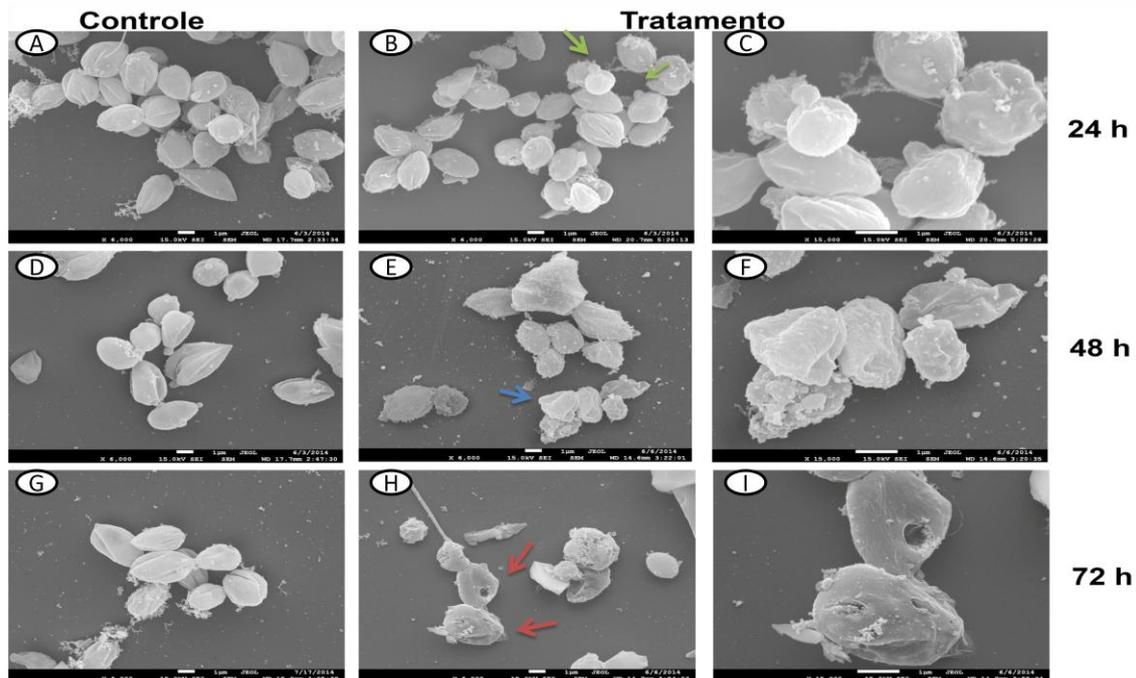


Figura 27. Alterações morfológicas em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o composto 4p observadas por MEV. (A) Amastigotas sem tratamento com um controle de 24 h. (B) Amastigotas tratadas por 24 h com 4p. Observa-se a presença de bolhas na membrana (ver a seta verde). (C) Detalhe da imagem de (B). (D) Amastigotas sem tratamento com um controle de 48 h. (E) Amastigotas tratadas por 48 h com 4p. Observa-se alteração na forma do corpo celular (ver a seta azul). (F) Detalhe da imagem (E). (G) Amastigotas sem tratamento com controle de 72 h. (H) Amastigotas tratadas por 72 h com 4p. Nota-se a presença de alterações na membrana (ver as setas vermelhas). (I) Detalhe da imagem (H). Barra de referência 1 µm (A-I).

Com o intuito de verificar as possíveis alterações morfológicas e ultraestruturais intracelulares devido ao alvo de ação do composto 4p, as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas por 24 h, 48 h, 72 h e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A Figura 28A e 28C mostra a fotomicrografia da forma amastigota com controle de 24 h apresentando um núcleo bem delimitado além do citoplasma granuloso e homogêneo. O tratamento das formas amastigotas com 4p, no mesmo período, promoveu a completa desorganização do corpo celular, os parasitas apresentam-se totalmente disformes, com aspecto morfológico não mais correspondente com as formas amastigotas (Figura 28B e 28D - ver as setas). Além deste aspecto anormal, o citoplasma das células contém grandes vacúolos e inclusões eletrondensas.

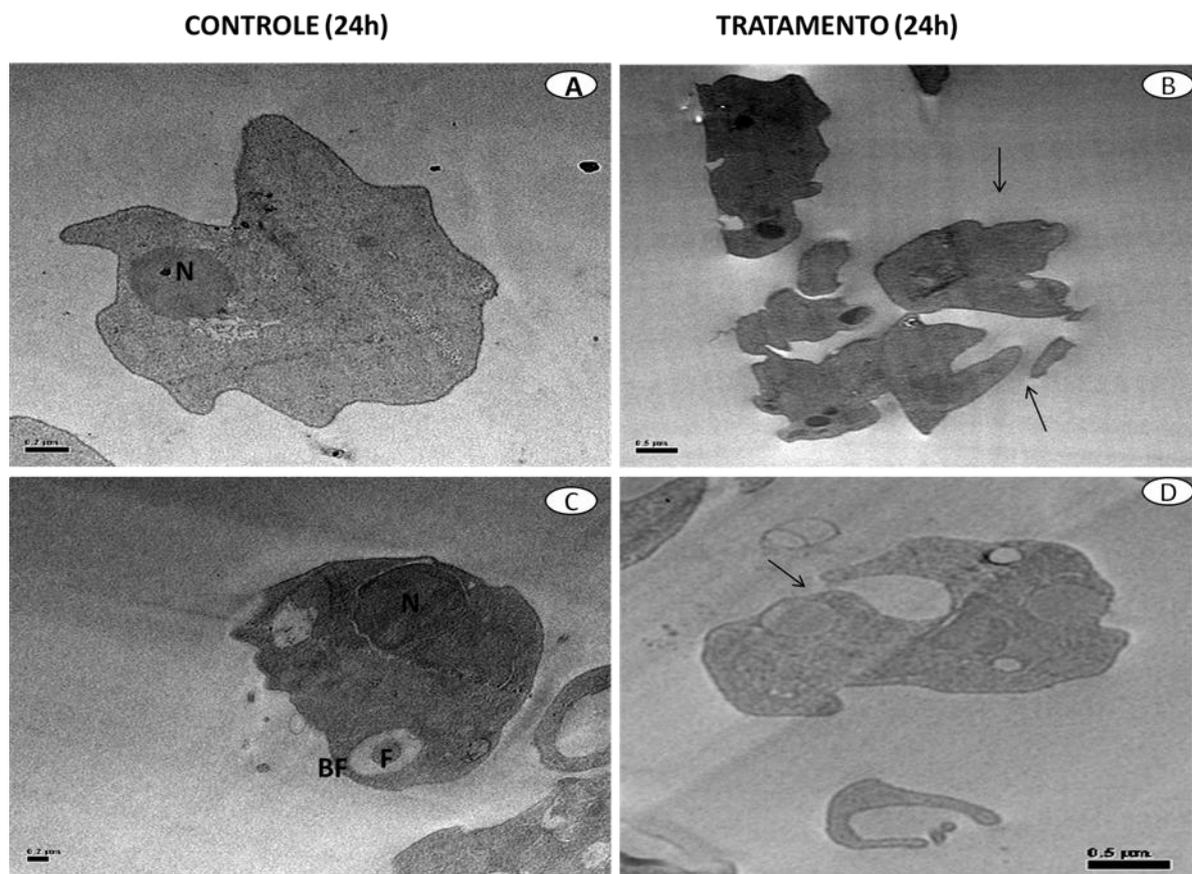


Figura 28. Alterações ultraestruturais em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 24 h com o composto 4p e observadas através do MET. (A) Amastigota controle. Observa-se o núcleo e a integridade da membrana plasmática. (B) Amastigota tratada com 4p com aspectos disformes. (C) Amastigota controle. (D) Amastigota tratada com 4p. Observa-se uma membrana irregular (ver as setas). (BF) Bolsa flagelar, (F) flagelo, (N) núcleo. Barras: (A) e (C) 0,2 μm ; (B) e (D) 0,5 μm .

A análise do controle negativo das formas amastigotas para o tempo de 48 h (Figura 29A e 29C) mostrou células com núcleo íntegro e bem definido, citoplasma granular e homogêneo, presença de corpúsculos lipídicos e cinetoplasto altamente preservado. Foi possível ainda encontrar formas amastigotas em processo final de divisão celular, contendo dois núcleos (Figura 29C). O tratamento das células neste período promoveu uma extensiva vacuolização no citoplasma das formas amastigotas, no quais é possível identificar no seu

interior restos de membrana formando figuras de mielina (Figura 29B e 29C - ver as setas).

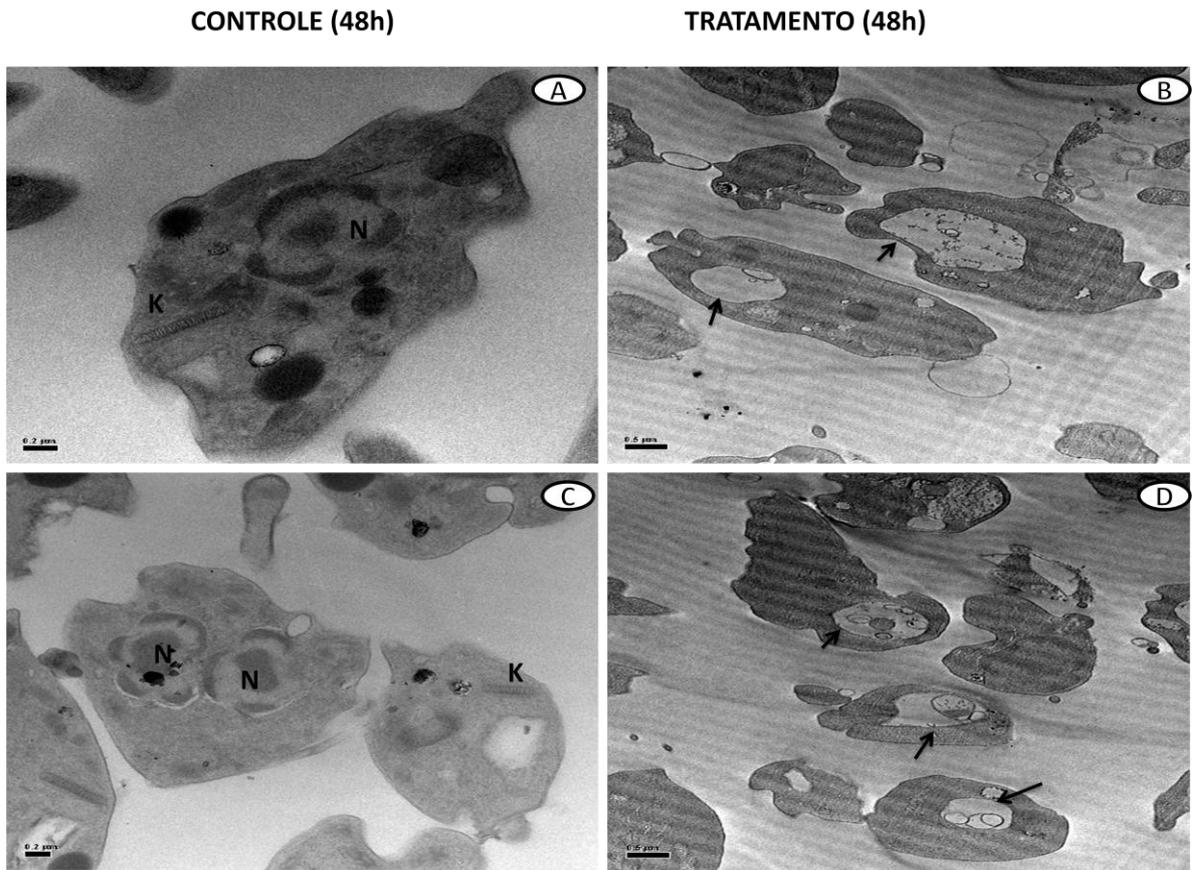


Figura 29. Alterações ultraestruturais em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 48 h com o composto 4p e observadas através de análises de MET. (A) Amastigota controle. Nota-se o núcleo, cinetoplasto, flagelo e corpúsculos lipídicos eletrodensos. (B) Amastigota tratada com 4p com presença de vacúolos (ver as setas). (C) Amastigota controle com células em processo de divisão e observa-se dois núcleos. (D) Amastigota tratada com 4p com vacúolos (ver a seta preta). (F) flagelo, (K) cinetoplasto, (N) núcleo. Barras: (A) e (C) 0,2 μm ; (B) e (D) 0,5 μm .

No tempo de 72 h o controle negativo apresentou formas amastigotas (Figura 30A e 30B) com membrana bem delimitada, citoplasma granular e homogêneo, núcleo bem delimitado e cinetoplasto preservado. O tratamento das formas amastigotas no mesmo período promoveu a formação de grandes vacúolos (ver a seta preta) no citoplasma das células. Foram encontradas grandes protrusões da membrana plasmática contendo vacúolos no seu interior que se projetam para fora do contorno da célula (Figura 30B - ver a seta azul). Estas protrusões são compatíveis com a formação das elevações (bolhas) na membrana plasmática observadas por MEV (Figura 27B - ver a seta verde). Ocorreu também uma intensa redução no número de parasitas estruturalmente preservados com a presença de diversas formas amastigotas

contendo somente a delimitação da membrana plasmática com os microtúbulos subpeliculares, com o citoplasma vazio contendo alguns restos de organelas (Figura 30D - ver a seta vermelha).

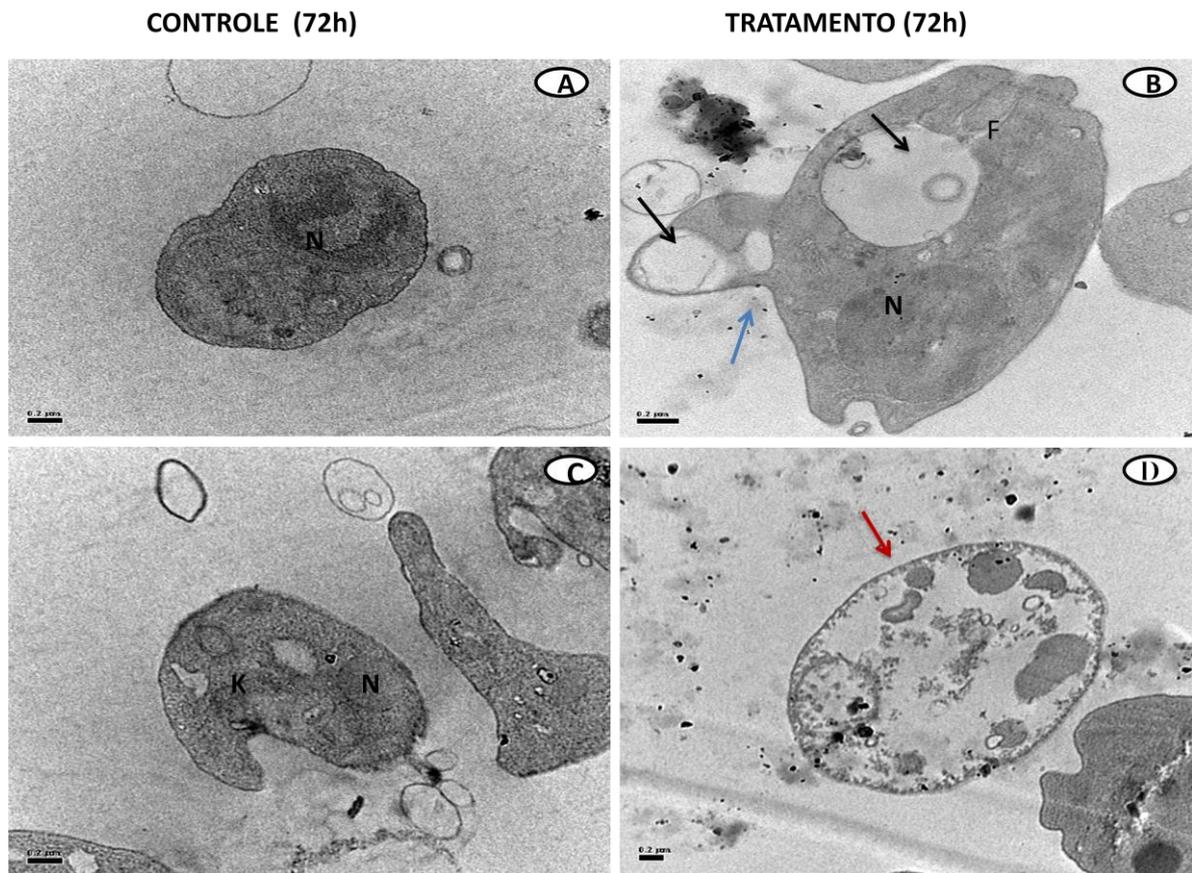


Figura 30. Alterações ultraestruturais em amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas por 72 h com o composto 4p e observadas através de análises de MET. (A) Amastigota controle, observar o núcleo e a integridade da membrana plasmática. (B) Amastigota tratada com 4p na presença de vacúolos (ver a seta preta). Observa-se projeção da membrana semelhante a uma bolha (ver a seta azul). (C) Amastigota controle. Nota-se a presença de núcleo e cinetoplasto. (D) Amastigota tratada com 4p. Observa-se o citoplasma com espaços vazios e restos celulares além da delimitação da membrana plasmática com os microtúbulos subpeliculares (ver a seta vermelha). (K) cinetoplasto, (N) núcleo. Barras: (A), (B), (C) e (D) 0,2 µm.

5.8. O composto 4p apresentou citotoxicidade semelhante a anfotericina B sobre macrófagos peritoneais

O tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p por 24 h, 48 h e 72 h promoveu uma redução significativa na viabilidade, porém semelhante à anfotericina B, sendo mais acentuada no tempo de 72 h (Figura 31).

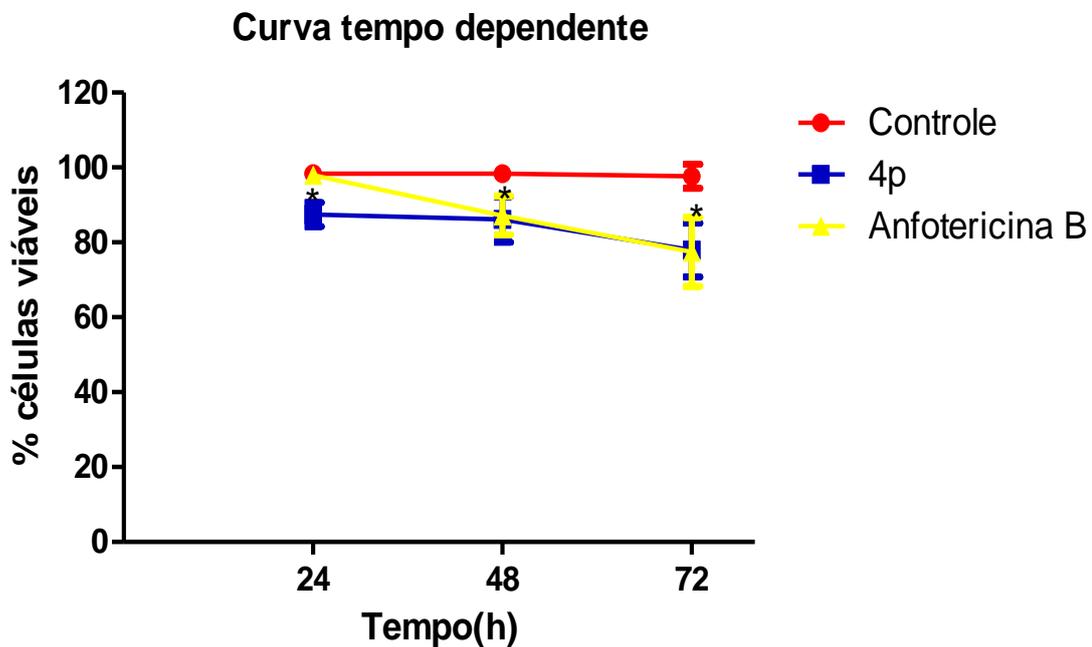


Figura 31. Curva tempo dependente dos macrófagos peritoneais tratados. Os macrófagos foram tratados por um período de 24 h, 48 h e 72 h com o 4p (50 μ M) ou anfotericina B (0,2 μ g/mL) e o controle negativo foi feito com o diluente do DMSO. Cada ponto possui média \pm SD das triplicatas. * $p < 0,05$ significativa pelo teste t pareado.

5. 9. O pré-tratamento dos macrófagos com o composto 4p diminui a infecção produzida por *L. (L.) amazonensis* GFP

Os macrófagos peritoneais receberam pré-tratamento a cada 12 h por 24 h com o composto 4p (50 μ M) ou com anfotericina B (0,2 μ g/mL). Em seguida os macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* GFP e a evolução da infecção foi seguida até 72 h, sendo que em um grupo foi mantido o tratamento com 4p pós-infecção. A avaliação quantitativa da interferência do pré-tratamento com 4p em macrófagos peritoneais foi realizada por citometria de fluxo utilizando como parâmetro a média de intensidade de fluorescência (MIF, Figura 32) e análise qualitativa da infecção foi feita por microscopia confocal de varredura a LASER (Figura 33).

A análise dos dados indica que o pré-tratamento reduziu significativamente ($p < 0,001$) a quantidade de amastigota presente nos macrófagos. O grupo que recebeu o tratamento pré e pós-infecção, totalizando 96 h de tratamento, também apresentou uma redução altamente significativa da quantidade de parasitos internalizados nos macrófagos ($p < 0,001$), quando comparado ao grupo que não recebeu tratamento. A anfotericina B, usada

como controle positivo levou a uma redução significativa na taxa de infecção, entretanto este efeito ($p < 0,05$) foi menos pronunciado que o apresentado pelo composto 4p ($p < 0,001$)

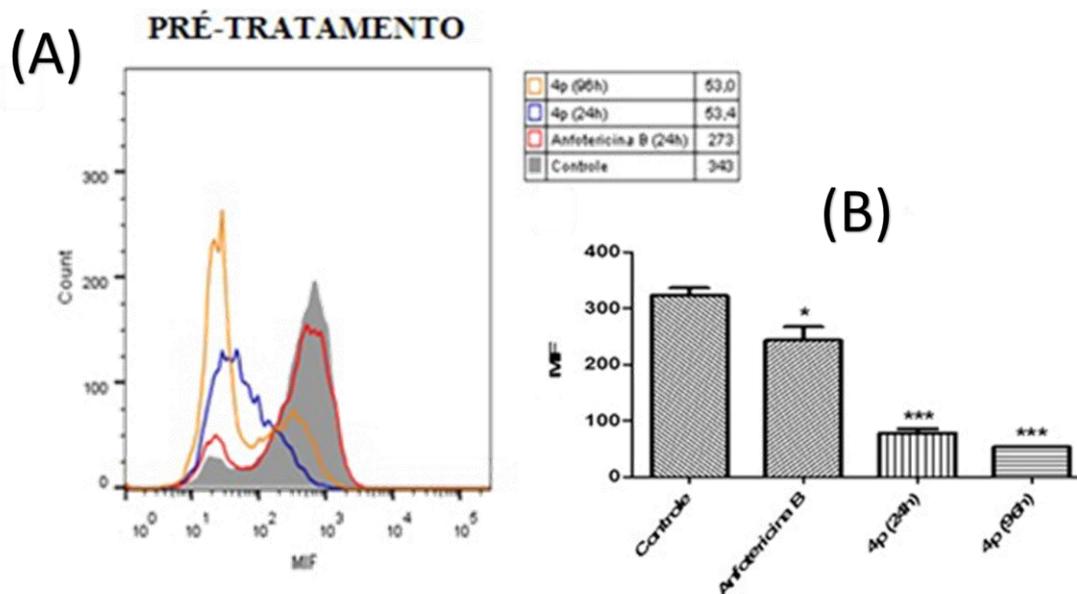


Figura 32. Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p diminui a infecção por *L. (L.) amazonensis* GFP. Os macrófagos receberam o pré-tratamento com 4p ou anfotericina B a cada 12 h por 24 h, sendo que em um grupo foi mantido o tratamento com 4p pós-infecção por 96 h. (A) Histograma representativo dos tratamentos comparado ao controle com DMSO (cinza), sendo representativo de três experimentos independentes. (B) Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ pelo teste *t* não-paramétrico.

As análises por microscopia confocal de varredura a LASER das amostras tratadas e controles corroboram com os dados obtidos pela citometria de fluxo. Pode-se observar uma redução considerável na quantidade de amastigotas presentes nos macrófagos infectados quando estas células receberam o tratamento com o 4p (Figura 33K e 33L) quando comparado ao grupo controle não tratado (Figura 33G e 33H). De forma promissora os resultados obtidos com 24 h de tratamento com o composto 4p foram melhores do que aqueles obtidos com a Anfotericina B conforme pode ser observado nas imagens S e T. As imagens de contraste de (Figura 33A, 33E, 33I, 33M e 33Q) mostram a morfologia normal das células hospedeiras do parasito. É oportuno salientar que as células tratadas com Anfotericina B em todos os ensaios apresentaram a morfologia mais alterada em relação ao controle. Nestas amostras vemos que as células hospedeiras estão com aspecto arredondando, sem os pontos de adesão focais (cabeça de setas pretas) característicos do processo de adesão celular ao substrato e que são encontrados tanto nas células normais quanto nas células tratadas com o composto 4p.

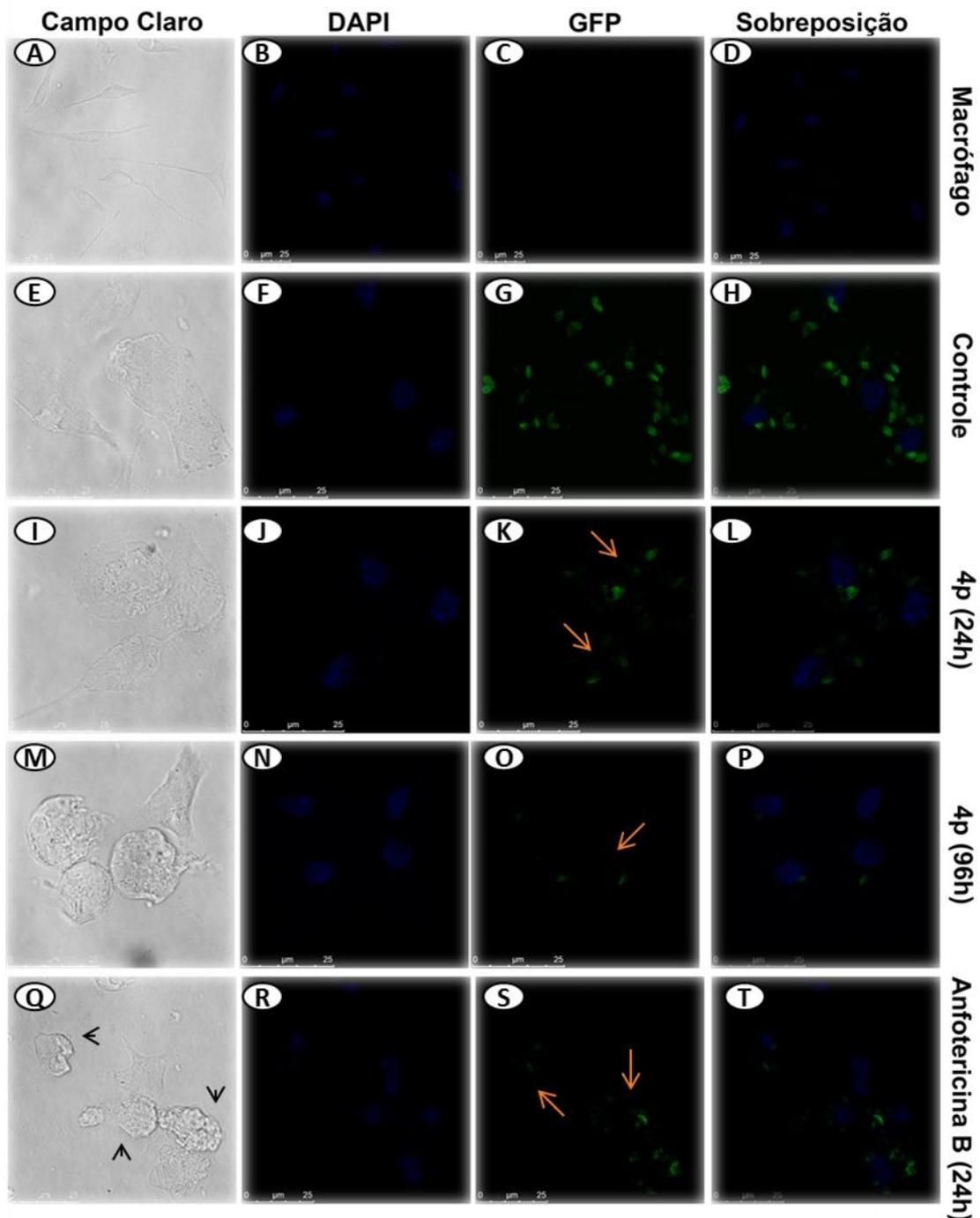


Figura 33. Pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p diminui a infecção por *L. (L.) amazonensis* GFP. Macrófagos foram tratados a cada 12 h durante 24 h com composto 4p ou anfotericina B (controle positivo) ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo), sendo que um grupo foi mantido o tratamento com 4p pós-infecção. (A)-(D) representam o controle de autofluorescência com os macrófagos peritoneais de camundongo. (E)-(H) mostram células infectadas com a *L. (L.) amazonensis* GFP sem nenhum tratamento. (I)-(L) representam células pré-tratadas com 4p e infectadas com *L. (L.) amazonensis* GFP. (M)-(P) destacam células que receberam o tratamento pré e pós-infecção com 4p. (Q)-(T) referem-se às células pré-tratadas com anfotericina B e infectadas *L. (L.) amazonensis* GFP. O núcleo das células foi corado com DAPI

(azul). As análises foram feitas em microscópio confocal de varredura a LASER e mostra a presença de poucas *L. (L.) amazonensis* GFP (verde) após os tratamentos (setas). As imagens de contraste de fase (A), (E), (I), (M) e (Q) mostram os aspectos normais da morfologia das células hospedeiras. Barra de referência 25 μm .

5.10. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento após infecção de macrófagos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* GFP

Os macrófagos peritoneais foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* GFP e após 48 h da evolução da infecção receberam tratamento a cada 12 h por 48 h e com o composto 4p (50 μM) ou com a anfotericina B (0,2 $\mu\text{g/mL}$). A avaliação quantitativa da interferência do pós-tratamento em macrófagos peritoneais infectados foi realizada por citometria de fluxo utilizando como parâmetro a MIF (Figura 34). A análise qualitativa do tratamento foi feito por microscopia confocal de varredura a LASER. O tratamento com o composto 4p dos macrófagos infectados levou a uma redução significativa na quantidade de amastigotas presentes nos macrófagos ($p < 0,01$). Esta redução também foi acentuada em relação ao efeito observado no tratamento com a Anfotericina B (Figura 34).

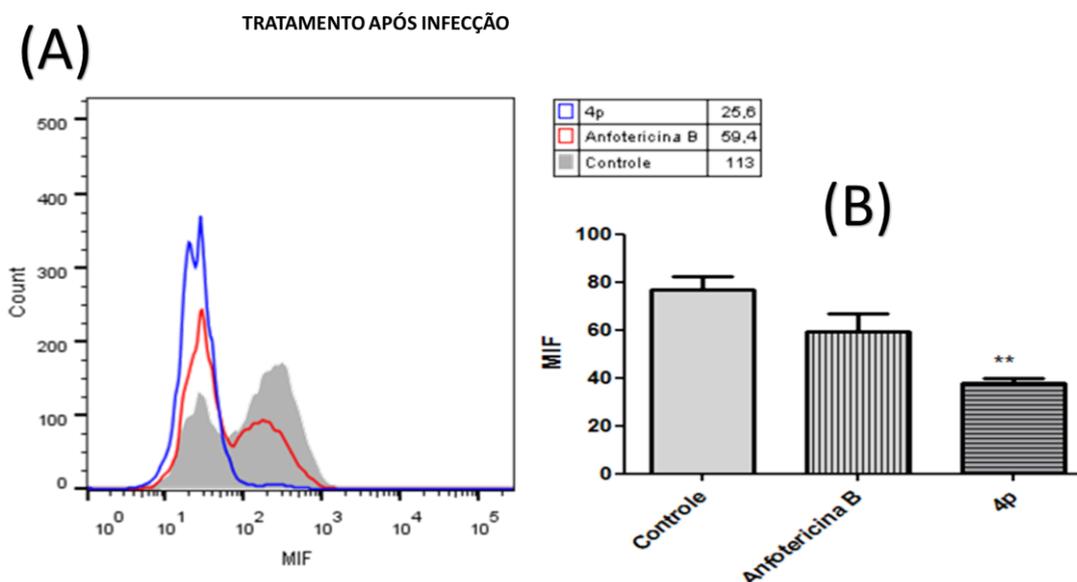


Figura 34. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento de macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* GFP. Macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* GFP, após 48 h de evolução da infecção foram tratados com composto 4p ou anfotericina B (controle positivo) ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo). (A) Histograma representativo dos tratamentos comparados ao controle não tratado (cinza). (B) Os valores representam a média \pm SEM de 3 experimentos independentes. $**p < 0,01$ pelo teste *t* não-paramétrico.

A análise por microscopia confocal das amostras tratadas e controles corroboram com os dados obtidos pela citometria de fluxo. Figura 35A-D registra o controle de autofluorescência, ou seja, macrófagos peritoneais não apresentaram fluorescência endógena que pudesse interferir com os resultados. Pode-se observar uma redução considerável na quantidade de amastigotas presentes nos macrófagos que receberam o tratamento com 4p (Figura 35K e 35L) quando comparado ao grupo controle (Figura 35G e 35H). O grupo tratado com anfotericina B também apresentou redução na quantidade de parasitas, no entanto, esta redução se mostrou inferior àquela observada no tratamento com o composto 4p. Nestas amostras tratadas com anfotericina B, neste esquema de tratamento, também observamos que as células hospedeiras estão com aspecto arredondando, sem os pontos de adesão focais (setas) característicos do processo de adesão celular ao substrato e que são encontrados tanto nas células normais quanto nas células tratadas com o composto 4p.

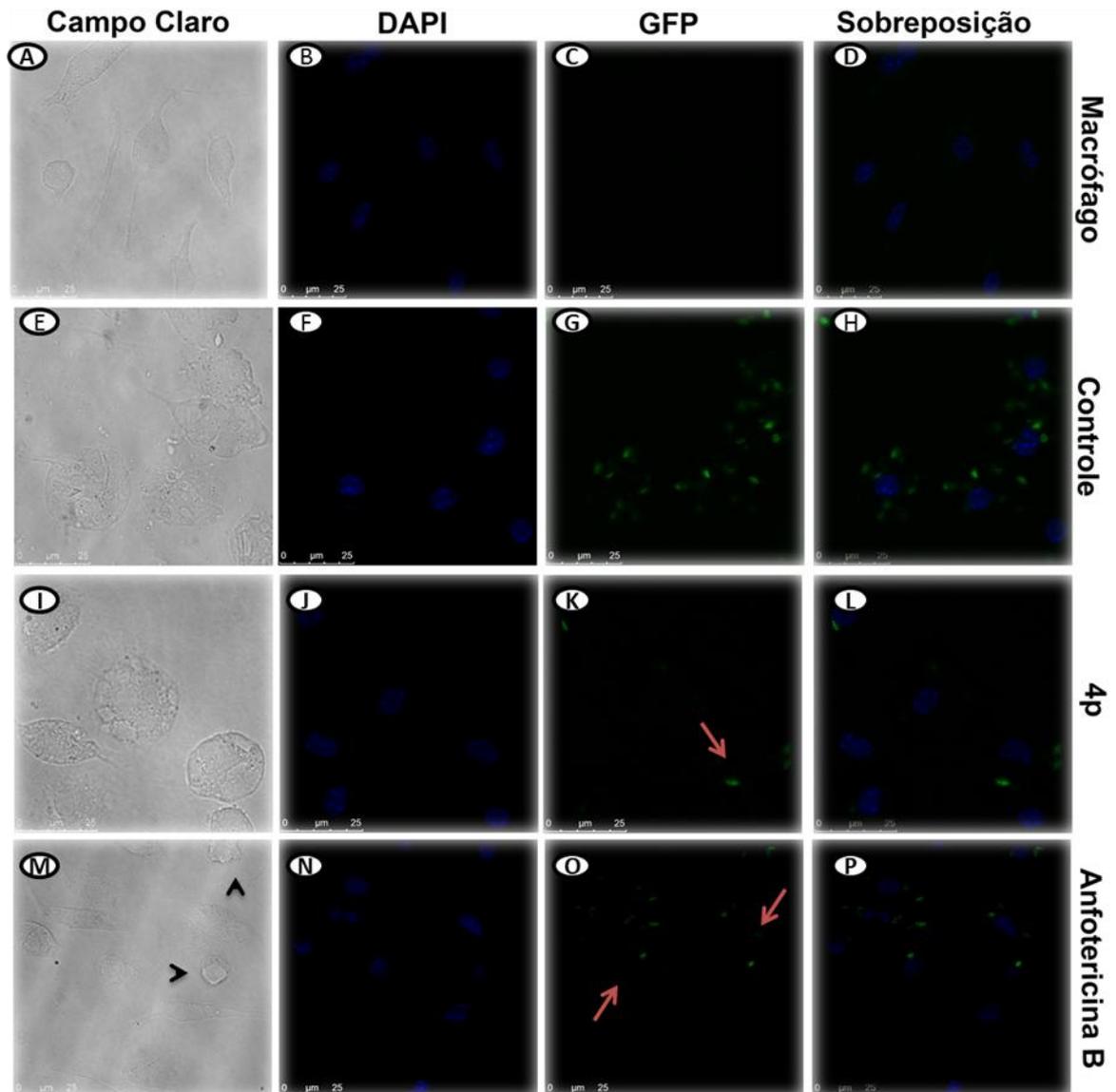


Figura 35. O composto 4p possui atividade leishmanicida no tratamento de macrófagos infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* GFP. Os macrófagos foram infectados com *L. (L.) amazonensis* GFP e após 48 h da evolução da infecção foram tratados a cada 12 h durante 48 h com composto 4p ou anfotericina B (controle positivo) ou com DMSO (controle negativo). (A)-(D) Referem-se ao controle de autofluorescência com os macrófagos peritoneais de camundongo. (E)-(H) representam células infectadas com a *L. (L.) amazonensis* GFP sem nenhum tratamento. (I)-(L) mostram células tratadas com 4p após infecção com *L. (L.) amazonensis* GFP. (M)-(P) representam células tratadas com anfotericina B após infecção com *L. (L.) amazonensis* GFP. O núcleo das células foi corado com DAPI (azul). As análises foram feitas em microscópio confocal de varredura a LASER e mostra a presença de poucas *L. (L.) amazonensis* GFP (verde) após os tratamentos (ver as setas vermelhas). As imagens de contraste de fase (A), (E), (I), (M) e (Q) mostram os aspectos normais da morfologia das células hospedeiras. Barra de referência 25 μm.

5.11. O composto 4p não apresenta atividade hemolítica

O padrão hemolítico foi determinado baseado em Reed e Yalkowsky *et al.* (1985) e Amin e Dannenfelser (2006), que estabeleceram os seguintes padrões de hemólise: valores de hemólise < 10% são considerados não-hemolítico enquanto valores > 25% são considerados hemolítica. Os valores de hemólise encontrados com o teste para o composto 4p foram de 3,22% e anfotericina B no mesmo teste foi de 5,47% (Figura 36). No entanto, ambos os compostos apresentaram resultados inferiores a 10% de hemólise, o que caracteriza a atividade não hemolítica desses compostos. Entretanto, o composto 4p apresentou menor porcentagem de hemólise.

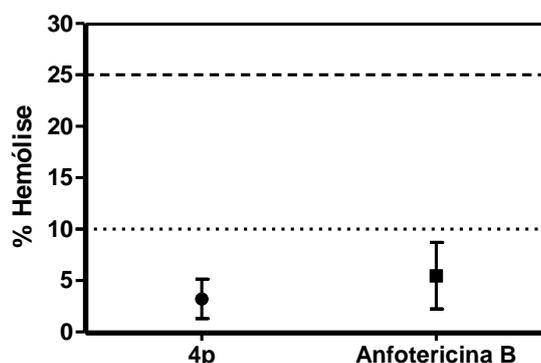


Figura 36. Detecção de hemólise em eritrócitos humanos (O^+) por método *in vitro*. Eritrócitos humanos foram incubados com o composto 4 p (concentração final de 50 $\mu\text{M}/\text{mL}$) ou com anfotericina B (concentração final de 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ou com DMSO (0% de hemólise), ou com água destilada e triton-X (100% hemólise) por 1 h a 37 $^{\circ}\text{C}$. Valores de hemólise < 10% (linha pontilhada) são considerados não-hemolítico enquanto valores > 25% (linha tracejada) de hemólise são indicativos de atividade hemolítica. Cada ponto possui média \pm SD das triplicatas.

6. DISCUSSÃO

Leishmanias são protozoários com um ciclo de vida complexo o qual envolve várias formas de desenvolvimento. As principais formas que podem ser distinguidas no cultivo *in vitro* são promastigota pró-cíclica e promastigota metacíclica. A proliferação dos parasitos envolve uma fase *log*, em que se encontra a forma multiplicativa, mas não infectiva aos mamíferos, denominada pró-cíclica. Nessa fase, estes parasitos são arredondadas e possuem baixa motilidade. A fase estacionária corresponde a fase onde se encontram as formas infectantes para o hospedeiro mamífero, pois as promastigotas metacíclicas se encontram em grande quantidade, e são caracterizadas por apresentarem baixa taxa de divisão celular. Morfologicamente, estas formas são mais afiladas apresentam flagelo relativamente longo e são extremamente móveis (BESTEIRO *et al.*, 2007; GOSSAGE *et al.*, 2003). Os estudos com leishmanias envolvem a realização da curva de crescimento que é de extrema importância uma vez que permite definir os intervalos em dias nos quais existe uma maior probabilidade de se encontrar as diferentes formas da leishmania na cultura que poderão ser empregadas nos experimentos. Observou-se que o crescimento de *L. (L.) amazonensis* (Figura 16) apresentou perfil e densidade de parasitos semelhante a outras curvas descritas por diferentes autores (CAMPOS, 2008; INACIO *et al.*, 2012; PASSOS, 2004) com fase logarítmica de crescimento até dia 4 de cultivo e densidade máxima de $4,2 \times 10^7$ parasitos/mL (dia 6). De forma semelhante, a curva de *L. (L.) amazonensis* GFP (Figura 16) apresentou o perfil típico da curva de crescimento, conservando os mesmos intervalos para as fases de desenvolvimento *in vitro* das leishmanias selvagens. A diferença observada foi na densidade obtida parasitos para todos os intervalos, ficando o seu máximo em $2,3 \times 10^7$ (dia 6), o que representa uma redução absoluta da ordem de 45,23%. No entanto, nossos dados estão de acordo com os resultados descritos por Rocha e colaboradores (2009) para leishmanias apresentando o mesmo tipo de transfecção. Desta forma pudemos estabelecer com confiança que o sexto dia de cultivo para realização dos estudos *in vitro* seria o dia em que a população de leishmanias está mais enriquecida em formas metacíclicas.

A ação leishmanicida do composto 4p sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi investigada pelo ensaio colorimétrico MTT, que avalia indiretamente a viabilidade celular. Baseia-se na capacidade dos parasitos viáveis reduzirem o sal de tetrazólico a cristais de formazan, por ação de enzimas mitocondriais ou citoplasmáticas, os quais podem ser solubilizados com DMSO, gerando uma coloração púrpura, que pode ser mensurada por espectrofotometria (DUTTA *et al.*, 2005). As formas promastigotas de *L. (L.)*

amazonensis tratadas por 48 h com o composto 4p, demonstraram ser sensíveis ao tratamento, uma vez que foi observada uma redução na viabilidade dos parasitas de 66,34%, 43,53%, 45,51% (Figura 17) em relação ao controle para as concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, respectivamente. Como esta metodologia se baseia na medição indireta da atividade mitocondrial, este resultado, como comprovado posteriormente por microscopia eletrônica de transmissão, mostrou morfologia alterada desta organela nos parasitos tratados. Este ensaio foi utilizado ainda para a determinação da concentração inibitória de 50% dos parasitos, que para as condições experimentais utilizadas foi de 50 µM.

Um critério importante na prospecção de novos fármacos (independente de sua ação) é que eles não sejam tóxicos às células normais de mamíferos. Para determinar a seletividade do composto 4p, o mesmo foi testado em macrófagos peritoneais de camundongo. Para esta análise também foi utilizado o método de viabilidade celular, MTT. Os macrófagos peritoneais foram incubados com o composto 4p (50 µM) ou com anfotericina B (0,2 µg/mL) e o meio de cultura foi trocado a cada 12 h. O composto 4p promoveu citotoxicidade semelhante a anfotericina B sobre os macrófagos peritoneais. Foi observada uma redução na viabilidade celular altamente compatível com o que também se observou com o uso da anfotericina B (Figura 31). De forma similar, Ramos e colaboradores (2013) avaliaram o efeito citotóxico do 4p nas concentrações de 50 µM, 100 µM e 500 µM nos tempos de 24 h, 48 h e 72 h sobre fibroblastos de polpa dentária humana e observaram que não ocorreu prejuízos consideráveis na viabilidade destas células. Guido e colaboradores (2014) consideraram a concentração de 400 µM do composto 4p como a concentração máxima não citotóxica para células normais (fibroblasto) em tratamento por período de até 72 h. A concentração com atividade leishmanicida estabelecida por nós foi bem menor que a proposta por Guido e colaboradores (2014) como concentração máxima não citotóxica para célula normal. Por outro lado, Cherón e colaboradores (2003) incubaram macrófagos J774 com 100 µM de anfotericina B por 4 h, e observaram uma redução de 85% na viabilidade celular. Sesana e colaboradores (2011) trataram macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss* por 72 h com anfotericina B nas concentrações de 0,62 µg/mL e 1,25 µg/mL e não observaram redução na viabilidade com a menor concentração. No entanto a concentração de 1,25 µg/mL levou a redução da viabilidade de 30% das células testadas.

Nossos resultados indicam que a redução no número de promastigotas tratadas quando comparadas ao controle passa a ser altamente significativa ($p < 0,001$) à partir do terceiro dia da cultura e manteve-se altamente significativa até o oitavo dia (Figura 18). No dia 5 do

cultivo celular foi observado o pico de diminuição na proliferação celular, aproximadamente 50% de redução em relação ao controle.

O relato do cultivo *in vitro* de formas amastigotas axênicas das espécies *L. (L.) amazonensis* é encontrado em diversos trabalhos como uma forma alternativa de se obter estas formas para experimentação. Hodgkinson e colaboradores (1996) descreveram o cultivo e a caracterização de amastigotas axênicos de *L. (L.) amazonensis* realizando variações do pH e temperatura, obtendo cultivo ótimo em pH 4,6 e a temperatura de 32 °C. Estas variações, incluindo o tempo de manutenção *in vitro*, vem sendo amplamente utilizadas para induzir a conversão das formas promastigotas em formas amastigotas, aplicadas a diversas espécies de *Leishmania*, sem a necessidade da infecção de células e posterior purificação dos parasitas (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998; DA SILVA, 2008; DE AQUINO, 2014; TEIXEIRA *et al.*, 2002; TIUMAN *et al.*, 2014). No presente estudo foram obtidas formas amastigotas axênicas à partir de promastigotas em fase estacionária inicial, cultivadas em pH 5,5 e temperatura de 32 °C. Os parasitos obtidos apresentaram morfologia oval, arredondada e ausência de flagelo livre (Figuras 23 e 24). As formas amastigotas obtidas mantiveram a capacidade de reverter à forma promastigota quando cultivadas pH 7,4, suplementado com 5% SFB, e mantidas a 26 °C (Figura 25 e 26). A capacidade de reversão da forma amastigota para promastigota é característica das formas amastigotas intracelulares. A manutenção desta capacidade pelos parasitas valida o potencial biológico das formas amastigotas e vêm sendo amplamente utilizada por outros autores (BALANCO *et al.*, 1998; DA SILVA, 2008; GUPTA *et al.*, 2001; MORAIS-TEIXEIRA, 2008; TEIXEIRA *et al.*; 2002; GADELHA *et al.*, 2013).

Diferentes técnicas de microscopia vêm sendo utilizadas como uma ferramenta útil para avaliar o efeito de drogas sobre micro-organismos e principalmente na identificação de possíveis alterações morfológicas na superfície celular ou em organelas do parasita, auxiliando na elucidação da atividade dos compostos sobre os possíveis alvos terapêuticos (ADADE e SOUTO-PADRÓN, 2010).

Ao analisar a morfologia das formas promastigotas por MEV, foi possível confirmar as alterações causadas pelo tratamento com 4p (Figura 19). No tempo de 24 h não foram observados alterações significativas na morfologia das promastigotas tratadas. Já no tempo de 48 h de tratamento ocorreram severas modificações morfológicas com destaque para o enrugamento da superfície celular e perda do formato alongado do corpo celular do parasito (corpo celular arredondado). A análise das amostras sob 72 h de tratamento revelou a perda da forma alongada do corpo celular das promastigotas, e de forma muito recorrente a presença

de flagelo deformado, com a extremidade achatada (Figura 19H). Estas alterações podem ser causadas pela desestabilização do citoesqueleto dependente de tubulinas uma vez que tanto a forma do corpo do parasito quanto a integridade do flagelo são altamente dependentes da estabilidade dos microtúbulos (ADADE e SOUTO-PADRÓN, 2010; GADELHA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014).

As análises das células tratadas com 4p analisadas por MET mostraram no tempo de 24 h (Figura 20) promastigotas com alteração nuclear e inchaço mitocondrial e presença de vacúolos. Ação semelhante foi observada tais como o inchaço da mitocôndria, desorganização celular e alterações nucleares em outros tratamentos (VENDRAMENTO *et al.*, 2010; SANTA RITA *et al.*, 2005). Alterações mitocondriais podem estar relacionadas com morte celular por apoptose (GODINHO *et al.*, 2013). No tempo de 48 h de tratamento (Figura 21), observou-se alterações drásticas no cinetoplasto. Vários autores demonstraram alterações semelhantes no cinetoplasto (GUIMARÃES *et al.*, 2010; UEDA-NAKAMURA, 2006). Está é uma organela presente apenas em protozoários tripanossomatídeos e é, portanto, um alvo importante para ação de drogas, devido a sua função e estrutura única (ADADE e SOUTO-PADRÓN, 2010; DE SOUZA, *et al.*, 2009; SEN e CHATTERJEE, 2011). Nos tempos de 48 h e 72 h foi observado a presença de restos celulares de promastigotas (Figura 22).

As formas amastigotas também foram analisadas por MEV. Nossos resultados sugerem que as formas amastigotas foram mais sensíveis ao tratamento com 4p (Figura 27). No tempo de 24 h de tratamento foi observada a presença de elevações, semelhantes à vesículas no corpo celular das formas amastigotas. Em 48 h de tratamento foi notada a existência de amastigotas com o corpo celular deformado. No tempo de 72 h de tratamento foram observadas células inchadas com alterações na membrana plasmática. Veiga-Santos e colaboradores (2013) demonstraram a formação de bolhas no corpo celular de epimastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com piperlonguminina e piperovatina. As alterações ultraestruturais localizadas principalmente na membrana plasmática e mitocôndria sugerem que piperlonguminina e piperovatina induzem morte autofágica apenas em amastigotas.

A análise por MET das amastigotas tratadas (Figuras 28, 29, 30) revelou a presença de diversos vacúolos, o que é indicativo de um processo de remodelação celular intensa que pode ser associada ao processo de autofagia, ou a extrema depleção de ATP devido às alterações morfológicas observadas na mitocôndria, o que estaria comprometendo a sua atividade. Este

processo é frequentemente observado em parasitos submetidos a diversos tipos de tratamentos (GODINHO *et al.*, 2013; RODRIGUES e DE SOUZA, 2008).

Os modelos de infecção *in vitro* empregando macrófagos peritoneais são extremamente úteis e amplamente empregados para avaliação da atividade de drogas contra diferentes espécies de *Leishmania*. Sendo o modelo que mais se aproxima das condições da infecção *in vivo*, na qual os parasitos *Leishmania* são encontrados predominantemente na forma amastigota dentro dos macrófagos (CARNEIRO *et al.*, 2012; CHÁVEZ ENCISO *et al.*, 2014; MADEIRA *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2013; TANAKA *et al.*, 2007). Os macrófagos podem metabolizar e ativamente concentrar as drogas dentro dos fagolisossomos, organela que contém os parasitos. Os sistemas que empregam as formas amastigotas intracelulares permitem também a avaliação da influência do macrófago sobre a atividade da droga leishmanicida. (BERMAN e NEVA, 1981; BERMAN e WYLER, 1980; SEIRFERT *et al.*, 2010; TOCHIGI *et al.*, 2005).

No presente estudo, e com o intuito de avaliar os efeitos do composto 4p também sobre o processo de fagocitose foram realizados pré e pós-tratamento dos macrófagos peritoneais. Para o monitoramento dos eventos celulares a infecção foi promovida utilizando *L. (L.) amazonensis* GFP. A utilização de gene repórter com propriedade fluorescente provê meios para verificar a viabilidade do parasito indiretamente através da citometria de fluxo (FOUCHET *et al.*, 1993), sendo altamente aplicável no estudo de novas moléculas leishmanicidas. Isso elimina a subjetividade de sistemas visuais de análise e promove testes mais rápidos, com elevado número de eventos, aumentando a sensibilidade, confiabilidade, conveniência e possibilitando a triagem em larga escala de novas moléculas (SERENO *et al.*, 2007). O pré-tratamento dos macrófagos peritoneais com o composto 4p (Figuras 32 e 33) e também com a anfotericina B resultou em uma significativa redução da infecção em relação ao controle. O pré-tratamento seguido da continuidade de tratamento pós-infecção com o composto 4p mostrou ser mais eficaz na eliminação dos parasitos. O efeito leishmanicida acentuado que foi observado com o pré-tratamento pode ter sido devido ao acúmulo das drogas nos macrófagos. Diversas evidências demonstraram que a anfotericina B pode ser acumulada nos macrófagos, o que promove uma maior exposição dos parasitos à droga quando estes são fagocitados (ESPUELAS *et al.*, 2003; GUPTA *et al.*, 2014; JAHN, 1998; LEGRAND *et al.*, 1996; SMITH *et al.*, 2007). Foi demonstrado *in vivo* que clofazimina um antimicrobiano ativo contra bactéria *Mycobacterium leprae*, se acumula maciçamente em macrófagos quando administrado oralmente durante períodos prolongados. A sua

bioacumulação pode estar associada ao efeito farmacológico e também aos efeitos secundários (BAIK *et al.*, 2013; BAIK e ROSANIA, 2012). Os macrolídios, por exemplo azitromicina, são concentrados intracelularmente em diversos tipo de células, incluindo leucócitos polimorfonucleares, fibroblastos, monócitos e macrófagos alveolares, resultando em uma vantagem para o tratamento de patógenos intracelulares (SCHLOSSBERG, 1995; TOGAMI, *et al.*, 2014; WILDFEUER *et al.*, 1996)

O composto 4p também apresenta efeito leishmanicida no tratamento dos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* GFP (Figuras 34 e 35). Neste ensaio a anfotericina B empregada como droga controle não foi extremamente ativa contra as formas amastigotas intracelulares. Isso provavelmente é devido ao modelo utilizado no tratamento (0,2 µg/mL) ter sido inferior às concentrações encontradas no plasma de humanos (1,0 µg /mL) (BERMAN e WYLER, 1980). O modelo aplicado neste trabalho foi baseado em Morais-Teixeira e colaboradores (2008). De qualquer forma, os resultados com o composto 4p demonstraram sua eficiência tanto na eliminação dos parasitas intracelulares quanto na redução do número de células infectadas. Estes resultados sugerem que o uso de drogas que atuem interferindo com a dinâmica dos microtúbulos das leishmanias são candidatas a análises *in vivo* uma vez que ficou demonstrado em nossos ensaios a sua atividade leishmanicida *in vitro*.

A classe de DHPM parece ser um bom ponto de partida para o aprimoramento de sua estrutura química visando o incremento da afinidade com as tubulinas das leishmanias o que poderia reduzir os efeitos adversos severos nos mamíferos. Os principais medicamentos empregados contra a leishmaniose, como os antimoniais e a anfotericina B, passaram por etapas de aprimoramento no sentido de reduzir a toxicidade e consequentemente efeitos adversos. O antimônio trivalente foi utilizado inicialmente contra a leishmaniose, e obteve algum sucesso, uma vez que como não existia tratamento, cerca de 90% dos doentes evoluíam para o óbito. No entanto, esta formulação era de difícil administração e apresentava toxicidade como tosse, dor no peito e depressão. Com a introdução do antimônio pentavalentes houve redução de alguns efeitos adversos (SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004). A anfotericina B é insolúvel em meio aquoso e, em sua formulação tradicional, é apresentada como uma mistura com o desoxicolato. A infusão intravenosa da mistura coloidal causa severos efeitos tóxicos, destacando efeito renal. Com o propósito de diminuir a toxicidade, novas formulações lipídicas foram desenvolvidas, sendo incorporada pelos macrófagos e assim praticamente não interage com o colesterol das células do hospedeiro, aumentando a eficácia e tolerabilidade

(SOARES-BEZERRA *et al.*, 2004; revisado por MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; SOLOMON *et al.*, 2007).

Entre os ensaios de toxicidade *in vitro* encontra-se o teste de hemólise, que permite quantificar e avaliar os efeitos dos excipientes ou do fármaco sobre a membrana plasmática das hemácias e a consequente liberação de hemoglobina. O ensaio de hemólise é interessante nos caso de produtos cujo emprego seja destinado à interface com o sangue ou derivados, como no caso do uso de uma formulação de uso injetável, e é aplicável também a produtos de uso tópico entre outros (PINTO *et al.*, 2010). Várias metodologias são utilizadas para realizar o teste de hemólise, que geralmente consiste na incubação da substância com o sangue, em seguida centrifugação e a leitura do sobrenadante por espectofotometria (KNOPIK-SKROCKA e BIELAWSKI, 2005; MALAGOLI, 2007; PINTO *et al.*, 2010, TAKAHASHI *et al.*, 2013). No protocolo que padronizamos baseado em Reed, Yalkowsky e colaboradores (1985) bem como em Amin e Dannenfelser (2006), após a incubação as amostras foram lavadas várias vezes o intuito de retirar a interferência da cor do composto na leitura.

A hemólise refere-se à lise ou ruptura das membranas das hemácias permitindo a liberação da hemoglobina para o plasma e tendo como consequência a hemoglobinemia, que pode resultar em irritação vascular, flebite, anemia, icterícia, insuficiência renal e, em alguns casos, até morte. Algumas drogas por si só são hemolíticas, porém a avaliação da formulação é de extrema importância para se excluir da utilização excipientes que apresentem capacidade hemolítica. Neste contexto, ensaios que visam verificar a capacidade hemolítica de um composto é uma ferramenta extremamente útil, usada para avaliar a segurança e utilidade de um fármaco (AMIN e DANNENFELSER, 2007; CARVALHO *et al.*, 2007; CHORILLI *et al.*, 2009; KALEGARI *et al.*, 2011, KRZYNZANIAK *et al.*, 1997). O teste de hemólise realizado demonstrou que o composto 4p não induz toxicidade relevante para a membrana do eritrócito assim como a anfotericina B, utilizada como controle de droga leishmanicida (Figura 36). Ambos os compostos de acordo com nossos dados estão dentro da faixa que agrupa compostos não hemolíticos. Takahashi e colaboradores (2013) realizaram o teste hemolítico com a anfotericina B com varias concentrações (7,81-500 µg/mL), e encontraram um índice de hemólise de aproximadamente 80% para as concentrações acima da concentração de 62,5 µg/mL. Moreira e colaboradores (2013) mostraram que as concentrações plasmáticas de miltefosina encontradas durante o tratamento de leishmaniose (31-90 µg/mL) indicaram um nível hemolítico de 2-5%. Parece que a miltefosina é moduladora da jangada lipídica, sendo que as proteínas com maior hidrofobicidade pode

induzir a penetração dos grupos hidrofílicos da miltefosina para a membrana e provocar a ruptura da membrana plasmática dos eritrócitos. Esteves e colaboradores (2010) realizaram um teste de hemólise com análogos de trifluralina e miltefosina, ambos na concentração de 100 μ M, os primeiros apresentaram valores de hemólise menor que 2%, já a miltefosina apresentou 96% de hemólise.

Neste trabalho foi demonstrado que o composto 4p apresenta atividade leishmanicida *in vitro* tanto contra as formas promastigotas quanto contra as formas amastigotas da *L. (L.) amazonensis*. Ensaio de infecção experimental *in vitro* demonstraram que este composto é eficiente na eliminação dos parasitos intracelular tanto quando aplicados em regime de pré-tratamento como também quando aplicado com a infecção já em curso. Sendo assim, a classe das DHPMs pode representar um promissor caminho, no que diz respeito a arquitetura molecular, para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas alvo dirigido.

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho nos permitem concluir que:

- 1- O composto 4p apresenta efeito citotóxico contra as formas promastigotas da *L. (L.) amazonensis*;
- 2- O composto 4p apresentou um efeito antiproliferativo observado pela modificação dos índices celulares presentes nas diferentes fases da curva de crescimento das formas promastigotas tratadas;
- 3- A metodologia empregada gerou formas amastigotas a partir da conversão *in vitro* de formas promastigotas que apresentaram aspectos morfológicos e ultraestruturais característicos para este estágio adaptativo;
- 4- As formas amastigotas foram capazes de se converter em promastigotas mediante sua incubação em condições de cultivo conforme ocorre naturalmente com as leishmanias;
- 5- A análise das alterações ultraestruturais nas formas promastigotas e amastigotas tratadas com o composto 4p sugere que o composto parece interferir nos microtúbulos, promovendo concomitantemente alterações estruturais nas mitocôndrias;
- 6- O composto 4p apresentou citotoxicidade semelhante à induzida pela anfotericina B em macrófagos peritoneais de camundongo *Swiss*;
- 7- Foi identificada em nosso trabalho a atividade leishmanicida do composto 4p em dois diferentes esquemas de tratamento (pré-tratamento e no pós-tratamento) nas infecções experimentais *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongo;

8. PERSPECTIVAS

Os efeitos do composto 4p nas formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* contribuíram para a validação de uma arquitetura molecular que poderá ser utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos contra leishmaniose. Entretanto, estudos futuros tanto *in vitro* e *in vivo* são necessários para melhor compreensão do mecanismo de ação do composto 4p. Além da realização de estudos adicionais com outras espécies de leishmanias, como também com outros gêneros de protozoários patogênicos. Nosso grupo está trabalhando *in silico* a partir de dados de dinâmica molecular, para a determinação dos sítios de interação entre o composto 4p e a proteína alvo (tubulina). Estes dados serão utilizados para o aprimoramento da molécula visando aumentar a sua afinidade com as tubulinas. Esperamos assim reduzir o IC₅₀ aqui estabelecido, incrementar os efeitos leishmanicidas do composto e talvez reduzir a sua citotoxicidade para células de mamíferos.

9. REFERÊNCIAS

- ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; CUPOLILO, S. M. N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C .S. F.; GONCALVEZ DA COSTA, S. C. Histopatological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**, v. 121, p. 179-187, 2004.
- ADADE C. M.; SOUTO-PADRON, T. Contributions of ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 178-187, 2010.
- ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; GÓMEX, M. J.; SÁNCHEZ-GOROSTIAGA, M.; MORENO-PAZ, M.; GONZÁLEZ-PASTOR, E.; TORANO,V.; PARRO,A.; LARRAGA,V. Temperature Increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation In *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11-31, 2010.
- ALVAR, J.; CROFT , S. L.; KAYE, P., KHAMESIPOUR, A., SUNDAR, S; REED, S. G. Case study for a vaccine against leishmaniasis. **Vaccine**, v. 31s, p. B244-B249, 2013.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLOS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- ALVIM, H. G. O.; DE LIMA, T. B.; DE OLIVEIRA, A. L.; DE OLIVEIRA, H. C.; *et al.* Facts, Presumptions, and Myths on the Solvent-Free and Catalyst-Free Biginelli Reaction. What is Catalysis for ? **Journal of Organic Chemistry**, v. 79, p. 3383-3397, 2014.
- ALVIM, H. G. O.; DE LIMA, T. B.; DE OLIVEIRA, H. C. B.; GOZZO, F.C.; *et al.* Ionic liquid effect over the biginelli Reaction under homogeneous and heterogeneous catalysis. **ACS Catalysis**, v. 3, p.1420-1430, 2013.
- AMIN, K.; DANNENFELSER, R. *In Vitro* Hemolysis: Guidance for the pharmaceutical Scientist. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 6, p.1173-76, 2006.
- ASHOK, P.; LATHIYA, H.; MURUGESAN, S. Manzamine alkaloids as antileishmanial agents: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, p. 1-9, 2014.
- BAIK, J.; ROSANIA, G. R. Macrophages Sequester Clofazimine in na Intracellular Liquid Crystal-like Supramolecular organization. **PLOS ONE**. v. 7, n. 10, p. e47494, 2012.
- BAIK, J.; STRINGER, K. A.; MANE, G.; ROSANIA, G. R.; Multiscale distribution and bioaccumulation analysis of clofazimine reveals a massive immune sustem-mediated xenobiotic sequestration response. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 3, p. 1218-1230, 2013.

- BALANÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, p. 435-443, 1998.
- BALANCO, J. M. F.; PRAL, E. M. F.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A. T.; MORTARA, R. A.; ALFIERI, S.C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmania braziliensis* amastigote-like stages. **Parasitology**, v. 116, p.103-113, 1998.
- BANGS, J. D.; RANSOM, D. A.; NIMICK, M.; CHRISTIE, G. H. *In vitro* cytotoxic effects on *Trypanosoma brucei* and inhibition of *Leishmania major* GP63 by peptidomimetic metalloprotease inhibitors. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 114, p. 111-117, 2001.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances Parasitology**, v. 64, p. 1-109, 2007.
- BARRET, M. P; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, p. 175-196, 2012.
- BERMAN, J. D. Current treatment approaches to leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v.16, n.5, p.397-401, 2003.
- BERMAN, J. D.; BADARO, R.; THAKUR;C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.V.; KUZOE, F.; PANG, L. ;WEERASURIYA, K.; BRYCESON, A. D. Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, p.25–32. 1998.
- BERMAN, J. D.; NEVA, F. A. Effect of Temperature on Multiplication of *Leishmania* Amastigotes within Human Monocyte-Derived Macrophages in Vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 30, p.318-321, 1981.
- BERMAN, J. D.; WADDELL, D.; HANSON, B. D. Biochemical mechanisms of the leishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 27, p.916-920, 1985.
- BERMAN, J. D.; WYLER, D. J. An *in vitro* model for investigation of chemotherapeutic agents in leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 142, n.1, p.83-86, 1980.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-1075, 2007.
- BEVERLEY, S. M; CLAYTON, C. E. Transfection of *Leishmania* and *Trypanosoma brucei* by electroporation. **Methods in Molecular Parasitology**, v. 21, p. 333-348, 1993.
- BHATTACHARYA, S. K.; JHA, T. K.; SUNDAR, S.; *et al.* Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 2, p.217-221. 2004.

- BIGINELLI, P. Intorno ad uramidi aldeidiche dell'etere acetilacetico. **Gazzeta Chimica Italiana**, v. 21, p. 455-461, 1891.
- BLASCO, M. A.; THUMANN, S.; WITTMANN, J.; GIANNIS, A.; GRÖGER, H. Enantioselective biocatalytic synthesis of (S)-monastrol. **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 15, p. 4679-4682, 2010.
- Boletim Anual/2013. Informativo Ambiental das Leishmanioses no DF. Disponível em: <<http://www.saude.df.gov.br/outros-links/informes-epidemiologicos/438-informes-epidemiologicos-leishmaniose-.html>> Acesso em 30/06/2014.
- CALLAHAN, H. L.; KELLEY, C.; PEREIRA, T.; GROGL, M. Microtubule inhibitors: structure-activity analysis suggest rational models to identify potentially active compounds. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p.947- 952, 1996.
- CAMPOS, J. F. F. **Ação leishmanicida *in vitro* de miltefosine em formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e estudo *in vivo* de sua eficácia no tratamento da leishmaniose cutânea experimental**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade de Brasília, Brasília.
- CARNEIRO, L. A; LAURENTI, M. D.; CAMPOS, M. B. Susceptibility of peritoneal macrophage from different species of neotropical primates to ex vivo *Leishmania (L.) infantum chagasi*-infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, n. 54, v. 2, p.95-101, 2012.
- CARVALHO, E. B.; *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2, p. 149-152, 2007.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. Parasites - leishmaniasis. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em 30 agosto de 2013.
- CHABNER, B. A.; AMREIN, P. C; DRUKER, B. J.; *et al.* Agentes antineoplásicos. In: **Goodman & Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed., p. 1185-1264, 2006.
- CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 152, p. 605-612, 1988.
- CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2010.
- CHALFIE, M. Green Fluorescent Protein. **Photochemistry and Photobiology**, v. 62, p. 651-656, 1995.
- CHALFIE, M.; YU, T.; GUSKIRCHEN, G.; WARD, W. W.; PARSHER, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science**, v. 263, p. 802-805, 1994.

- CHAN, M. M.Y; BULINSKI, J. C.; CHANG, K. P; FONG, D. A. Microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric Green fluorescent protein. **Parasitology Research**, v. 89, p. 266–271, 2003.
- CHAN, M. M.; FONG, D. Plant microtubule inhibitors against trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 10, n. 11, p.448-451, 1994.
- CHÁVEZ ENCISO, N. A.; COY-BARRERA, E. D.; PATIÑO, O, J; *et al.* Evaluation of the Leishmanicidal Activity of Rutaceae and Lauraceae Ethanol Extracts on Golden Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Peritoneal Macrophages. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.76, n.3, p. 188-197, 2014.
- CHERÓN, M.; PETIT, C.; BOLARD, J.; GABORIAU, F. Heat-induced reformulation of amphotericin B-deoxycholate favours drug uptake by the macrophage-like cell line J774. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 904–910, 2003.
- CHIANG, A. N. ; VALDERRAMOS, J. C.; BALACHANDRAN, R. *et al.* Select pyrimidinones inhibit the propagation of the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 1527, 2009.
- CHORILLI, M.; TAMASCIA, P.; ROSSIM, C.; SALGADO, H. R. N. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19-30, 2009.
- COLASANTE, C.; VONCKEN, F.; MANFUL, F. Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei*. **F1000Research**, v. 1, p. 2-27, 2013.
- CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P.; SOARES, M. J. *Leishmania (Viannia) lainsoni* (Silveira *et al.*, 1987): ultrastructural aspects of the parasite and skin lesion in experimentally infected hamster (*Mesocricetus auratus*). **Parasitology Research**, v. 100, n. 6, p. 1227–1232, 2007.
- COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I. C.; SAMPAIO, R. N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, p. 111–126, 2006.
- CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology today Personal ed**, v. 16, n. 4, p. 142-144, 2000.
- CYSNE-FINKELSTEIN, L., TEMPORAL, R. M., AGUIAR ALVES, F., AND LEON L. L. *Leishmania amazonensis*: Long-term cultivation of amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 89, p.58–62, 1998.
- DA SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicas e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas.** 2008, 120 f.

- Dissertação (Mestrado em biotecnologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- DA SILVA, M. F. L., ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M., BEVERLEY, S. M., FLOETER-WINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* Arginase Compartmentalization in the Glycosome Is Important for Parasite Infectivity. **PLOS ONE**. v. 7, n. 3, e34022, 2012.
- DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatology and Therapy**, v. 22, n. 6, p. 491-502, 2009.
- DAVIDSON, R. N. Leishmaniasis. **Medicine**. v. 33, p. 43-46, 2005.
- DAVIDSON, R.N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs**, v.56, n.6, p.1009-1018, 1998.
- DE AQUINO, D. S. **Avaliação do efeito microbicida da filoseptina-1 nas formas amastigoras de *Leishmania amazonensis in vitro***. 2014, 66 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade de Brasília, Brasília.
- DE SOUZA, W. An Introduction to the Structural Organization of Parasitic Protozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, p. 822-838, 2008.
- DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313-325, 2008.
- DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, p. 1013-1025, 2002.
- DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n. 10, p.2069-2080, 2009.
- DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA E SILVA, N. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 67-124, 2009.
- DEGRAVE, W.; FERNANDES O.; CAMPBELL, D.; BOZZA, M.; LOPES; U. Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania*-a minireview. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 463-469, 1994.
- DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F. Pentavalent antimonials: from chemistry to the design of new drugs. **Drug Design Reviews**, v. 2, n. 3, p. 243-249, 2009.
- DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECCOUVEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenosine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1570, n. 3, p.192-198, 2002.

- DENTON, H.; MCGREGOR, J. C.; COOMBS, G.H. Reduction of antileishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol dependent reductase TDR1. **The Biochemical Journal**, v. 381, p. 405-412, 2004.
- DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.
- DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-261, 2005.
- DORVAL, M. E. C.; OSHIRO E. T.; CUPOLLILO E.; CAMARGO DE CASTRO A. C.; ALVES, T. P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 43-46. 2006.
- DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119-122, 2005.
- ESPUELAS, M. S.; LEGRAND, P.; CAMPANEROS, M. A.; APPEL, M.; CHÉRON, M.; GAMAZO, C.; BARRATT, G. IRACHE, J. M. Polymeric carriers for amphotericin B: *in vitro* activity, toxicity and therapeutic efficacy against systemic candidiasis in neutropenic mice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, 419-427, 2003.
- ESTEVEZ, M. A.; FRAGIADAKI, I.; LOPES, R.; SCOULICA, E.; CRUZ, M. E. M.; Synthesis and biological evaluation of trifluralin analogues as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 274-281, 2010.
- FERNÁNDEZ, M. M., MALCHIODI, E. L., ALGRANATI, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p.86–93, 2011.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n.11, p. 2758-2770, 2011.
- FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1- 7, 2011.
- FOUCHET, P.; JAYAT, C.; HECHARD, Y.; RATINAUD, M. H.; FRELAT, G. Recent advances of flow cytometry in fundamental and applied microbiology. **Biology of the Cell**, v.78, p.95-109, 1993.
- FREZARD, F.; MARTINS, P. S.; BARBOSA, M. C. M. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonite and sodium stibogluconate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 656–665, 2008.

- GADELHA, A. P. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SOUZA, W. DE. Assembly of the *Leishmania amazonensis* flagellum during cell differentiation. **Journal of structural biology**, v. 184, n. 2, p. 280–92, 2013.
- GARCIA, F.P.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; UEDA-NAKAMURA, T.; *et al.* Eupomatenoid- 5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces Apoptosis in *Leishmanias amazonensis*. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 940531, 2013.
- GASSER, J. R. R. A.; MAGILL, A.J.; OSTER, N.; FRANKE, E. D.; GRÖGL, M.; BERMAN, J.D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 83-90, 1994.
- GIL, E. S.; CUNHA, L. C.; PAULA, J. R.; BEZERRA, J. C. B. E AGUIAR, F. A. Leishmaníase: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares **Vita et Sanitas**, Trindade/Go, v. 1, n. 01, 2007.
- GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the leishmania life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473-479, 2010.
- GODINHO, J. L. P; GEORGIKOPOULOU, K.; CALOGEROPOULOU, T. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**. v. 135, p. 153-165, 2013.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, n. 3, p. 1027-1034, 2003.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, n.4, p. 419-433, 2010.
- GUIDO, B. C. **Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) sobre células do adenocarcinoma mamário humano.** 2014, 138 f.Tese(Doutorado em Patologia Molecular)- Universidade de Brasília, Brasília.
- GUIMARÃES, RODRIGUES. L.; *et al.* Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania* (L.) *amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 5, p. 1075-1081, 2010
- GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends Parasitology**, v. 17, n. 3, p. 150-153, 2001.
- GUPTA, P. K.; ASTHANA, S.; JAISWAL, A. K.; *et al.* Exploitation of lectinized lipopolymerosome encapsulated Amphotericin B to target macrophages for effective chemotherapy of visceral leishmaniasis. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1091-1102, 2014.

- HA, D. S.; SCHWARZ, J. K.; TURCOB, J.; BEVERLEY, M.; Use of the green fluorescent protein as a marker in tranfected Leishmania. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 77, p. 57–64, 1996.
- HATAM, G. R.; BAHRAMI, S.; RAZAVI, S. M.; ORYAN, AHMAD. Isoenzyme and ultrastructural characterization of *Leishmania tropica* axenic amastigotes and promastigotes. **Parasitology Research**, v. 112, p. 643-648, 2013.
- HEPBURN, N. C.; Cutaneous leishmaniasis: an overview. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 49, p. 50-54, 2003.
- HODGKINSON, V. H.; SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; McMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: cultivation and characterization of axenic amastigote-like organisms. **Experimental Parasitology**, v. 83, n. 1, p. 94-105, 1996.
- HUSZAR, D.; THEOCLITOU, M. E.; SKOLNIK, J.; HERBST, R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 1-2, p.197–208, 2009.
- INACIO, J. D. F.; CANTO-CARVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 151-155, 2012.
- Informativo Epidemiológico das Leishmanioses no DF. Ano 5, nº 2/2013. Disponível em: < <http://www.saude.df.gov.br/outros-links/informes-epidemiologicos/438-informes-epidemiologicos-leishmaniose-.html>> Acesso em 30 junho de 2014.
- JAHN, B.; RAMPP, A.; DICK, C.; JAHN, A.; PALMER, M.; BHAKDI, S. Accumulation of Amphotericin B in Human Macrophages Enhances Activity against *Aspergillus fumigatus* Conidia: Quantification of Conidial Kill at the Single-Cell Level. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 42, n.10, p. 2569–2575, 1998.
- JAYANARAYAN, K. G.; DEY, C. S. Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in in *Leishmania*. **Journal of Clinial Pharmacy and Therapeutics**,v.27, n.5, p.313-20, 2002.
- KAAN, H. Y.; ULAGANATHAN, V.; RATH, O. *et al.* Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimitotic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol. **Journal of Medical Chemistry**, v. 53, n. 15; p.5676-5683, 2010.
- KALEGARI, M. *et al.* Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.
- KAMAU, S. W; GRIMM, F.; HEHL, A. B. Expression of green fluorescent protein as amarker for effects of antileishmanial compounds in vitro. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 12, p. 3654–3656, 2001.

- KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type- a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1043-1052, 2000.
- KAPPE, C. O. 100 years of the biginelli dihydropyrimidine synthesis. **Tetrahedron**, v. 49, n. 32, p. 6937-6963, 1993.
- KATIYAR, S. K.; GORDON, V. R.; McLAUGHLIN, G. L.; EDLIND, T. D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with beta-tubulin sequence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 38, v. 9, p. 2086-2090, 1994.
- KAUR, G.; RAIJUT, B. Comparative Analysis of the Omics Technologies Used to Study Antimonial, Amphotericin B, and Pentamidine Resistance in Leishmania. **Journal of Parasitology Research**, 2014.
- KHAW, M.; PANOSIAN, C. B. Human antiprotozoal therapy: past, present, and future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 3, p.427-439, 1995.
- KIM, J.; OK, T.; PARK, C; SO, W. *et al.* A novel 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one: HIV-1 replication inhibitors with improved metabolic stability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, p. 2522–2526, 2012.
- KNOPIK-SKROCKA, A.; BIELAWSKI, J. Differences in amphotericin-B-induced hemolysis between human erythrocytes from male and female donors. **Biological Letters**, v. 42, n. 1, p. 49-60, 2005.
- KOHL, L.; GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 93, n. 1, p. 1–9, 1998.
- KRZYŃZANIAK, J. F.; ALVAREZ NUNEZ, F. A.; RAYMOND, D. M.; YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells 4: Comparison of in vitro and in vivo hemolysis. **Journal of Pharmacist Sciences**, v. 86, n. 11, p. 1215-1217, 1997.
- LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Ver Pan-Amaz Saude**, v.1, p.13-32, 2010.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. New World Leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* Species. **Microbiology and Microbial Infections**, 9th ed., Vol. 5 Parasitology, Arnold, London, p. 242-266, 1998.
- LANDFEAR, S. M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 115, n. 1, p. 1–17, 2001.
- LEGRAND, P.; VERTUT-DOI, A.; BOLARD, J. Comparative internalization and recycling of different amphotericin B formulations by a macrophage-like cell line. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 37, p. 519-533, 1996.
- LIMA, C. D.; SOUZA, L.C. Novas formas comerciais de anfotericina B. **Revista Ciências Médicas**, v. 14, n.2, p. 187-197, 2005.
- LUCUMI, A.; ROBLEDO, S. B.; GAMA, V.; SARAIVIA, N.G. Sensitivity of *Leishmania Viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable

- DNA-protein complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 1990-1995, 1998.
- MAAROUF, M.; LAWRENCE, F.; BROWN, S.; ROBERT-GERO, M. Biochemical alterations in paramomycin treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 83 n. 2, p. 198-202, 1997.
- MADEIRA, M. F; BARBOSA-SANTOS, E. G. O.; MARZOCHI, M. C. A. Experimental Infection of Canine Peritoneal Macrophages with Visceral and Dermotropic *Leishmania* Strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 645-648, 1999.
- MALAGOLI, D. A full-length protocol to test hemolytic activity of palytoxin on human erythrocytes. **Invertebrate Survival Journal**, v. 4, p. 92-94, 2007.
- MARGARET, A.; PHILLIPS E SAMUEL, L.; STANLEY, JR. Quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoníase, leishmaniose e infecções por outros protozoários. cap. 50. In: **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. AMGH Editora. 12 ed. p. P.1419-1441, 2012.
- MASMOUDI, A.; HARIZ, W.; MARREKCHI, S.; AMOURI, M.; TURKI, H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. **Journal of Dermatological Case Reports**. v. 7, n. 2, p.31-41, 2013.
- MASMOUDI, A.; MAALEJ, N.; MSEDDE, M.; SOUISSI, A., TURKI, H.; BOUDAYA, S.; BOUASSIDA, S.; ZAHAF, A. Glucantime injection: benefit versus toxicity. **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 35, p. 42-45, 2005.
- MAYER, T. U.; KAPOOR, T. M.; HAGGARTY, S. J.; *et al.* Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971–974, 1999.
- MEHTA, A.; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p.11798–11813, 2004.
- MICHALICK; RIBEIRO, 2011 . Gênero Leishmania. In: NEVES, F.P. *et al.* **Parasitologia Humana** 12º Ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 7, p. 41-47, 2011.
- MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos Recentes na Pesquisa de Compostos Orgânicos com Potencial Atividade Leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, v.4, n. 3, p. 268-286, 2012.
- MIEKELEY, N.; MORTARI, S. R.; SCHUBACH, A. O. Monitoring of total antimony and its species by IPC-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. **Anal Bioanal Chemical**, v. 372, n.3 p. 495-502, 2002.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Leishmaniose tegumentar americana diagnóstico clínico e diferencial**. 1ª Edição, Brasília, 182 p., 2006.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ª ed. atual. 3ª reimpr. - Brasília, 2013.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V.K. Aldaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, v. 80, p. 81-90, 2009.
- MISTELI, T.; SPECTOR, D. L.; Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. **Nature Publishing Group**, p.961-964, 1997.
- MOHEBALI, M.; FOTOUHI, A.; HOOSHMAND, B.; ZAREI, Z.; AKHOUNDI, B.; RAHNEMA, A.; RAZAGHIAN, A. R.; KABIR, M. J.; NADIM; A. Comparison of miltefosine and meglumine antimoniate for the treatment of zoonotic cutaneous leishmaniasis (ZCL) by a randomized clinical trial in Iran. **Acta Tropica**, v. 103, p. 33-40, 2007.
- MONDAL, D.; ALVAR, J.; HASNAIN, M. G.; *et al.* Efficacy and safety of single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in a rural public hospital in Bangladesh: a feasibility study. **Lancet Glob Health**. v. 2, n. 1; p. e51-e57, 2014.
- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**. v. 73, n. 17, p. 1889-1920, 2013.
- MORAIS-TEIXEIRA; DE CARVALHO, A. S.; DA COSTA, J. C. S.; *et al.* In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinho-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 358-362, 2008.
- MORAN, M.; GUZMAN, J; ROPARS, A. L.; *et al.* Neglected Disease Research and Development: How Much Are We Really Spending? **PLOS MED**, v. 6, n. 2, p. e100030, 2009.
- MOREIRA, R. A; MENDANHA, S. A., HANSEN, D.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. **Journal of Pharmaceutical Sciences** v. 102, n. 5, p. 1661-1669, 2013.
- MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 56, p. 208-213, 2009.
- MORIZOT, G.; CONSIGN, P. H.; BUFFET, P. H. Leishmaniose cutanee: prise en charge. **Realite therapeutique en dermato-venerologie**. v. 152, p. 5-8, 2005
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, p.1561–1577, 2005.
- NADARAJ, V; THAMARAI, S. S.; ABIRAMI, M.; DANIEL THANGADURAI, T.; Modified Biginelli reaction: Synthesis of fused Dihydropyrimidones. **Research Journal of Recent Sciences**. v.3, p. 370-374, 2014.

- NAME, R. Q; BORGES, K. T; NOGUEIRA, L. S. C; *et al.* Clinical epidemiological and therapeutic study of 402 patients with American cutaneous leishmaniasis seen at University Hospital of Brasilia, DF, Brazil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v. 80, n.3, p. 249-54, 2005.
- NEGRÃO, G. N. **Circuitos espaciais da leishmaniose tegumentar americana abrangendo os estados do Sul do Brasil e Mato Grosso do Sul e os países fronteiriços**. 2013, 283 f. Tese (Doutorado em Geografia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá - PR.
- NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**; v. 9, p. 754–765, 2008.
- OKUNO, T.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; OTSUKA, H.; MATSUMOTO, Y. Applications o recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the B-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Experimental Animals**, v. 52, n. 2, p. 109-118, 2003.
- OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; *et al.* Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and infections**, v. 14, n. 15, p. 1377-1389, 2012.
- OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G.H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends in Parasitology** , v. 23, p.149-158, 2007.
- PASSOS, J. P. S. **Padronização do Método de Produção de Antígeno para intradermoreação de Montenegro**. 2004, 74 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) INCQS / FIOCRUZ, Rio de Janeiro.
- PATEL, A. P.; DEACON, A.; GETTI, G. Development and validation of four Leishmania species constitutively expressing GFP protein. A model for drug discovery and disease pathogenesis studies. **Parasitology**, v. 141, 501–510, 2014.
- PEREIRA, L. O. R.; BRANDÃO, A. Na analysis of trupanosomatids Kdna minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology International**, v. 62, n. 4, p. 397-403, 2013.
- PEREZ, E. A. Microtubule inhibitors: Differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, p. 2086-2095, 2009.
- PINTO, T. J. A; KANEKO, T. M.; PINTO, F. A. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. São Paulo: Atheneu editora, 3.ed.; 734 p., 2010.
- PRINA, E.; JOUANNE, C.; LAO, S. S.; SZABO, A.; GUILLET, J. G.; ANTOINE, J. C. Antigen presentation capacity of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* amastigotes. **J. Immunol**. v. 151, p.2050-2061, 1993.
- PROTA, A. E.; BARGSTEN, K.; DIAZ, J. F; *et al.* A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. **PNAS**, p.1-5, 2014.

- PULIDO, S. A.; MUÑOZ, D. L.; RESTREPO, A. M.; *et al.* Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. **Acta tropica**, v. 122, n. 1, p. 36–45, 2012.
- RAJU, B. C.; RAO, R. N.; SUMAN, P., *et al.* Synthesis, structure-activity relationship of novel substituted 4H-chromen-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates as potential anti-mycobacterial and anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.21, n.10, p. 2855-2859, 2011.
- RAMOS, L. M.; GUIDO, B. C.; NOBREGA, C. C.; *et al.* The Biginelli reaction with an imidazolium-tagged recyclable iron catalyst: kinetics, mechanism, and antitumoral activity. **Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4156–68, 2013.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, cap. 52, 778p., 2011.
- RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; *et al.* Antimoniais empregados no tratamento da leishmaníase: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 550-555, 2003.
- REED, K. W.; YALKOWSKY, S. H. Lysis of human red blood cells in the presence of various cosolvents. **Journal of Parenteral Science and Technology**, v. 39, n. 2. P.64-69. 1985.
- REIS, A. B. ; GONTIJO, C. M. F; 2011. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, F.P. *et al.* **Parasitologia Humana**, 12° ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 8, p. 49-65, 2011.
- ROBERTS, L. S.; JANOVY, J. J. Kinetoplasta: Trypanosomes and their kin. In: **Foundation of parasitology**, p. 55-81, 2000.
- ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D.; RAINEY, P. M. *In vitro* antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p. 1234-1239, 1995.
- ROCHA, M. N. **Desenvolvimento de espécies de Leishmania fluorescentes e caracterização da susceptibilidade de L. amazonensis GFP como modelo para testes quimioterápicos**. 2009, 83 f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Centro de Pesquisa René Rachou, Belo Horizonte, 2009.
- RODRIGUES, I. A.; AZEVEDO, M. M.; CHAVES, F. C. *et al.* In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. v. 13, p. 249, 2013.
- RODRIGUES, J. C. F.; DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoan induced by different classes of metabolic inhibitors. **Curr. Pharm. Des.** v. 14, p. 925-938, 2008.

- RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma Subcellular Biochemistry**, v. 74, p 1-42, 2014.
- ROTUREAU, B.; MORALES, M. A.; BASTIN, P.; SPATH, G. F. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cell Microbiol.** v. 11, n.5, p.710-8, 2009.
- SAHASRABUDDHE, A. A.; BAJPAI, V. K.; GUPTA, C. M. A novel form of actin in Leishmania: molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 105–114, 2004.
- SANDS, M.; KRON, M. A.; BROWN, R. B. Pentamidina: a review. **Reviews of Infectious Disease**, n. 7, p. 625-634, 1985.
- SANTA-RITA, R. M.; LIRA, R.; BARBOSA, S. H.; *et al.* Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 780-784, 2005.
- SEIFERT, K.; ESCOBAR, P.; CROFT, S. L. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 508–511, 2010.
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011.
- SERAFIM, T. D.; FIGUEIREDO, A. B.; COSTA, P. A.; *et al.* Leishmania metacyclogenesis is promoted in the absence of purines. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, n. 9, p. e1833, 2012.
- SERENO, D.; CORDEIRO DA SILVA, A.; MATHIEU-DAUDE, F.; OUAISSI, A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**. v. 56, p.3–7, 2007
- SERENO, D.; HOZMULLER, P.; MANGOT, I.; CURRY, G.; QUAISSI, A.; LEMESRE, J.P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**., v. 45, p. 2064-2069, 2001.
- SERENO, D.; LEMESTRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.41, n.5, p.972-976, 1997.
- SESANA, A. M.; MONTI-ROCHA, R.; VINHAS, S. A.; MORAIS, C. G.; DIETZE, R.; LEMOS, E. M. In vitro activity of amphotericin B coxleates against *Leishmania chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.106, n.2 , 251-253, 2011.

- SINGH, N.; DUBE, A. Fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p.71, p. 400–402, 2004.
- SINGH, N.; KAUR, J.; KUMAR, P.; *et al.* An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase. **Parasitology research**, v. 105, n.5, p. 1317-1325, 2009.
- SINGH, O. M.; SINGH, S. J.; DEVI, M. B. Synthesis and in vitro evaluation of the antifungal activities of dihydropyrimidinones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 24, p. 6462-6467, 2008.
- SINGH, S; SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p.307–315, 2004.
- SIQUEIRA, A. M. Subfilo Mastigophora. In: NEVES, F.P. *et al.* **Parasitologia Humana** 12^o ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 6, p. 37-40, 2011.
- Sistema Nacional de Agravos Notificados-SINAN. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/Ita/bases/ltabrnet.def>. Acrdd. Acesso em 14 agosto de 2014.
- SCHLOSSBERG, D. Azithromycin and clarithromycin. **Medical Clinics of North America**, v. 79, n. 4, p. 803-815, 1995.
- SMITH, P. J.; OLSON, J. A.; CONSTABLE, D.; *et al.* Effects of dosing regimen on accumulation, retention and prophylactic efficacy of liposomal amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 941-951, 2007.
- SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2; 139-149, 2004.
- SOLOMON, M.; BAUM, S.; BARZILAI, A. *et al.* Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **Jornal of the American Academy of Dermatology**, v. 56, n. 4, p. 612-616, 2007.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R.A. Review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 20, n. 7, e2278, 2013.
- TAKAHASHI, H. T.; BRITTA, E. A.; LONGHINI, R. *et al.* Antileishmanial Activity of 5-Methyl-2,2':5',2''-terthiophene Isolated from *Porophyllum ruderale* is Related to Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Planta Médica**, v. 79, p. 330-333, 2013.
- TANAKA, A. K.; VALERO, V. B.; TAKAHASHI, H. K.; STRAUS, A. H. Inhibition of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* growth and infectivity by aureobasidin A. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 487–492, 2007.

- TEIXEIRA, D. E.; BECHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P.H.; PIMENTA, P. F. P., DE SOUZA, W. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, 1 ed., 2013.
- TEIXEIRA, M. C; SANTOS, R. J.; SAMPAIO, R. B.; CARVALHO, L. P.; SANTOS, W. L. C. A simple and reproducible method to obtain large numbers of axenic amastigotes of different *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v.88, p.963–968, 2002.
- TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15 e525–e532, 2011.
- TIUMAN, T. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALONSO, A.; NAKAMURA, C. V. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 152, 2014.
- TOCHIGI, Y.; YAMASHIKI, N.; OHGIYA, S.; GANAHA, S.; YOKOTA, H. Isoform-specific expression and induction of udp-glucuronosyltransferase in immunoactivated peritoneal macrophages of the rat. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 33, n. 9, p.1391-1398, 2005.
- TOGAMI, K.; CHONO, S.; MORIMOTO, K. Subcellular distribution of azithromycin and clarithromycin in rat alveolar macrophages (NR8383) in vitro. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 36, n. 9; p. 1494-1499, 2013.
- TRAUB-CSEKO, Y. M.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M; DANTAS, A. P.; Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 3, p. 136-141, 2001.
- TRAVI, B.; OSORIO, Y. Failure of Albendazole as an Alternative Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in the Hamster Model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 4, p. 515, 1998.
- TSIGANKOV, P; GHERARDINI, P. F.; HELMER-CITTERICH, M; *et al.* Regulation dynamics of leishmania differentiation: deconvoluting signals and identifying phosphorylation trends. **Molecular & Cellular proteomics**. v. 13, n. 7, p. 1787-1799, 2014.
- TUON, F. F.; AMATO, V. S.; GRAF, M. E. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. **International Journal of Dermatology**, v. 47, n. 2, p.109-124, 2008.
- UEDA-NAKAMURA, T; MENDONÇA-FILHO, R. R; MORGADO-DÍAZ, J. A.; *et al.* Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; MARRINY, A.; DE SOUZA; W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutic Design**, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

- VEIGA-SANTOS, P.; DESOTI, V. C.; MIRANDA, N.; *et al.* The natural compounds piperovatine and piperlonguminine induce autophagic cell death on *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v.125, p. 349-356, 2013.
- VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. **Parasitology International**, v. 59, p. 154-158, 2010.
- VOHRINGER, H. F., ARASTEH, K. Pharmacokinetic optimisation in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clinical Pharmacokinetics**. v. 24, n.5, p. 388-412, 1993.
- WANG, J.Y; GUI, G.; CHEN, H. T., ZHOU, X. N.; *et al.* Current epidemiological profile and features of visceral leishmaniasis in People's Republic of China. **Parasites & Vectors**, v. 5, n.31, 2012.
- WEIGLE, K.; SARAIVA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host parasite interaction in the New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, 14:433-450,1996.
- WERBOVETZ, K. A.; BRENDLE, J. J.; SACKETT, D. L. Purification, characterization and drug susceptibility of tubulin from *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 98, p. 53-65, 1999.
- WILDFEUER, A.; LAUFEN, H.; ZIMMERMANN; T. Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under *in vivo* conditions. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 40 n. 1, p. 75-79, 1996.
- WHO. World Health Organization Leishmaniasis. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em 27 julho de 2014.
- WHO. World Health Organization. Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide,2012http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png?ua=1. Acesso em 15 agosto de 2014.
- WHO. World Health Organization. Technical Report Series. Control of the Leishmaniasis, 2010.

10. ANEXO



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 18 de novembro de 2013.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "VALIDAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO USO DOS DERIVADOS DA DIHIDROPIRIMIDINONA LIVRES E ASSOCIADOS A QUANTUM DOT DE CARBONO COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA PARA O ADENOCARCINOMA MAMÁRIO HUMANO – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA FARMACOLÓGICA", UnBDOC n.º 137959/2013, sob responsabilidade do Professor José Raimundo Corrêa foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.




Prof. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.