

**DANIELA SARAIVA CORRÊA**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES BIOENERGÉTICAS  
INDUZIDAS POR COMPOSTOS SINTÉTICOS EM  
*Leishmania* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências.

**Área de concentração:** Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - PLSP

**Orientador:** Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

**Co-orientador:** Dr. Luis Ignacio Rivas López

**SÃO PAULO**

**2014**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Corrêa, Daniela Saraiva

Estudo das alterações bioenergéticas induzidas por compostos sintéticos em *Leishmania spp*/ Daniela Saraiva Corrêa - São Paulo, 2014.

Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

Co-orientador: Luis Ignacio Rivas López

1. Leishmaniose
2. Mitocôndria
3. Trifosfato de adenosina
4. Fosforilação oxidativa
5. Transporte de elétrons
6. Saís

SES/CCD/CD-296/14

*Aos meus pais que são a minha vida.*

*A María Ángeles e Almudena por acreditarem em mim e não me deixarem desistir nunca.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

À Dra. Maria de Fatima Costa Pires coordenadora do programa de Pós-graduação por toda a ajuda.

Ao CIB (CSIC) onde se realizou a pesquisa na Espanha, graças aos projetos “Fondo de Investigaciones Sanitarias- ISCIII, Ref P112-02706” e do projeto ‘RD12/0018/0007 de Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa-FEDER RICET”.

À Força Aérea Brasileira pelo incentivo na pesquisa, através da bolsa concedida durante a minha estância na Espanha.

À Dra. Mariana Franco Maggi Tavares e Dra Coral Barbas pela criação do projeto Mobilidade Brasil-Espanha.

Ao Instituto Adolfo Lutz pela infraestrutura.

Ao Dr. André Gustavo Tempone Cardoso, pela orientação, confiança, durante a realização dessa tese e por confiar no meu potencial e me convidar para o projeto Espanha-Brasil. Obrigada por todo apoio e preocupação principalmente após o meu regresso para Brasil. É possível sim, começar agora e fazer um novo fim.

À Dra Patrícia Sartorelli, responsável pelo meu início na ciência.

As alunas do laboratório de toxilogia, Daiane Dias Ferreira, Erika Graciele Pinto, Juliana Tonini, Lígia Ferreira, Thaís Alves, Tatiane Rodrigues, Sônia Ueda pelo convívio e pelos momentos de descontração. Especialmente quero agradecer a Érika pela amizade e apoio hoje e por todo o momento que estive na Espanha. À Ligia, Daiane e Thais por me ajudarem nessa fase de adaptação no laboratório com carinho e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular pelos cafés e principalmente pelos momentos de descontração.

Ao Vicente e Matilia, pela manutenção do laboratório e pelas risadas.

À Espanha

Creo que no tuve palabras antes y no las tengo hoy, para decir cuánto, habéis sido en España y sois de importantes para mi todos vosotros. Intentaré mostrar en palabras todo el agradecimiento que tengo en mi corazón. En primer lugar agradezco a mi codirector de tesis Dr. Luis Rivas por su confianza, apoyo y el cariño que tuvo conmigo en su laboratorio y por ayudarme a ser mejor profesional.

A los compañeros de los servicios del CIB por compartir conmigo sus conocimientos y ayudarme a utilizar los equipos con todo cariño; Begoña y José Fernando Escolar Antunez (Microscopia), Maria Teresa Seísdedos Domínguez, Maite (Confocal) y Pedro Lastre Varo (Citometria).

Y para la buena gente del laboratorio de los vecinos, Eduardo, Mariano, Pilar Zaragoza, Miguel Ángel Moreno Izquierda, Pedro José Alcolea, Ana María Alonso Ayala y Luque Ortega gracias por los buenos ratos y por tener conmigo siempre mucho cariño.

A Abel por las risas y por siempre ayudarme a mejorar mi español

A Sory por el cariño y por los sábados y domingo compartidos de trabajo y por enseñarme lo mejor de la música española.

A Arnaud por las risas, y por cocinar cosas superricas.

Y a mis chicas (Así como Abel decía) María Angeles y Almudena les agradezco por todo que soy hoy, por la mejor profesional y mejor persona. Les agradezco por enseñarme que no pasa nada si nos equivocamos cien veces, otras cien les enseñaremos, por enseñarme a no desistir, por enseñarme que hay personas buenas en el mundo que te ayudan desinteresadamente, por enseñarme su cultura con tanto cariño, atención y respecto por la mía. Por me enseñarme a mejorar mi español (especialmente Almudena y Luis Rivas).

Por enseñarme a ligar con españoles, por enseñarme a cocinar comidas españolas, por enseñarme que amistad va más allá que tiempo, espacio y cultura, que amistad es conocer alguien e identificarse como hermanas, es mirar y con los ojos saber si esta persona está bien o no, gracias por ver en mí el potencial y la persona que yo misma no la conocía.

Aos amigos brasileiros que fiz na Espanha só tenho a agradecer pelas cañas, risas, conversas e todo apoio e amizade. A Kenia, por todas as conversas filosóficas e viagens. Ao Thiago por todo o carinho e cumplicidade, Ao Marcel por todo o cuidado e preocupação comigo, e a ajuda com as minhas dúvidas químicas. A Brenda-Thiago, Claudia, Juliana, Emy por mostrarem que não importa a distância a amizade e o carinho sempre irão existir.

Aos meus amigos Marcelo, Gabriel, Danilo, Cintia, Keli, Leo, Juliana, Ana Paula, Carla, Juliana Reimão e Elisa pela cumplicidade e pelo infinito apoio durante a elaboração dessa tese especialmente a Ana, Simone e Cynthia agradeço todo o apoio e carinho que recebi de vocês quando estive na Espanha e recebo ainda. Quero agradecer também a Cynthia pela correção da tese e a Simone pelas preciosas dicas na elaboração dos slides.

Aos meus pais Júlia e Pedro, pelo o apoio que me deram e me dão até hoje, confiança e incentivo durante todos os momentos, por acreditarem em mim mesmo quando eu já não acreditava, não há palavras também para agradecer a vocês tudo que me dão de amor, de carinho e ajuda, pois o que sou e tudo que consegui, devo a vocês. Amo vocês.

À ciência que me permitiu conhecer em vida meus anjos de guarda e me ensinou a ser uma pessoa melhor.

“... Eu prefiro ser essa metamorfose ambulante do ter aquela velha opinião formada sobre tudo...” (Raul Seixas)

“...Ya ves, lo que es no es. A veces no soy yo, busco un disfraz mejor, bailando hasta el apagón...” (Vetusta Morla)

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença negligenciada, com especial incidência nos países em desenvolvimento; hoje em dia, 350 milhões de pessoas estão em risco de contrair esta doença, com 2 milhões de novos casos notificados anualmente. O tratamento é reduzido à quimioterapia, com uma escassez alarmante de medicamentos em uso clínico atual e diversos efeitos colaterais, além de relatos de resistência associados a muitos desses medicamentos. Todo esse contexto leva a necessidade da busca urgente de novos fármacos. Neste trabalho avaliou-se o potencial leishmanicida de 63 benzofenonas sintéticas, juntamente com o fármaco buparvaquona, uma naftoquinona usada atualmente para o tratamento da theileriose, sendo uma alternativa no estudo de reposicionamento de fármacos, sendo essa uma estratégia próspera e de baixo custo para a busca de novas drogas leishmanicidas. Após uma triagem inicial da biblioteca de benzofenona, foram selecionados quatro compostos que apresentaram os maiores valores de índice de seletividade. Num passo seguinte, foi realizada a definição do mecanismo leishmanicida para este conjunto de benzofenonas (EFPL6, EFPL8, EFPI11 e AHI09) em *L. donovani* e do fármaco buparvaquona em *L. infantum*. Todos estes compostos induziram a uma rápida redução no nível intracelular de ATP dos parasitas, preservando a integridade da membrana plasmática. Indicando uma inibição da síntese de ATP, realizada principalmente em *Leishmania* pela fosforilação oxidativa mitocondrial. Na verdade, todas elas induziram um colapso do potencial eletroquímico da mitocôndria, inibindo a taxa de consumo de oxigênio de forma dependente à concentração e induziram alterações morfológicas nas mitocôndrias, avaliadas pela microscopia confocal e eletrônica de transmissão, e também através do eletrodo de oxigênio foi observado a ação das benzofenonas no complexo II (succinato redutase) enquanto buparvaquona atuou no complexo III (citocromo *c* redutase) da cadeia respiratória. Finalmente, as benzofenonas, excepto EFPL8, desencadearam um processo de alteração do ciclo celular, porém a buparvaquona não induziu esse processo. Juntos, esses cinco compostos demonstraram a sua viabilidade para o desenvolvimento de novos tratamentos contra a leishmaniose, além disso, o conhecimento sobre o seu mecanismo de ação irá facilitar a sua otimização para a implementação futura como novo tratamento leishmanicida.

**Palavras Chaves:** sais de bifosfônio, buparvaquona, ATP, mitocôndria, fosforilação oxidativa, succinato desidrogenase e citocromo *c* redutase.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease, with a special incidence on developing countries; nowadays 350 million people are at risk of contracting this disease, and 2 million new cases were annually reported. Treatment is reduced to chemotherapy, with an alarming paucity in the number of drugs under current clinical use; this, together with serious adverse side-effects and ramping resistance associated to many of them, prompted the urgent search for new leads. In this work we evaluated the leishmanicidal potential of 63 brand-new synthetic benzophenones, together with buparvaquone, a synthetic naphthoquinone currently used for treatment of theileriosis, and under current evaluation on human leishmaniasis, in trend with drug repurposing as a cheap thriving strategy to find new leishmanicidal drugs. After an initial screening of the benzophenone library, four compounds were selected on account of their higher selectivity index. In a next step, we conducted the definition of the leishmanicidal mechanism for this set of benzophenones (EFPL6, EFPL8, EFPI11 and AHI09) on *Leishmania donovani* plus buparvaquone on *L. infantum*. All these compounds induced a rapid decrease in the intracellular level of ATP of the parasites, while preserving the role of impermeability barrier of the plasma membrane as a feasible alternative to account for the bioenergetic collapse aforementioned. This pointed out to the inhibition of the synthesis of ATP, mainly carried out in *Leishmania* by mitochondrial oxidative phosphorylation. In fact all of them induced a collapse of the electrochemical potential of mitochondria, inhibited the oxygen consumption rate in a concentration dependent manner and induced severe morphological alteration of the mitochondria, assessed by confocal and transmission electron microscopy by polarographic techniques, benzophenones targeted complex II (succinate reductase) while buparvaquone did at complex III (cytochrome c reductase) of the respiratory chain. Finally, benzophenones except EFPL8, triggered a programmed cell death process, but not buparvaquone, as documented by the appearance of a sub-G<sub>1</sub> population after treatment. Altogether, these five compounds demonstrated their feasibility for further development as new treatment against leishmaniasis, Furthermore, knowledge on their mechanism of action of action will facilitate their optimization for their hypothetical future implementation as new leishmanicidal treatment.

**Keys Words:** bisphosphonium salts, buparvaquone, ATP, mitochondria, oxidative phosphorylation, succinate reductase and cytochrome c reductase .

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Trifosfato de adenosina
ADP	Adenosina di-fosfato
BPQ	Buparvaquona
BSA	Albumina do soro bovino fetal
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica 50%
CE <sub>50</sub>	Concentração efetiva 50%
CI <sub>50</sub>	Concentração de inibição 50%
CFSE	Carboxifluoresceína-succinimidil-éster
DAPI	4'6'-diamidino-2- fenilindol-dicloridrato
DMNPE-luciferina	D-luciferina, 1-(4,5-dimetoxi-2-nitrofenil) etil ester
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Desvio Standard
EGTA	Ácido N,N,N',N' etilenoglicol-bis (β-aminoetil) tetraacético
FCCP	Carbonil cianuro <i>p</i> -(trifluorometoxi)fenilhidrazona
FDA	Food and drug administration
FRD	Fumarato redutase
h	Hora
Hanks + Glc	Solução salina Hanks + 1% de D-glucosa
HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil]piperacina-N.-[2-etanosulfónico]
IS	Índice de seletividade
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCM	Leishmaniose mucocutânea
<i>L. (L.) donovani</i>	<i>Leishmania</i> (Leishmania) <i>donovani</i>
<i>L. (L.) infantum</i>	<i>Leishmania</i> (Leishmania) <i>infantum</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolisacárido
LTA:	Leishmaniose tegumentar americana
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
M-199	Meio 199
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium bromideo
OMS	Organização mundial da saúde
Oxp	Óxido de propileno
PM	Peso molecular
PBS	Tampão de fosfato salino
RAW 264.7	Linhagem celular de macrófagos murino
RPMI 1640	Meio Roswell Park Memorial Institute
SDH	Succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFBI	Soro fetal bovino inativado
TMPD	Tetrametil- <i>p</i> -fenilendiamina
TX-100	Triton X-100
μM	Micromolar

## Lista de Tabela

<b>Tabela I:</b> Composição de fosfolipídios em promastigota de <i>L.donovani</i> , em comparação com eritrócitos de mamíferos. ....	33
<b>Tabela II:</b> Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos de bifosfônio. ....	56
<b>Tabela III:</b> Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos de sais de monofosfônio. ....	60
<b>Tabela IV:</b> Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos amônios quaternários/piridínicos/quinolínicos. ....	61
<b>Tabela V:</b> Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade em células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais. ....	78
<b>Tabela VI:</b> Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade dos compostos selecionados. ....	81
<b>Tabela VII:</b> Atividade <i>in vitro</i> em <i>Leishmania</i> spp. ....	83
<b>Tabela VIII:</b> Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em <i>L. donovani</i> .....	88
<b>Tabela IX:</b> Valores de viabilidade e proliferação celular de <i>Leishmania</i> na presença da buparvaquona. ....	102
<b>Tabela X:</b> Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em <i>Leishmania infantum</i> em 4 h de incubação com BPQ. ....	107
<b>Tabela XI:</b> Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em <i>Leishmania infantum</i> em 12 h de incubação com BPQ. ....	108

## Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Distribuição mundial das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose.....	19
<b>Figura 2:</b> Cerâmica com deformidades faciais como as produzidas pela <i>Leishmania</i> . .....	20
<b>Figura 3:</b> Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> .....	23
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática da ultraestrutura da forma promastigota de <i>Leishmania</i> .....	24
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática da ultraestrutura da forma amastigota de <i>Leishmania</i> . .....	25
<b>Figura 6:</b> Observação microscópica da forma promastigota (A) e a forma amastigota (B) .....	25
<b>Figura 7:</b> Classificação taxonômica de <i>Leishmania</i> e suas manifestações clínicas em função das espécies infectantes.....	27
<b>Figura 8:</b> Fêmea de flebotômíneo adulto.....	28
<b>Figura 9:</b> Ciclo de transmissão de leishmaniose. ....	30
<b>Figura 10:</b> Representação esquemática das principais moléculas de superfície da <i>Leishmania</i> (A) promastigota e (B) amastigota. ....	33
<b>Figura 11:</b> Esquema das principais rotas do metabolismo da glicose em <i>Leishmania</i> . .....	37
<b>Figura 12:</b> Modelo de esquema da fosforilação oxidativa em <i>Leishmania</i> ssp.....	40
<b>Figura 13:</b> Estrutura química proposta do antimoníato de N-metilglucamina. ....	42
<b>Figura 14:</b> Estrutura química: (A) anfotericina; (B) pentamidina. ....	43
<b>Figura 15:</b> Estrutura química da miltefosina. ....	44
<b>Figura 16:</b> Estrutura química da paromomicina.....	45
<b>Figura 17:</b> Estrutura da buparvaquona.....	62
<b>Figura 18:</b> Diagrama do ensaio de luminescência e os processos celulares ocasionados pela ação da droga. ....	65

<b>Figura 19:</b> Esquema dos inibidores e substratos específicos da cadeia respiratória de <i>Leishmania</i> usados nesse estudo. ....	70
<b>Figura 20:</b> Curva da % de redução de MTT de promastigota de <i>L. donovani</i> às 4h e 72h, e amastigota de <i>L. pifanoi</i> às 4h e 96h .....	82
<b>Figura 21:</b> Cinética de luminescência associada aos níveis de ATP <i>in vivo</i> . ....	84
<b>Figura 22:</b> Fluorescência da sonda SYTOX Green® em promastigota de <i>L. donovani</i> . (A) promastigota <i>L. donovani</i> (t=0h de incubação); (B) <i>L. donovani</i> (t=12h de incubação).. ....	86
<b>Figura 23:</b> Histograma de representa a % acúmulo de Rodamina-123 em <i>L. donovani</i> após tratamento com EFPL6, EFPL8, EFPL11 10µM e AHI09 5 µM.. ....	87
<b>Figura 24:</b> Determinação do consumo dos níveis de oxigênio e a identificação da inibição do complexo II da cadeia respiratória pelo EFPL6 (A), EFPL8 (B), EFPL11 (C) e AHI09 (D).. ....	92
<b>Figura 25:</b> Atividade SDH da fração mitocondrial na presença do succinato em concentrações crescentes dos compostos.....	94
<b>Figura 26:</b> Microscopia confocal de <i>L. donovani</i> . Os parasitas foram tratados com 0,1µM Mitotracker Red (Vermelho) e DAPI (Azul) 1µg/mL. ....	94
<b>Figura 27:</b> Microscopia eletrônica de promastigota de <i>L. donovani</i> incubado por 4h na concentração que causa ~50% de inibição da viabilidade celular: Controle (A), EFPL6 (B), EFPL8 (C), EFPL11 (D), AHI09 (E). ....	96
<b>Figura 28:</b> Indução da população sub-G1 ocasionado pelas benzofenonas: Histogramas do ciclo celular obtidos mediante citometria de fluxo de formas promastigotas <i>L. donovani</i> tratados com os compostos sintéticos EFPL6, EFPL11, EFPL8 e AHI09 . ....	98
<b>Figura 29:</b> Macrófagos peritoneais infectados por <i>L. donovani</i> incubados por 12 h com os 4 compostos. (A) % de infecção de macrófagos com EFPL6, EFPL8, EFPL11 15 µM e AHI09 5 µM. (B) Número de amastigotas por macrófagos. ....	100
<b>Figura 30:</b> Microscopia confocal, os parasitas foram marcados com CFSE com 0,4 µg/mL e DAPI (Blue) 1µg/mL. ....	101
<b>Figura 31:</b> Atividade de BPQ sobre a redução de MTT de promastigota de <i>L. infantum</i> , <i>L. donovani</i> e <i>L. pifanoi</i> . . ....	103

<b>Figura 32:</b> Toxicidade <i>in vitro</i> em células: (A) RAW 264.7 e (B) macrófagos peritoneais. ....	104
<b>Figura 33:</b> Variação da luminescência <i>in vivo</i> . A) Queda do nível ATP intracelular após a adição do fármaco. B) Variação da luminescência após incubação por 4 h com o fármaco .....	105
<b>Figura 34:</b> Entrada da sonda SYTOX <sup>TM</sup> Green em promastigota <i>L. infantum</i> : (A) t=0 de incubação, (B) t= 12h de incubação. ....	106
<b>Figura 35:</b> Acumulação de Rodamina 123 em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com BPQ. Os promastigotas foram tratados por 4 h com diferentes concentrações de BPQ (0.05 µM, 0.25 µM, 0.75 µM, 1.5 µM e 3 µM). ....	107
<b>Figura 36:</b> Acumulação de Rodamina 123 em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com BPQ medidos por citometria de fluxo. Os promastigotas foram tratados por 12 h com diferentes concentrações(0.05 µM, 0.25 µM, 0.75 µM, 1.5 µM e 3 µM) a 12 h de incubação. ....	108
<b>Figura 37:</b> Identificação do sítio de inibição da cadeia respiratória de <i>Leishmania infantum</i> pelo fármaco BPQ (3 µM). ....	110
<b>Figura 38:</b> Microscopia confocal de <i>L. infantum</i> , os parasitas foram marcados com 0.1 µM MitoTracker Red (Vermelho) e DAPI (Azul) 1 µg/mL. Os promastigotas foram tratados por 12 h com 1.5 µM. ....	112
<b>Figura 39:</b> Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas da cepa de <i>L. infantum</i> incubados com BPQ por 12 h. Controle (A) e (B) 0.5 µM. ...	113
<b>Figura 40:</b> Análise da população sub-G1 em promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com BPQ através da citometria de fluxo. ....	115
<b>Figura 41:</b> Macrófagos peritoneais infectados com <i>Leishmania infantum</i> incubado com o fármaco BPQ (A) % de macrófagos infectados com BPQ a 20 µM. (B) Número de amastigotas por macrófagos. ....	116

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
1. Leishmaniose .....	18
1.1. Breve histórico.....	20
1.2. Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> e manifestações clínicas .....	21
1.3. Vetor e reservatório .....	28
1.4. Ciclo de vida.....	29
1.5. Características morfológicas e metabolismo energético .....	31
1.5.1 Superfície celular.....	31
1.5.2. Organelas citoplasmáticas.....	34
1.5.3. Metabolismo energético.....	35
1.5.3.1. Catabolismo da glicose .....	35
1.5.3.2. Mitocôndria e fosforilação oxidativa .....	38
1.6. Formas de Tratamento .....	41
1.6.1. Quimioterapia .....	41
1.6.1. Problemas da quimioterapia atual .....	45
2. Estratégias para o estudo de novas terapias .....	47
2.1. Triagem (screening) de bibliotecas químicas.....	47
2.2. Reposicionamento de fármacos (drug repurposing) .....	49
<b>OBJETIVO.....</b>	<b>51</b>
1. Objetivo Geral:.....	52
2. Objetivos específicos: .....	52
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
1. Compostos de estudo .....	55
1.1. Compostos sintéticos .....	55
1.2. Fármaco .....	62
2. Cultura celular .....	62
2.1. Cepas utilizadas e meio de cultivo.....	62
2.2. Viabilidade e proliferação celular (CE <sub>50</sub> e CI <sub>50</sub> ) .....	63
2.3. Ensaio de citotoxicidade em RAW 264.7 e macrófagos peritoneais.....	64
3. Estudo do mecanismo de ação dos compostos selecionados e do fármaco buparvaquona.....	65

3.1. Variação <i>in vivo</i> dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de <i>L. donovani</i> .....	65
3.2. Permeabilização da membrana plasmática .....	67
3.3. Despolarização da membrana mitocondrial .....	67
3.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelos fármacos. ....	68
3.4.1. Atividade succinato deshidrogenase (SDH) .....	70
3.5. Ciclo celular .....	71
3.6. Microscopia .....	72
3.6.1. Microscopia confocal .....	72
3.6.2. Microscopia eletrônica .....	73
3.7. Infecção <i>in vitro</i> .....	74
3.7.1. Bezofenonas .....	74
3.7.2. Fármaco buparvaquona.....	75
3.8. Análise estatística.....	75
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>76</b>
1. Compostos sintéticos.....	77
1.1. Triagem dos compostos .....	77
1.1.1. Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade .....	77
1.2. Mecanismo de ação .....	83
1.2.1. Variação <i>in vivo</i> dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de <i>L. donovani</i> .....	83
1.2.2. Permeabilização da membrana plasmática .....	85
1.2.3. Despolarização da membrana mitocondrial .....	86
1.2.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelos compostos .....	89
1.2.5. Atividade succinato desidrogenase (SDH).....	93
1.3. Microscopia .....	95
1.3.1. Microscopia laser confocal .....	95
1.3.2. Microscopia eletrônica .....	95
1.3.3. Ciclo celular.....	97
1.4. Atividade em macrófagos peritoneais e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> .....	99



2. Fármaco buparvaquona.....	102
2.1. Atividade anti- <i>Leishmania</i> e citotoxicidade .....	102
2.3. Mecanismo de ação .....	104
2.3.1. Variação <i>in vivo</i> dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de <i>L. donovani</i> .....	104
2.3.2. Permeabilização da membrana plasmática .....	105
2.4.3. Despolarização da membrana mitocondrial .....	106
2.4.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelo fármaco. ....	109
2.5. Microscopia .....	111
2.5.1. Microscopia laser confocal .....	111
2.5.2. Microscopia eletrônica .....	113
2.6. Ciclo celular .....	114
2.6. Atividade em macrófagos peritoneais e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> .....	116
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>117</b>
1. Importância do estudo do mecanismo bioenergético na quimioterapia de <i>Leishmania</i> .....	118
1.1. Estrutura-atividade Leishmanicida de benzofenonas .....	120
1.2. Fármaco buparvaquona.....	127
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>133</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>136</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>152</b>

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Leishmaniose

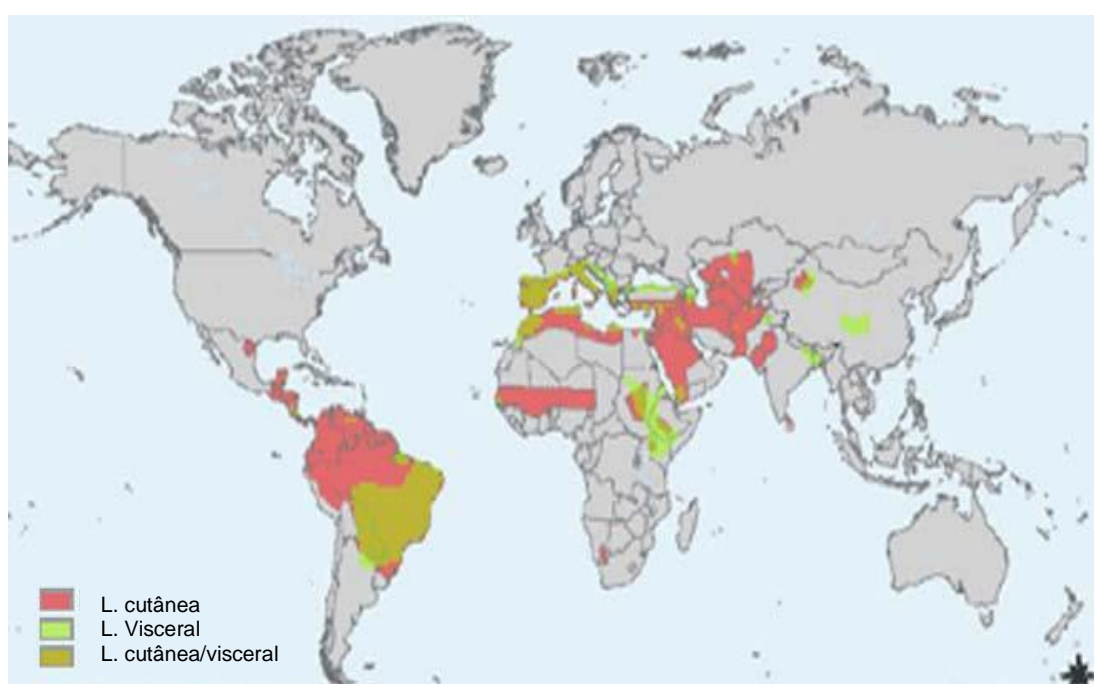
A leishmaniose atualmente encontra-se entre as seis endemias negligenciadas prioritárias no mundo, portanto é um problema de saúde pública, pois representa um complexo de doenças com importantes manifestações clínicas e diversidade epidemiológica (MS 2006).

A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com um registro aproximado de 1,3 milhões de novos casos ao ano, em 98 países de cinco continentes. São aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral e 0,7 a 1,2 mil casos de leishmaniose cutânea por ano (WHO 2010, Alvar et al. 2012). A maioria dos casos de leishmaniose visceral (90%) ocorrem em áreas rurais e suburbanas de 5 países: Bangladesh, Índia, Nepal, Brasil e Sudão. No Brasil são notificados 3.481 casos de leishmaniose visceral por ano. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no país foi de 3.156 casos, sendo a incidência de dois casos/100.000 hab. Se não for tratada, a taxa de mortalidade atinge 100% (MS 2006, WHO 2010, Cota et al. 2011, Alvar et al. 2012).

Em 19 dos 27 estados brasileiros já foram registrados casos autóctones de LV. A partir dos anos 90, os estados Pará e Tocantins (região Norte), Mato Grosso do Sul (região Centro Oeste) e Minas Gerais e São Paulo (região Sudeste) passaram a influir de maneira significativa nas estatísticas da LV no Brasil. Com a expansão da área de abrangência da doença e o aumento significativo no número de casos, a LV passou a ser considerada pela Organização Mundial da Saúde uma das prioridades dentre as doenças tropicais (MS 2006, Mondal et al. 2010). Estima-se que 20 000 a 40 000 pessoas morrem anualmente de LV (WHO 2010).

Desse modo, devido ao baixo poder aquisitivo dos pacientes e em virtude dos recursos escassos destinados a saúde dos países onde normalmente estas moléstias ocorrem, a produção de medicamentos para enfrentá-las não geraria um lucro satisfatório para a iniciativa privada (**Figura 1**) (WHO 2010).

A Leishmaniose visceral (LV), dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Em de 2010 a coinfeção *Leishmania* / HIV foi relatada em 35 países, sendo um risco em países onde o acesso à terapia anti-viral é um problema sério (MS 2006, Mondal et al. 2010, WHO 2010, Cota et al. 2011) (**Figura 1**).

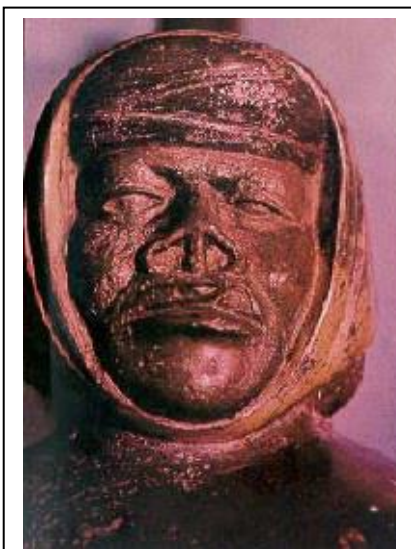


**Figura 1:** Distribuição mundial das diferentes manifestações clínicas da leishmaniose

Fonte: (WHO 2010)

Por mais de noventa anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), que são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento. Estes medicamentos são tóxicos, nem sempre efetivos e com relatos de resistência (Croft & Coombs 2003). Como tratamentos alternativos no Brasil,

são utilizados a anfotericina B e suas formulações lipossomais e as pentamidinas, as quais são igualmente tóxicas ou possuem um custo elevado e de difícil administração, demonstrando a necessidade de busca de novas alternativas de tratamento (Croft & Coombs 2003). O tratamento com anfotericina B lipossomal representa um custo de USD \$18 por 50mg por via. E a miltefosina representa um custo de USD \$45,28 a USD \$54,92 por capsula, esses valores indicam os altos custos com o tratamento (WHO 2010).



**Figura 2:** Cerâmica com deformidades faciais como as produzidas pela *Leishmania*.

### 1.1. Breve histórico

Existem relatos sobre a doença, no continente americano, desde a época colonial. Em 1571, Pedro Pizarro relatou que os povos situados nos vales quentes do Peru foram dizimados por uma doença que desfigurava o nariz, a qual foi posteriormente caracterizada como leishmaniose. A importância desta doença era tamanha, que as deformações provocadas chegaram a ser registradas em peças de cerâmica, por artistas da época (**Figura 2**) (Goldman 1983).

A descoberta dos agentes etiológicos da leishmaniose, entretanto, só ocorreu o final do século XIX, quando Cunningham em 1885, na Índia, descreveu formas de amastigotas em casos de Calazar. Em 1898, o pesquisador russo Borovisky demonstrou ser um protozoário o agente etiológico do Botão do Oriente. Em 1903, Leishman e Donovan realizaram as primeiras descrições do protozoário responsável pelo Calazar indiano, denominado mais tarde de *Leishmania donovani*. Igualmente em 1903, Wright descreveu o parasita do Botão do Oriente, conhecido atualmente como *Leishmania tropica*. No continente americano, várias doenças que criavam lesões, frequentes em determinadas regiões,

eram chamadas de úlcera de Bauru ou ferida brava. A correlação destas lesões com um protozoário do gênero *Leishmania* foi estabelecida por Gaspar Vianna em 1909, no Instituto Oswaldo Cruz, recebendo o nome de *Leishmania braziliensis* (Lainson & Shaw 1978).

No Brasil, o primeiro caso de LV foi descrito por Mignone, em 1913. Tratava-se de um paciente procedente do município de Boa Esperança, no Mato Grosso (MS 2006, Alencar & Neves 1982). Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul. A doença tem apresentado mudanças importantes no padrão de transmissão, inicialmente eram relatados casos em ambientes rurais e periurbanos, mas recentemente tem se relatos em centros urbanos como Rio de Janeiro (RJ), Corumbá (MS), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Palmas (TO), Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS), entre outros. Atualmente, no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone (MS 2006).

## **1.2. Taxonomia do gênero *Leishmania* e manifestações clínicas**

A leishmaniose é causada por organismos digenéticos, parasitas obrigatórios, com uma fase da vida no tubo digestório de um díptero denominado flebotomíneo, e outra fase, em um hospedeiro vertebrado (Rey 2001).

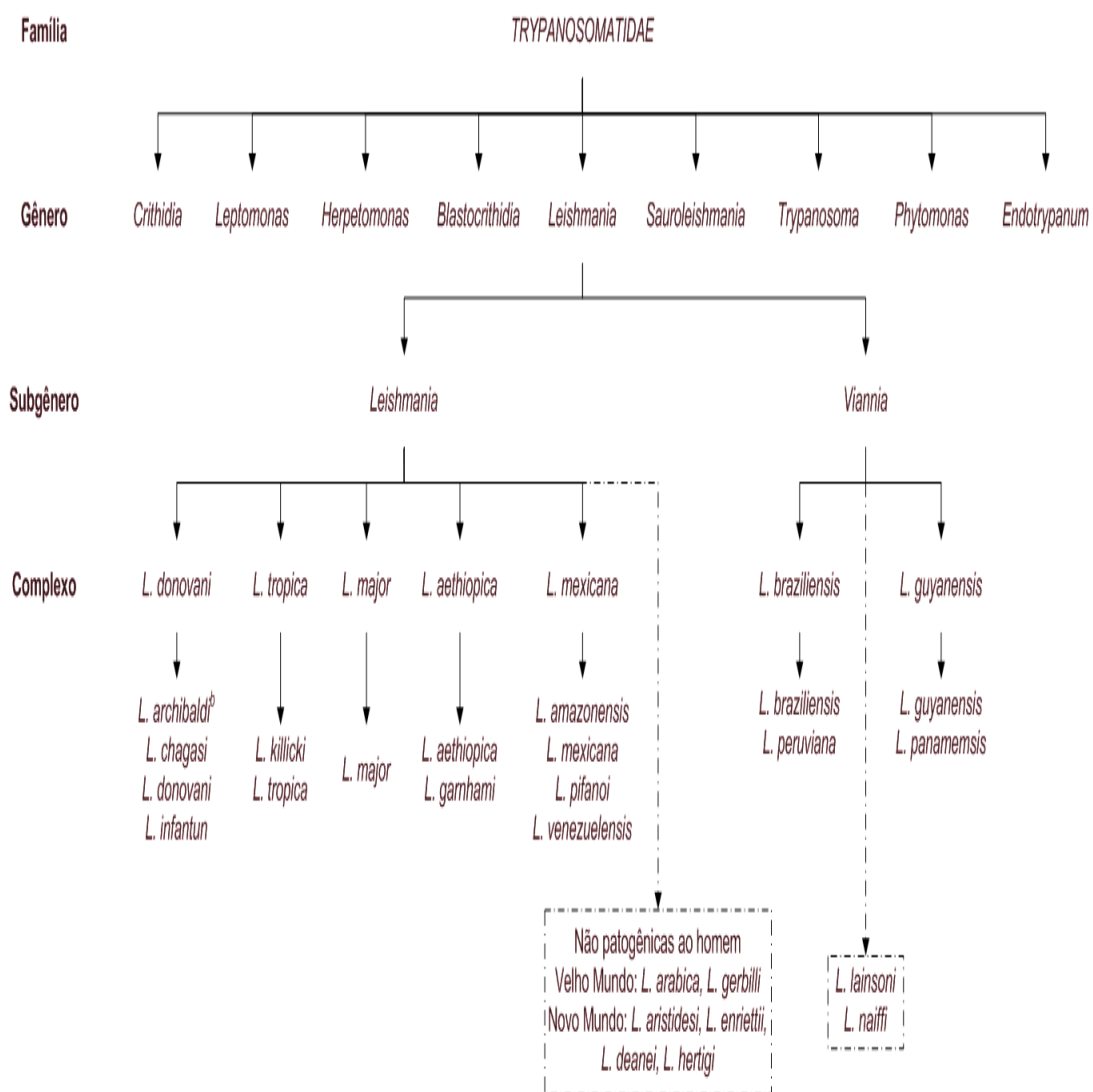
Taxonomicamente pertence ao Reino Protozoa, Filo Euglenozoa, constituídos por protozoários unicelulares e flagelados. Incluem-se na classe Kinetoplastida por apresentar uma única mitocôndria com uma especialização estruturada denominada cinetoplasto, formada por círculos de DNA localizando-se próximo a base do flagelo. Pertence a Ordem Trypanosomatida, Família Trypanosomatidae, que também engloba o gênero *Trypanosoma* e mais outros oito gêneros sendo agrupados em nove complexos (**Figura 3**) (Cavalier-Smith 1998, Rey 2001, Banuls et al. 2007).

No Brasil, as principais espécies envolvidas na infecção tegumentar (LTA) são: *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *Leishmania* (V.) *braziliensis* e *Leishmania* (L.) *guyanensis*. A espécie *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, é responsável pela infecção visceral (LVA) em seres humanos e cães (Cupolillo et al. 1994, Mauricio et al. 2001, Sucec 2001, Mishra et al. 2009, WHO 2010, Lainson & Shaw 1978).

É importante ressaltar a controvérsia que existe acerca da nomenclatura e classificação entre *Leishmania infantum* e *chagasi*. Há autores que consideram que apenas *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* seriam reconhecidas como agentes etiológicos da leishmaniose visceral, sendo que a primeira ocorria nas áreas endêmicas da Bacia do Mediterrâneo, na Europa, no norte da África e nas Américas Central e do Sul, e o segundo, nas áreas endêmicas da Índia, leste da África e Oriente Médio. A *Leishmania infantum* e *chagasi* seriam consideradas a mesma, devido a estudos moleculares que não observaram diferenças entre os parasitas (Mauricio et al. 1999, Mauricio et al. 2000, Mauricio et al. 2001). Alvar e colaboradores em seu trabalho de 2006 adotaram esse critério.

Recentemente Lainson e Rangel (2005) defenderam a manutenção do parasita em um nível subespecífico, como *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* e *Leishmania* (L.) *infantum infatum* com base em suas características etiológicas, como o habitat silvestre de seu flebotomíneo vetor, *Lutzomyia longipalpis*, e seu reservatório vertebrado natural (Lainson & Rangel 2005). A WHO até o manual de 2010 adotou esse sistema de classificação.

O presente estudo adotou a nomenclatura de Alvar et al (2006) e, portanto, trabalhou com as espécies *Leishmania* (L.) *donovani* e *Leishmania* (L.) *infatum*.

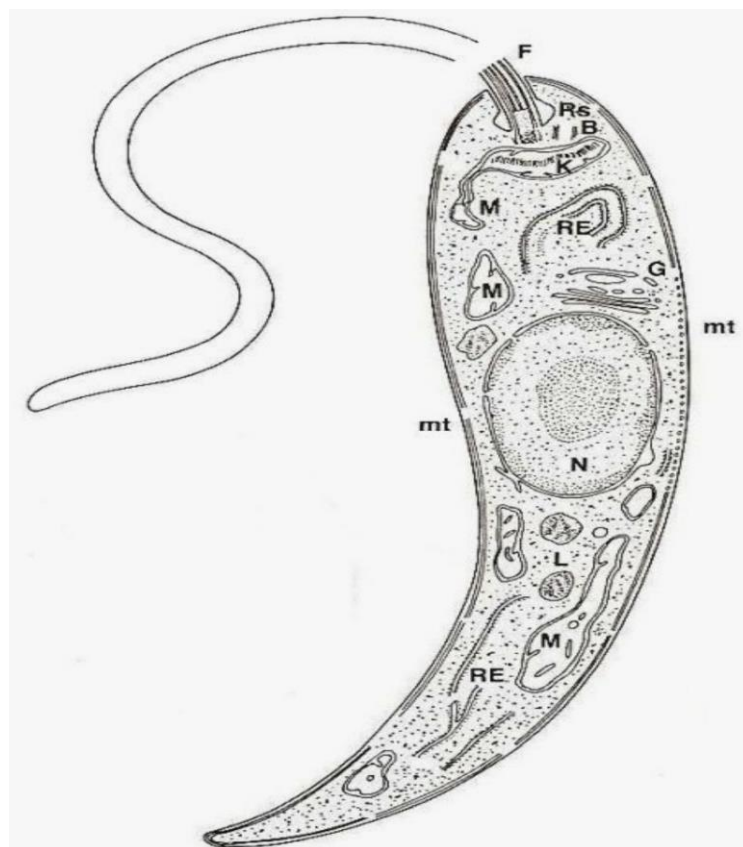


**Figura 3:** Taxonomia do gênero *Leishmania*

Fonte: (WHO 2010).

As duas principais formas distintas do parasita são denominadas promastigota e amastigota. A forma promastigota (**Figura 4 e 6**) é encontrada no tubo digestivo do inseto vetor. É alongada e assume um aspecto fusiforme, é flagelada e extracelular, possui dimensões entre 15 e 24 µm de comprimento por 2 a 3 µm de largura. O núcleo fica situado no terço médio da célula e o cinetoplasto encontra-se anterior ao núcleo, com o flagelo livre a partir da porção anterior. O flagelo deixa o corpo flexível dando motilidade (Rey 2001, Lodge & Descoteaux 2005).



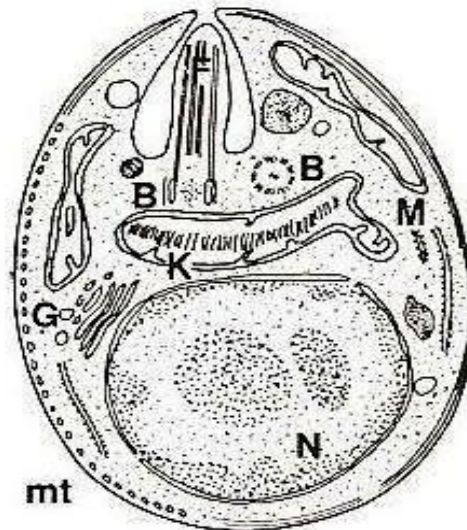


**Figura 4:** Representação esquemática da ultraestrutura da forma promastigota de *Leishmania*. Legenda: B: blefaroplasto, F: flagelo, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, L: lisossomo, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo, RE: retículo endoplasmático.

Fonte: (Rey 2001, Sucen 2001)

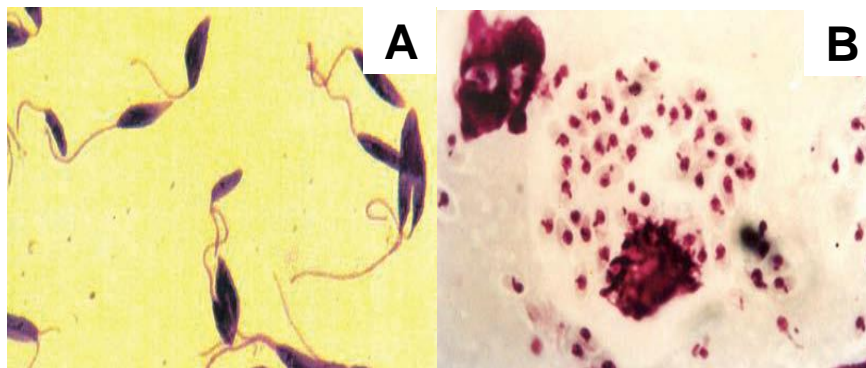
A forma amastigota é intracelular e sem movimento, presente nos tecidos do hospedeiro, é arredondada, e possui dimensões geralmente de 2 a 6  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura; apresenta limite externo formado por membrana celular unitária (**Figura 5 e 6**). O núcleo é excêntrico, contém geralmente dois nucléolos e abundante material granuloso forrando a membrana nuclear. Esta forma caracteriza-se por ser levemente achatada e de contorno ovoide, elíptico ou fusiforme e o flagelo curto interiorizado. O retículo endoplasmático é pouco abundante; o aparelho de Golgi, as vesículas e outras formações citoplásmicas não apresentam particularidades. A multiplicação dos amastigotas ocorre no interior de

vacúolos parasitóforos em macrófagos de diferentes tecidos, originando a doença na forma cutânea, mucocutânea e visceral (Rey 2001, Lodge & Descoteaux 2005).



**Figura 5:** Representação esquemática da ultraestrutura da forma amastigota de *Leishmania*. Legenda: B: blefaroplasto, G: aparelho de Golgi, K: cinetoplasto, M: mitocôndria, mt: microtúbulo, N: núcleo.

Fonte: (Rey 2001, Sucen 2001)



**Figura 6:** Observação microscópica da forma promastigota (A) e a forma amastigota (B)

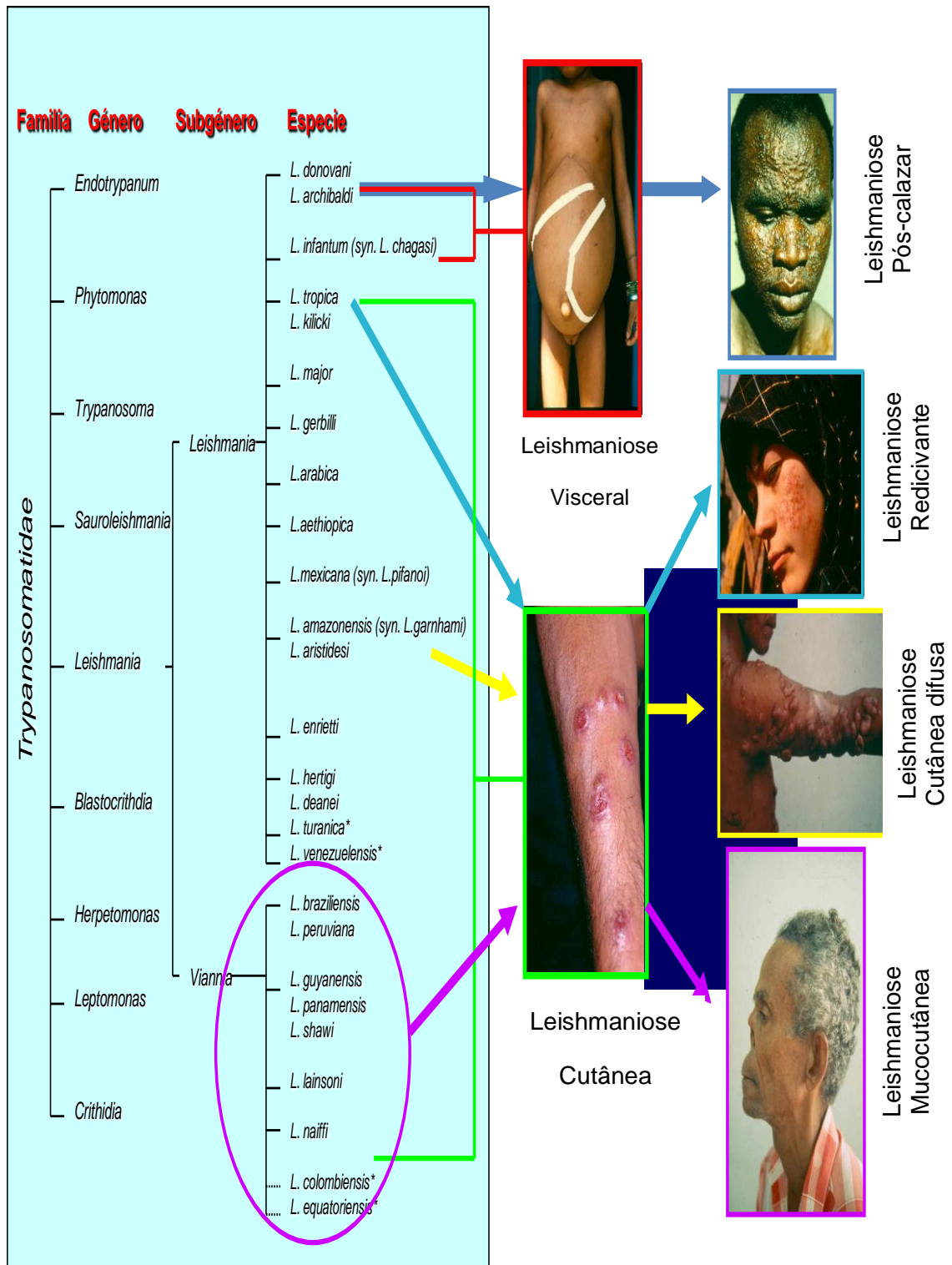
Fonte: (Rey 2001, Sucen 2001)

A forma e a gravidade das manifestações clínicas das enfermidades dependem tanto da espécie infectante como do estado imunológico do hospedeiro, porém podem ser classificada em três tipos básicos de leishmaniose:

- Leishmaniose cutânea - caracterizada por ulcerações limitadas na pele, no local da picada do vector, geralmente em zonas expostas do corpo (face, braços ou pernas).

- Leishmaniose mucocutânea - caracterizada pela destruição da mucosa e da cartilagem da boca e da faringe, seguida pelo tecido facial.

- Leishmaniose visceral - é a forma mais grave da doença e é acompanhada de alta mortalidade, se não tratada. Os parasitas apresentam acentuado tropismo pelo baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides. Causando febre, anorexia, palidez e posterior aparecimento de hepatoesplenomegalia, leucopenia e pancitopenia (**Figura 7**) (Rey 2001, Alvar et al. 2006, Santos et al. 2008).



**Figura 7:** Classificação taxonômica de *Leishmania* e suas manifestações clínicas em função das espécies infectantes.

Fonte: (Alvar et al. 2006)

### 1.3. Vetor e reservatório

Os vetores da leishmaniose são dípteros da família Psychodida, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. O gênero *Lutzomyia* (**Figura 8**) é conhecido popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Sucen 2001).

Os flebotomíneos adultos normalmente se alimentam a noite, do crepúsculo ao início da manhã. Eles têm uma capacidade de voo limitada a curtas distâncias, são sensíveis ao calor e tem um exoesqueleto delicado. No Brasil as principais espécies vetoras da leishmaniose cutânea americana são: *Lutzomyia whitmani*, *Lu. pessoai*, *Lu. migonei*, *Lu. intermedia*, *Lu. fischeri* e *Lu. wellcomei* (Lainson & Rangel 2005).

Existem cerca de 30 espécies de flebotomíneos envolvidas na transmissão dos agentes da leishmaniose visceral no mundo (Desjeux 1996). No Brasil, duas espécies, até o momento, estão relacionadas com a transmissão da doença *Lutzomyia longipalpis* e *Lutzomyia cruzi*. A primeira espécie é considerada a principal espécie transmissora da *L. infantum* no país e recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi incriminada como vetor no estado de Mato Grosso do Sul (MS 2006).



**Figura 8:** Fêmea de flebotomíneo adulto.

Fonte: (MS 2006).

Somente as fêmeas são hematófagas, pois necessitam de proteínas presentes no sangue para o desenvolvimento dos ovos. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, buracos de pau, ocos de bambu, uma vez que em tais ambientes as larvas encontram matéria orgânica, calor e umidade, condições necessárias para seu desenvolvimento (Sucen 2001).

Os flebotomíneos infectam-se durante o repasto sanguíneo no animal portador da doença, aspirando macrófagos parasitados, amastigotas livres no sangue ou tecidos e podem assim, transmitir a doença ao homem (Sucen 2001).

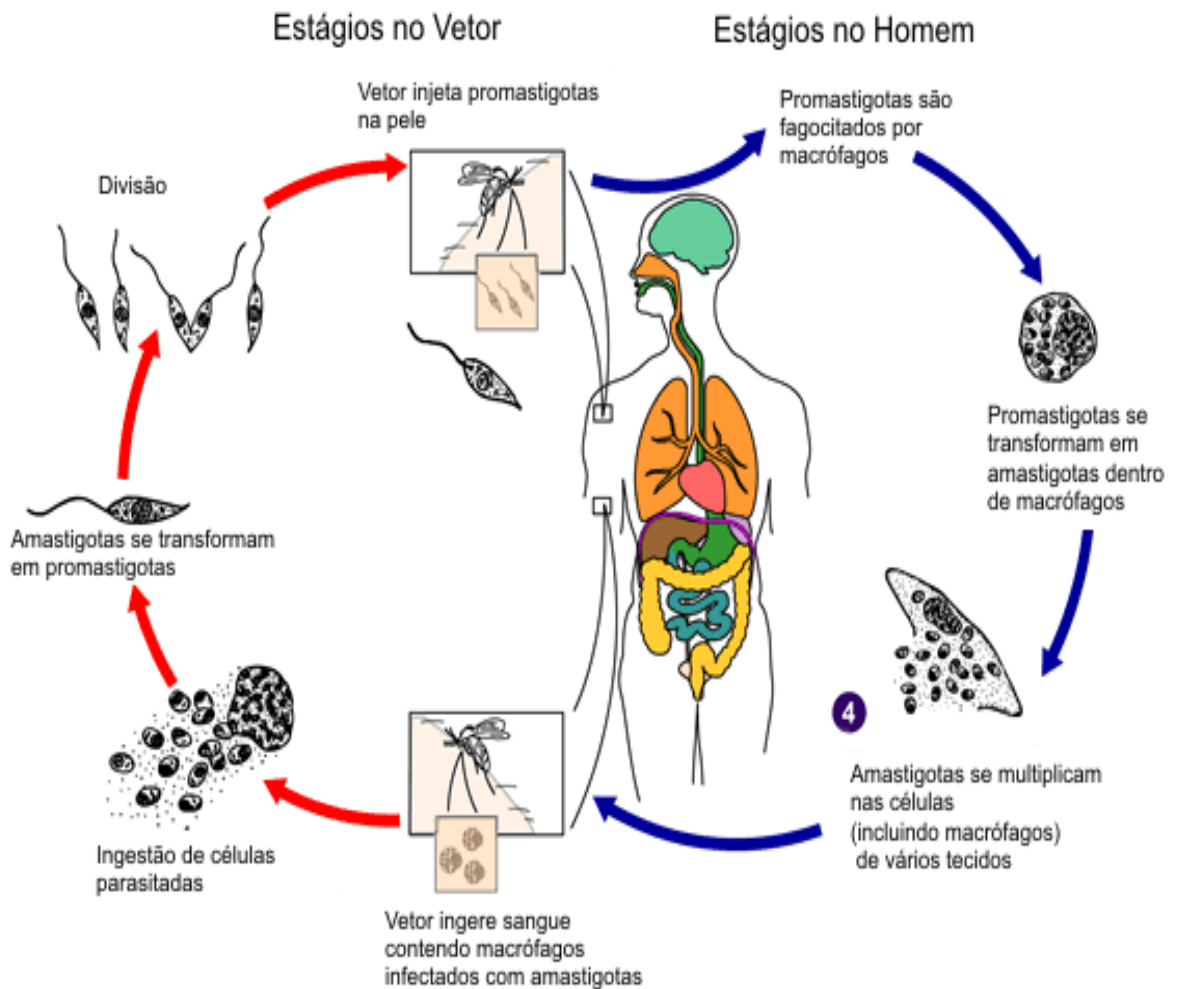
Os mamíferos portadores da leishmaniose são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas e outros; os reservatórios domésticos, como o cão, são considerados hospedeiros acidentais da leishmaniose. Na área urbana, o cão (*Canis familiaris*) é a principal fonte de infecção da LV. A enzootia canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente que no homem (Sucen 2001).

#### **1.4. Ciclo de vida**

O ciclo de vida do parasita tem dois momentos: um no hospedeiro invertebrado e outro no vertebrado. O flebotomíneo, durante a alimentação, regurgita parte do conteúdo do seu tubo digestório e assim transmite os promastigotas infectantes ao hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por células de defesa, especialmente macrófagos, e dentro de um vacúolo (fagossomo) se transformam em amastigotas. O vetor, durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado infectado, ingere uma pequena quantidade de sangue com macrófagos contendo as formas amastigotas. No tubo digestivo do vetor, os amastigotas se transformam em promastigotas, e estes ao

realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam as formas promastigotas juntamente com a saliva (**Figura 9**) (Roberts et al. 2000, Sacks & Kamhawi 2001).

No homem, a LT (Leishmaniose tegumentar) possui um período de incubação em média de 2 meses (ainda que possa variar entre 2 semanas a até 2 anos) podendo apresentar períodos mais curtos (2 semanas) e mais longos (2 anos). Já na LV, o período de incubação é bastante variável tanto para o homem, como para o cão. No homem, é de 10 dias a 24 meses com média entre 2 a 6 meses, e no cão, varia de 3 meses a vários anos, com média de 3 a 7 meses (Roberts et al. 2000, Sacks & Kamhawi 2001).



**Figura 9:** Ciclo de transmissão de leishmaniose.

Fonte: CDC (2014)

## 1.5. Características morfológicas e metabolismo energético

Determinadas características do gênero *Leishmania* determinam características morfológicas e moleculares únicas, o fato de apresentar um ciclo digenético e parasitar as células do sistema de defesa do hospedeiro vertebrado determina que a membrana plasmática do parasita apresente um número de peculiaridades e uma capacidade de sofrer mudanças drásticas em sua composição durante os diferentes estágios de vida do parasita (**Figura 10**).

### 1.5.1 Superfície celular

O principal componente da membrana plasmática, especialmente do promastigota, é um denso glicocálix formado por proteínas e oligossacarídeos ancoradas à membrana por estruturas do tipo glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Lodge & Descoteaux 2005).

Seus principais componentes são:

- Lipofosfoglicano (LPG): É o componente principal do glicocálix dos promastigotas,  $5 \times 10^6$  unidades por célula. Está presente na superfície da célula inteira, incluindo o flagelo. Na forma amastigota esse número é muito baixo  $10^2$ - $10^3$  unidades por células. O LPG permite a adesão do promastigota ao epitélio digestivo do vetor e proporciona a resistência à lise de enzimas hidrolíticas do tudo digestivo do inseto e do mecanismo do sistema imune. Em *L. donovani* o tamanho do LPG duplica durante metaciclogênese, aumentando a resistência à lise. LPG também atua retardando a maturação do vacúolo parasitário (**Figura 10**) (Guha-Niyogi et al. 2001).

- Fosfolipídios de glicosilinositol (GIPLs): São os componentes mais abundantes na superfície da célula de promastigotas e amastigotas (aproximadamente  $10^7$  unidades por célula), a sua importância é maior em amastigotas, devido à ausência de LPG e glicoproteína GPI - ancorada. Atuam como ligantes de receptores em macrófagos, inibindo a síntese de



NO (óxido nítrico) em macrófagos (**Figura 10**) (Guha-Niyogi et al. 2001, McConville et al. 2002).

- Glicoproteína (GP): É a principal proteína de promastigotas em *Leishmania*. Gp63 é uma glicoproteína ( $5 \times 10^5$  unidades por célula). Em amastigotas se encontra em número muito reduzido e se localiza na região do flagelo (Guha-Niyogi et al. 2001), ou dos lisossomos (Ilg et al. 1993). Ele atua como um fator de virulência e protege o parasita contra as proteases (Yao 2010). Em amastigotas, embora seja baixa a sua expressão, essa proteína aumenta a sobrevivência do parasita no macrófago (Chen et al. 2000). A Gp46 é uma proteína exclusiva dos promastigotas ( $4 \times 10^5$  unidades por célula), porém se encontram ausentes no complexo *braziliensis*. Sua principal função é a resistência à proteólise (Rivas et al. 1991, Lincoln et al. 2004). Como tal, a sua expressão aumenta na forma promastigotas metacíclica, e protege contra a lise por enzimas lisossomais (**Figura 10**) (Beetham et al. 1997).

- Proteofosfoglicanos (PPGs): É o componente principal em promastigotas, e é responsável por ocasionar a regurgitação do sangue em flebotomíneo, após a alimentação, devido à capacidade de formar um tampão que esse componente possui (Rogers et al. 2004). Também protege os promastigotas contra as enzimas de lise do tubo digestivo do vetor (Secundino et al. 2010).

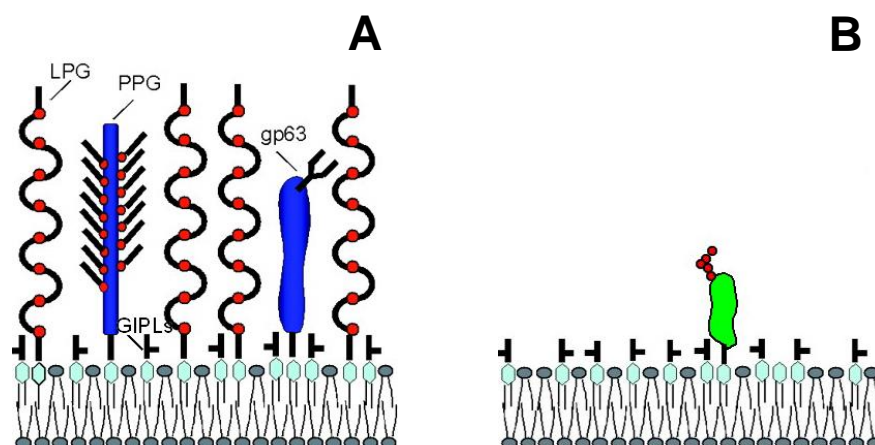
- Composição lipídica: A membrana plasmática do promastigota possui 30% de esteróis, sendo o principal, o ergosterol (**Tabela I**). A proporção de fosfolípidios ácidos é maior em *Leishmania* do que em eucariotas superiores (**Tabela I**) (Wassef et al. 1985).

**Tabela I:** Composição de fosfolípidios em promastigota de *L.donovani*, em comparação com eritrócitos de mamíferos.

Fosfolípido	Membrana Plasmática		Mitocondria de Leishmania (%)
	Eritrocito (%)	Promastigota (%)	
CL	0	0.6	10.5
FG	0	Traço	8.8
FE	22.8	37.7	10.7
FC	27.1	14.9	24.4
FI	1.4	17.9	14.3
FS	14.2	9.9	3.9
AF	1.4	Traço	Traço
Outros	33.1	19.0	27.5

Legenda: CL = Cardiolipina; FG =Fosfatidilglicerol; FE = Fosfatidiletanolamina; FC = fosfatidilcolina; FI = Fosfatidilinositol; FS =Fosfatidilserina; AF = Ácido fosfático  
 Fonte:(Wassef et al. 1985).

A composição dos fosfolípidios da membrana de amastigotas ainda não se encontram devidamente determinada, porém a união com anexina V a sua superfície demonstra a exposição de resíduos de fosfatidilserina, que atuam como inibidores da ativação de macrófagos (de Freitas Balanco et al. 2001).



**Figura 10:** Representação esquemática das principais moléculas de superfície da *Leishmania* promastigota (A) e amastigota (B). Legenda: LPG=lipofosfoglicano; PPG= proteofosfoglicano; GPIPLs= glicosilinositol fosfolípidos; gp63=glicoproteína 63.

Fonte: Modificado de(McConville et al. 2002).

Além das organelas comuns dos eucariotas, a *Leishmania* possui certas organelas exclusivas.

### 1.5.2. Organelas citoplasmáticas

- Os microtúbulos subpeliculares: A membrana citoplasmática é recoberta pelo seu lado interno, por uma rede de microtúbulos subpeliculares, que fornecem a células a rigidez necessária para manter a estabilidade morfológica contra a tensão mecânica (Morgan et al. 2002).

- Glicosomo: É uma organela única nos Kinetoplasta. Suas características morfológicas incluem essa organela no grupo pertencente aos peroxissomos (Moyersoen et al. 2004). Mais de 87% da proteína total do glicosomo corresponde às enzimas glicolítica e o resto compreendem outras enzimas envolvidas em diferentes processos metabólicos (Opperdoes 1990, Michels et al. 2006).

- Megasoma: É uma organela volumosa e é caracterizada por um elevado teor de enzimas lisossomais. A sua presença tem sido descrita no Complexo *mexicana* e está associada com a capacidade invasiva dos amastigotas e a subverter o sistema imunológico (McKerrow et al. 1993, Alberio et al. 2004).

- Cinetoplasto: É o DNA-mitochondrial presente na mitocôndria. O gênero *Leishmania* apresenta uma única mitocôndria e o DNA mitochondrial se apresenta condensado em uma região próxima aos corpúsculos basais do flagelo (nove pares de microtúbulos concêntricos e um par central) sendo chamado de cinetoplasto, onde fica armazenado o kDNA, que representa 20% do DNA total celular. No espaço intermembrana, cuja composição iônica é semelhante à do citosol, contém um distinto grupo de proteínas incluindo o citocromo c (Lesnefsky et al. 2001, Liu et al. 2005).

### 1.5.3. Metabolismo energético

#### 1.5.3.1. Catabolismo da glicose

A *Leishmania* adquire D-glucose por meio de difusão facilitada através de transportadores específicos (Ter Kuile & Opperdoes 1993), 3 genes foram descritos em *L. mexicana* sendo responsáveis por essa função (Burchmore & Landfear 1998). Os estágios iniciais da glicólise são realizados no glicosomo (**Figura 11**). As conclusões gerais do catabolismo da glicose podem ser resumidas em: (Blum 1993, Opperdoes & Coombs 2007).

a) Os hidratos de carbono são metabolizados aerobicamente produzindo como metabólitos finais o succinato, acetato, piruvato, alanina, lactato e glicerol.

b) A glicólise desempenha um papel secundário para satisfazer as exigências de energia do parasita, sendo a principal fonte de energia os aminoácidos.

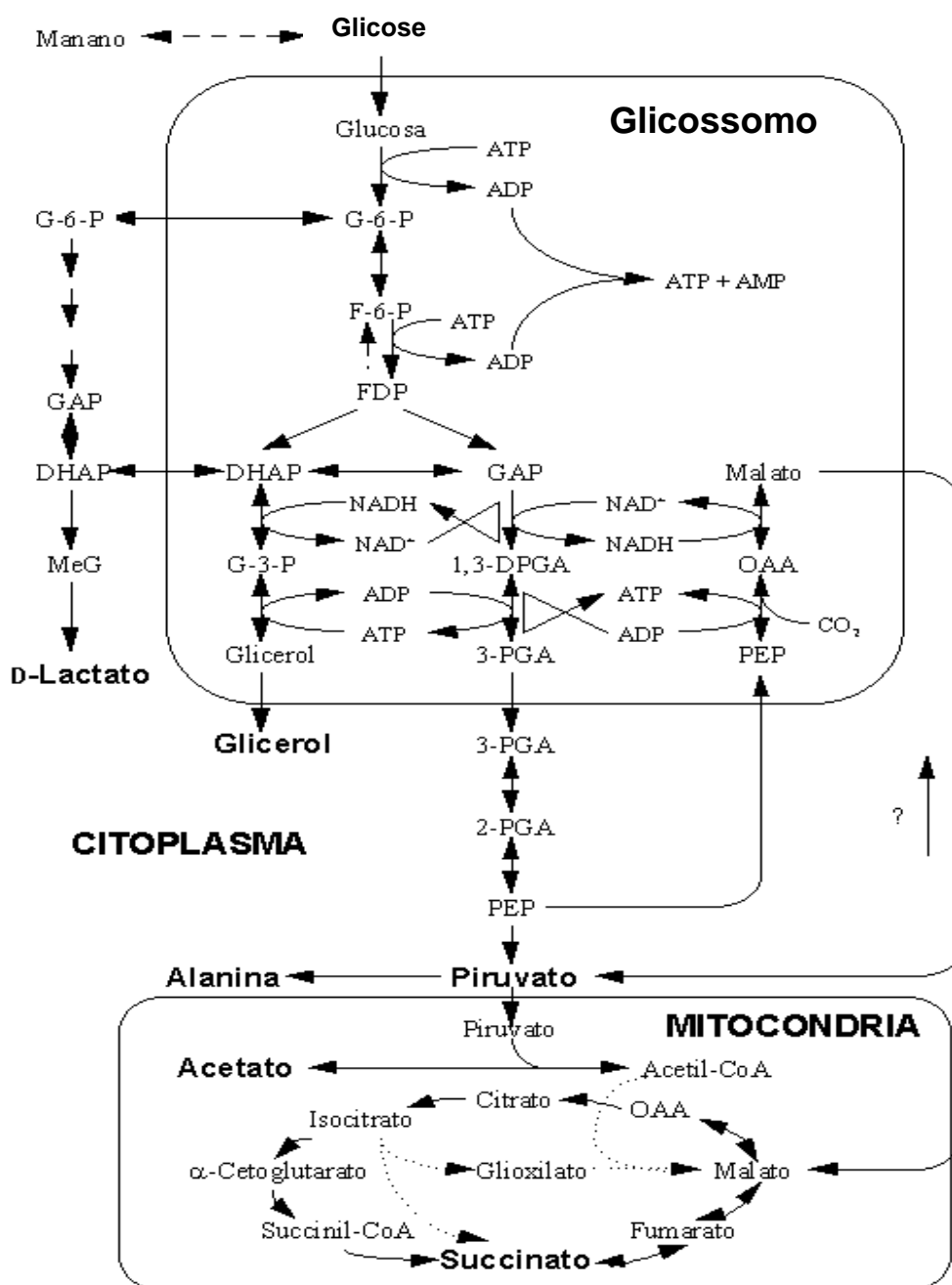
c) A utilização de glicose é mais elevada em células em fase logarítmica, que em células em fase estacionária.

d) Os amastigotas de *L. pifanoi* em aerobiose liberam praticamente os mesmos produtos, mas em diferentes proporções (Rainey & MacKenzie 1991, Blum 1993).

e) Em condições anaeróbicas, a captação de glicose em promastigotas decresce atingindo números nulos em condições anaeróbicas (100% N<sub>2</sub>). Esta situação se reverte em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> (5%), provavelmente devido à fixação de CO<sub>2</sub> ao fosfoenolpiruvato para formar oxaloacetato, utilizada no ciclo de Krebs inverso a formação de succinato (Blum 1993).

Comparado às outras células eucariotas com a *Leishmania* observa-se que a grande diferença está que nas células eucariotas as enzimas hex-fosfofrutoquinase são responsáveis pela regulação da glicólise enquanto a *Leishmania* realiza a nível piruvato quinase. A frutose - 2,6 - bifosfato é um regulador potente de fosfofrutoquinase de outras células eucarióticas e foi

detectado em *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* spp. e *Crithidia* spp., é um eficaz ativador alostérico do piruvato quinase de tripanosomatídeos (van Schaftingen et al. 1985), um processo exclusivo desse grupo, e ausente em Euglena, leveduras e mamíferos (Oppenheimer 1990). O piruvato quinase de *L. major* também é ativado pela frutose -1,6- bisfosfato e fosfoenolpiruvato, e inibida por nucleotídeo trifosfato (ATP, GTP, ITP), o que sugere uma diminuição do fluxo glicolítico em células com uma carga elevada de energia (Ernest et al. 1994).



**Figura 11:** Esquema das principais rotas do metabolismo da glicose em *Leishmania*. Os principais produtos do metabolismo se mostram em negrito. O ciclo de glioxilato se representa em linhas de pontos, enquanto a rota do metabolismo do manano, desconhecida até a data, se apresenta como linha descontinua. G-6-P.- Glucosa-6-fosfato; F-6-P.- Frutose-6-fosfato; FDP.- Frutose-1,6-bisfosfato; DHAP.- Dihidroxiacetona-fosfato; GAP.- Gliceraldeído-3-fosfato; 1,3-PGA.- 1,3-Difosfoglicerato; 3-PGA.- 3-Fosfoglicerato; 2-PGA.- 2-Fosfoglicerato; PEP.- Fosfoenolpiruvato; G-3-P.- Glicerol-3-fosfato; OAA.- Oxalacetato; MeG.- Metil-glioxal.

Fonte: Modificado de (Opperdoes & Coombs 2007).

### 1.5.3.2. Mitocôndria e fosforilação oxidativa

O gênero *Leishmania* tem uma única mitocôndria, ramificada e estendida por toda a célula, que ocupa cerca de 11% do volume da célula (Coombs et al. 1986).

A membrana externa é constituída por cerca de 50% de lipídios e 50% de proteínas. Certas proteínas (porinas) formam canais que tornam a membrana permeável a moléculas de peso molecular até 6000 daltons. Por sua vez, a membrana interna é responsável pelas funções fisiológicas da mitocôndria, e é constituída por 20% de lipídios e 80% de proteínas, principais responsáveis pela síntese de ATP (Salvador 2003).

Em *L. donovani* a fosforilação oxidativa representa a principal fonte de ATP necessária para a sobrevivência e crescimento do parasita (Van Hellemond & Tielens 1997, Sen et al. 2006). A fosforilação oxidativa está envolvida em diversos processos e vias metabólicas, tais como: Conversão do piruvato a acetil-CoA, processo este catalisado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; ciclo do ácido cítrico; fosforilação oxidativa, que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória acoplada à síntese de ATP; degradação dos ácidos graxos; fornecimento de intermediários metabólicos à célula; armazenamento de cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático a um nível baixo e constante; síntese de DNA, RNA e proteínas; reparação do DNA e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Pedersen 1999).

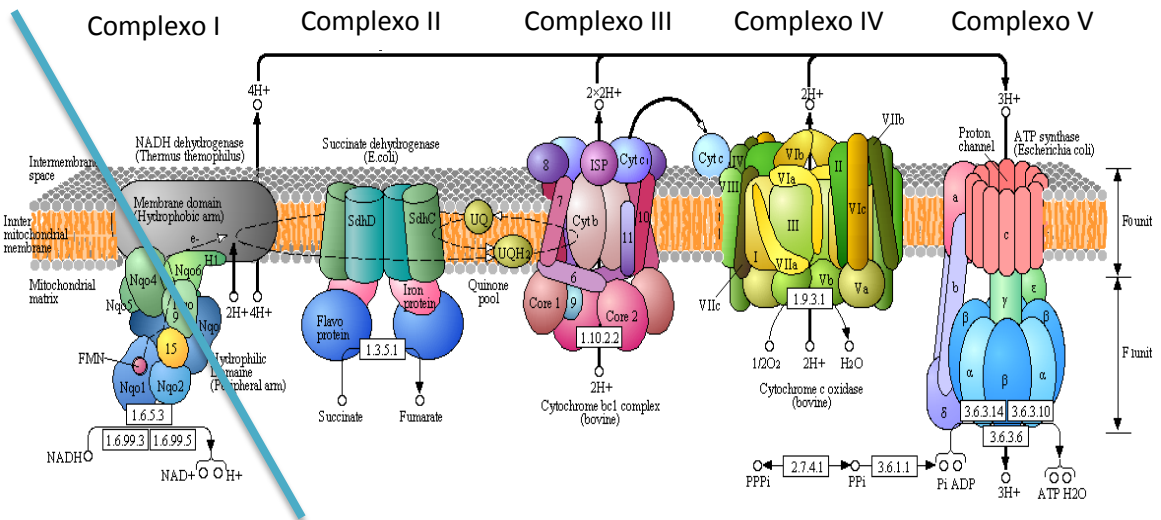
A cadeia de transporte de elétrons acoplada à ATPase mitocôndrial é a responsável direta pela geração de ATP por fosforilação oxidativa (**Figura 12**), cuja presença foi demonstrada em 1988 promastigotas de *L. donovani* (Rassam & Robert 1988, Zilberstein & Dwyer 1988). A total dependência da cadeia respiratória para manter as funções celulares, e a ausência de um metabolismo fermentativo, que permite ao parasita prosperar em anaerobiose, se manifesta quando o oxigênio não pode ser utilizado como aceptor terminal de elétrons, forçando o parasita a reduzir o gasto de energia resultando na inibição do crescimento e da mobilidade (Van Hellemond & Tielens 1997). Essa situação se produz por um bloqueio da

cadeia respiratória com inibidores clássicos como antimicina A (Complexo III) ou cianeto (Complexo IV). Essa situação é reversível, retomando as funções metabólicas do parasita, sempre que a inibição na cadeia de transporte de elétrons ou a falta de oxigênio não exceda 48 horas (Van Hellemond & Tielens 1997).

O estudo da funcionalidade das mitocôndrias de *Leishmania* conta sempre com a dificuldade de isolar a organela intacta, devido à sua complexidade estrutural e a existência da camada subpelicular de microtúbulos sob a membrana plasmática do parasita, o que lhe confere uma elevada resistência à lise. Esta última característica torna necessário usar condições especialmente drásticas para conseguir a lise do parasita. O uso de digitonina, em um intervalo de concentrações específicas, obtém uma permeabilização seletiva da membrana plasmática sem alterar a membrana mitocondrial interna, pela ausência de esteróis nesta. Esta técnica permite o acesso aos inibidores e substratos para a mitocôndria, e evita o isolamento da organela (Vercesi et al. 1991). Por estudos espectroscópicos demonstrou-se a presença de citocromos *b*, *c*, *a* e *a<sub>3</sub>*, junto com a coenzima Q (ubiquinona) em *L. tropica*, assim como em outros tripanossomatídeos (Hill 1976), o citocromo *b* é mais abundante do que o citocromo *a*, *a<sub>3</sub>* e citocromo *c* (atípico em comparação aos mamíferos). Usando diferentes inibidores detectou a presença de uma NADH desidrogenase atípico em *L. tropica* (Martin & Mukkada 1979), *L. mexicana* (Hart et al. 1981) e *L. donovani* (Santhamma & Bhaduri 1995, Bermudez et al. 1997). Em *Leishmania* a respiração é dependente de succinato e é similar a de mamíferos: Sua oxidação por succinato coenzima Q redutase (Complexo II), é inibida por malonato e 4,4,4-trifluoro-1-(2-tionil) 1.3 (TTFA), seguida pela oxidação da coenzima Q e redução do citocromo *c* oxidase (Complexo III), que transfere os elétrons do citocromo *c* oxidase (Complexo IV). Em todo o caso o consumo de O<sub>2</sub> é inibido pelo malonato (Santhamma & Bhaduri 1995), seletivo do Complexo II demonstram a importância do succinato como doador de elétrons a esses parasitas, em detrimento do NADH e do complexo I. Na *Leishmania* o complexo I não apresenta função, assim como



em outros Trypanosomatídeos, já que carece de subunidades requeridas para o transporte de H<sup>+</sup>. Diferença essa existente entre a fosforilação oxidativa em mamíferos, que apresentam o complexo I operante (Santhamma & Bhaduri 1995, Bermudez et al. 1997).



**Figura 12:** Modelo de esquema da fosforilação oxidativa em *Leishmania* ssp. O traçado azul indica que o complexo I encontra-se inativo em *Leishmania*.

Fonte: Modificado de Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<http://www.genome.ad.jp>).

Alguns trabalhos demonstram que a mitocôndria é responsável por controlar a vida e a morte da célula. A permeabilidade da membrana mitocondrial precede o processo de morte celular, sendo um de seus principais indicadores (Loeffler & Kroemer 2000).

Em organismos multicelulares, a apoptose é um processo fisiológico essencial, necessário ao desenvolvimento normal e à manutenção da homeostase dos tecidos (Fumarola & Guidotti 2004). No entanto, a apoptose está também envolvida em diversos processos patológicos, tais como: doença neurodegenerativa, imunológica e cancerígeno. Assim, após um sinal apoptótico na célula, ocorre uma série de alterações resultando em sua

morte. Este processo foi observado em formas amastigotas de *Leishmania* por Lindoso e colaboradores (2004) como o responsável pela regulação da população de parasitas durante certas fases da infecção. A necrose por sua vez, pode ser provocada por estresse ou dano celular. Ocorre um rápido colapso da homeostase interna acompanhada de lise da membrana citoplasmática e das membranas internas com liberação de restos celulares para o espaço extracelular, gerando processo inflamatório. É caracterizada morfológicamente pela formação de protuberâncias na membrana plasmática seguida pela eventual ruptura de algumas delas e a consequente liberação de componentes citosólicos (Lindoso et al. 2004).

A principal diferença entre a necrose e a apoptose está relacionada aos aspectos bioenergéticos, já que o nível de ATP no processo de necrose diminui drasticamente, gerando a morte celular. No processo de apoptose, a reserva de ATP se mantém parcialmente, já que o processo é dependente de energia (Malhi et al. 2006). De acordo com o exposto, a mitocôndria se mostra um elemento fundamental nos processos de morte celular, tanto por apoptose quanto necrose.

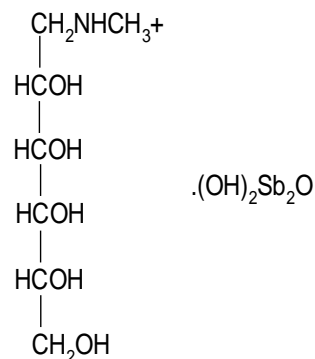
A mitocôndria de tripanossomatídeos vem sendo estudada como um alvo em potencial para fármacos, visto que se apresenta como organela única no parasita (Fidalgo & Gille 2011).

## 1.6. Formas de Tratamento

### 1.6.1. Quimioterapia

No Brasil o fármaco de primeira escolha é o antimonial pentavalente, o antimoniato de N-metil glucamina (**Figura 13**), Glucantime®, (Rhodia-Brasil), com 425 mg do antimonial ou 1,5 g de  $Sb^{5+}$  à 8,5% (85 mg/mL), desde os anos 50. Outro composto antimonial é o estibogluconato de sódio, Pentostam® (Glaxo-Wellcome-UK) que contém 10%  $Sb^{5+}$  (100 mg/mL), não comercializado no Brasil. O antimonial é indicado como primeira escolha

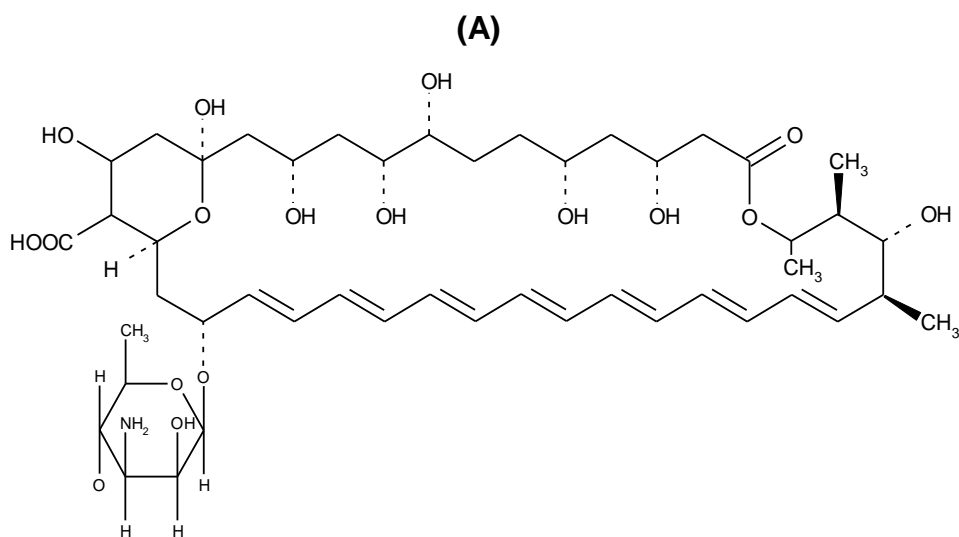
para o tratamento de todas as formas de LT, com exceção dos pacientes coinfectados com HIV e gestantes. Destaca-se, ainda, que as formas mucosas exigem maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas (Pessoa 1963 , Genaro 2003).



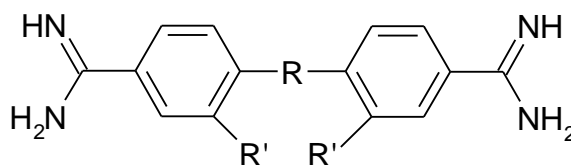
**Figura 13:** Estrutura química proposta do antimoniato de N-metilglucamina.

Fonte: (Rath et al. 2003) (modificado).

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, os fármacos de segunda escolha são a anfotericina B (**Figura 14 A**) e o isotionato de pentamidina - Lomidine® (**Figura 14 B**) (Pessoa 1963 , Genaro 2003, WHO 2010).



(B)



**Figura 14:** Estrutura química: (A) anfotericina; (B) pentamidina.

Fonte:(Rath et al. 2003)(modificado).

Há restrições do uso dos antimoniais em pacientes coinfectados com HIV, com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas. Há diversos efeitos colaterais, sendo mais frequentes: artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, palpitação, insônia, nervosismo, choque pirogênico, edema e insuficiência renal aguda. Em seu limiar de toxicidade, pode levar a alterações cardíacas, renais, obrigando nesse caso a suspensão do tratamento (Croft & Coombs 2003, Medeiros et al. 2005).

Os antimoniais pentavalentes são considerados leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*. Tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, processos localizados em organelas peculiares, são inibidos, sendo que essa inibição é acompanhada de redução na produção de ATP e GTP (Medeiros et al. 2005).

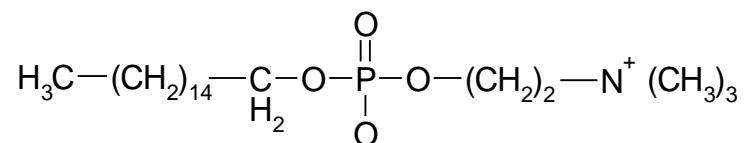
O desoxicolato de anfotericina B é um antibiótico, sendo 400 vezes mais potente que o antimonial pentavalente. É considerada como fármaco de primeira escolha no tratamento de pacientes gestantes com LT e pacientes com coinfeção *Leishmania* / HIV. Apresenta toxicidade seletiva por sua interferência nos ésteres (episterol, precursor do ergosterol) da membrana citoplasmática de *Leishmania*

No caso em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso, há a indicação do uso da anfotericina B lipossomal,

disponíveis em três formas de apresentação: anfotericina B lipossomal (Ambisone®), anfotericina B de dispersão coloidal e anfotericina B de complexo lipídico (Amphocil®) (Ribeiro & Michalick 2001, Sucen 2001).

A miltefosina (**Figura 15**) é alquilfosfocolina que tem atividade contra células cancerígenas, é um medicamento indicado nos casos de LV de moderada intensidade. Durante os testes clínicos realizados na Índia, foi usado por via oral a 2,5 mg/kg/dia, por 28 dias e observou-se que 95% dos pacientes tratados foram curados (Medeiros et al. 2005). Por dez anos, este medicamento vem sendo utilizado na Índia para o tratamento da LV e hoje é medicamento de primeira escolha no tratamento (Dorlo et al. 2012). Na Colômbia e Bolívia é usado como medicamento de segunda escolha em leishmaniose mucocutânea (Alvar et al. 2006).

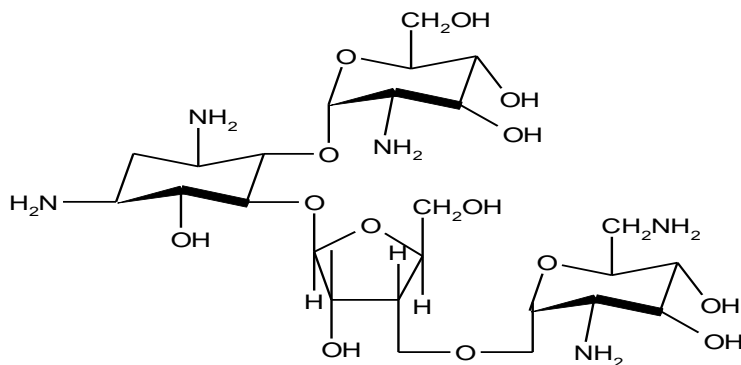
Os possíveis alvos da miltefosina em *Leishmania* incluem a interferência no metabolismo éter-lipídico, biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e no sinal de transdução (Lux et al. 1996). Mitocôndrias e, especificamente, a citocromo oxidase C têm sido implicados como alvos da miltefosina em promastigotas de *L. (L.) donovani* (Luque-Ortega & Rivas 2007, Luque-Ortega et al. 2012).



**Figura 15:** Estrutura química da miltefosina.

Fonte: (Rath et al. 2003)(modificado).

A paromomicina (**Figura 16**) é um medicamento candidato também ao tratamento da LV. É um exemplo de *Drug repurposing*, pois é um amonoglicósido, desenvolvido como antibacteriano. Os estudos clínicos estão na fase III no leste da África, com intenção de registrar o medicamento na Etiópia, Sudão e Quênia. O *Institute One World Health* conduziu os estudos da fase III com a paromomicina com fins de registro na Índia (Lotrowska & Zackiewscz 2005 ).



**Figura 16:** Estrutura química da paromomicina.

Fonte: (Rath et al. 2003) (modificado).

A sitamaquina é um fármaco oral derivado da 8-aminoquinolina, atualmente em desenvolvimento (Yeates 2002). Foram realizados estudos de fase II no Brasil, Quênia e Índia, com taxas de cura variando de 27 a 87%, com vários casos de efeitos renais sérios (Dietze et al. 2001, Wasunna et al. 2005). Atua no complexo II (succinato desidrogenase) da cadeia respiratória (Carvalho et al. 2011).

### 1.6.1. Problemas da quimioterapia atual

Os principais problemas são os efeitos secundários graves, como já mencionados, com exceção da anfotericina lipossomal e da miltefosina, diversas doenças secundárias gastrointestinais e vômitos constantes são ocasionados durante o tratamento, além da teratogenicidade que impede a o tratamento de crianças e mulheres em idades férteis. Outro grave problema é o custo elevado dos fármacos, especialmente da anfotericina lipossomal Ambisome, apesar do acordo do fabricante Gilead com a WHO, que reduziu o preço e a alta efetividade (resultados satisfatórios com um dose), o tratamento ainda é muito custo.

Talvez o problema mais grave seja a resistência, estes esforços em buscar novas alternativas para o tratamento é devido à resistência crescente

ao antimônio em Bihar, Índia, onde estão aproximadamente 40% dos casos mundiais de resistência (Croft & Coombs 2003). Em pleno século XXI ainda é utilizado como fármaco de primeira escolha, uma substância sintetizada em 1940. Pouco se avançou nessa área até o presente momento, isso porque a América Latina representa apenas cerca de 3,8% do mercado da indústria farmacêutica mundial enquanto que os países ricos representam 90%, de um mercado de 518 bilhões, orientando as prioridades de pesquisa e desenvolvimento de fármacos no mundo (Lotrowska & Zackiewicz 2005 ).

Uma das estratégias para preservar a eficácia dos poucos fármacos existentes é a terapia combinatória, onde se utilizam dois fármacos com nula resistência cruzada para prevenir o surgimento de resistências, ainda que se induzam ao parasita a resistência a essas específicas combinações, essa técnica acaba sendo uma alternativa no tratamento.

## 2. Estratégias para o estudo de novas terapias

A leishmaniose é uma doença negligenciada, que atinge as populações de baixa renda, não despertando o interesse das indústrias farmacêuticas em investir na pesquisa de novos fármacos. Os fármacos atuais são escassos e com diversos efeitos colaterais. De forma geral, novas alternativas terapêuticas devem ser investigadas na busca de novas formas de tratamento da doença, principalmente tratamentos de baixo custo, acessíveis aos países em desenvolvimento, com prioridade a medicamentos orais que evitam a internação do paciente, elevando o custo do tratamento. As principais abordagens nessa busca são: encontro ao acaso, triagem empírica, triagem de bibliotecas químicas, extração de princípios ativos de fontes naturais, modificação molecular de compostos já existentes, síntese, reposicionamento de fármacos, associação de fármacos. (Korolkovas 1982, Tempone et al. 2011, DNDi 2014).

Dentre as abordagens citadas, o presente trabalho teve como foco de pesquisa: a triagem (*screening*) de bibliotecas químicas e o reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*).

### 2.1. Triagem (*screening*) de bibliotecas químicas

A triagem de compostos sintetizados, tem se tornado uma das prioridades nos programas de *Drug Discovery*, tanto na indústria como no setor acadêmico, como uma alternativa de novas moléculas com ações dirigidas na célula (Bajorath 2002, Bleicher et al. 2003).

O método de obter novos fármacos através da modificação molecular de compostos sintéticos, tem se mostrado recompensador. Consiste em usar uma substância de ação biológica conhecida como modelo ou protótipo e sintetizar novos compostos que sejam homólogos ou análogos estruturais do fármaco matriz. São dois os objetivos desse método:

1. Descobrir o grupo farmacofórico, que consiste no grupamento que lhe confere ação farmacológica,



2. Obter fármacos que apresentem propriedades mais desejáveis que o protótipo em potencial, especificidade, duração de ação, facilidade de administração, estabilidade, custo, dentre outros.

Alguns exemplos de fármacos obtidos por esse método são: efedrina, cinarina e prednazato (Korolkovas 1982). O planejamento racional de fármacos fundamenta-se basicamente no conhecimento da estrutura molecular dos receptores, o que possibilita elaborar substâncias com perfis farmacológicos mais definidos. Para tanto, as hipóteses são elaboradas fundamentando-se no conhecimento das propriedades físico-químicas dos compostos ativos e seus respectivos sítios moleculares de ação (Amaral et al. 2003).

No estudo de bibliotecas químicas estudou-se a ação de sais de fosfônios, amônios, piridínicos e quinolínicos

Sais de fosfônios vêm sendo bastante explorados como protótipos antiparasitários. Kinnamon et al (1979) relataram pela primeira vez, a atividade *in vivo* de sais de benziltrifenilfosfônio, contra *Trypanosoma rhodesiense*. Compostos derivados de dibrometo de bifosfônio (4,4'-bis ((tri-*n*-pentilfosfônio)metil) benzofenona) também demonstraram atividade anti-*Tripanossoma brucei* (Taladriz et al. 2012). Estudos demonstraram a atividade anti-*T.brucei rodesiense*, anti-*T.cruzi* e anti-*Leishmania mexicana*, anti- *Leishmania donovani*. Os valores de CE<sub>50</sub> foram muito promissores, sendo CE<sub>50</sub> de 1µM para *Leishmania donovani* (Luque-Ortega et al. 2010) e CE<sub>50</sub> de 0.011µM para *Tripanosoma brucei* (Taladriz et al. 2012). Além disso, um composto derivado de bifosfônio 4,4'-bis ((tri-*n*-pentafosfônio)metil) benzofenol dibromideo, apresentou valores de CE<sub>50</sub> de 0.04µM em *Tripanosoma brucei* (Dardonville & Brun 2004).

Também foram encontrados relatos de atividade contra o parasita *Schistosoma mansoni* (McAllister et al. 1980).

Desta forma, sais de bifosfônio vêm se destacando com uma classe promissora de novos candidatos antiparasitários (Taladriz et al. 2012).

## 2.2. Reposicionamento de fármacos (*drug repurposing*)

O reposicionamento de fármacos consiste em encontrar novas indicações terapêuticas para os fármacos já aprovados no mercado. Esta é uma estratégia cada vez mais utilizada para encontrar novos medicamentos. Esta abordagem é de grande interesse principalmente para doenças negligenciadas porque os dados de segurança e eficácia já se encontram disponíveis e podem ser aproveitados. Coletar e disponibilizar ao público o máximo de dados possível sobre o perfil e alvo dos fármacos oferece oportunidades para redefinição do seu uso. Para as empresas farmacêuticas, o reposicionamento tem significativo valor comercial, uma vez que amplia o mercado para um fármaco, encontrando novos usos, oferecendo menor risco financeiro e um período de tempo mais curto para obtenção dos lucros (Sundar et al. 2002, Ashburn &Thor 2004, Croft et al. 2006, Ekins et al. 2011).

Trabalhar com reposição permite trabalhar com alvos conhecidos com estudos clínicos já realizados, possibilitando um menor tempo de pesquisa e menor custo em comparação a outros estudos (Ekins et al. 2011).

Um grande número de fármacos que foram desenvolvidos para outras doenças tem sido utilizado com sucesso como terapia para doenças infecciosas em países em desenvolvimento. No tratamento da LV, exemplos de sucesso de reposicionamento são a miltefosina e a pentamidina, sendo que a primeira foi inicialmente desenvolvida para o tratamento do câncer de mama (Sundar et al. 2002, Ekins et al. 2011); e a segunda foi sintetizada como hipoglicemiante. A anfotericina B e os azóis também são exemplo, eles foram primeiramente usados no tratamento de infecções fúngicas (Olliaro et al. 2005, Croft et al. 2006, Tiuman et al. 2011).

No estudo de reposição de fármaco, foi escolhido o fármaco buparvaquona.

Esse fármaco é utilizado na veterinária e é denominado Butalex® (Butalex®Coopers Animal Health Ltd, Berkhamsted, Herts, UK). É uma naftoquinona recomendada como padrão ouro no tratamento da theileriose bovina, doença de grande impacto econômico nos países do norte da África

e Ásia. É causada pela infecção de parasitas no estágio esporozoíta de *Theileria parvum*, um protozoário do filo Apicomplexa, mesmo filo pertencente do *Plasmodium*. A *Theileria* é um parasita de macrófagos bovinos (McHardy et al. 1985), apresentou relatos de atividade anti-*Leishmania* por Croft e colaboradores (1992).

A buparvaquona é uma molécula pequena, com peso molecular de 326 g/mol, além da atividade descrita para *Leishmania*, também foi descrita atividade para malária (Martin et al. 1973) (Gokhale et al. 2003), criptosporidiose (Kayser et al. 2001), *Pneumocystis carinii* pneumonia (Kaneshiro et al. 2001).

Apesar de sua atividade promissora anti-*Leishmania in vitro* com valores em nanomolares (Croft et al. 1992), em experimentos *in vivo*, os resultados não foram promissores, mostrando baixa supressão da carga parasitária em camundongos infectados com *L. (L.) donovani* e nenhum efeito em cães infectados com *L. (L.) infantum* (Vexenat et al. 1998). Porém estudos recentes de nosso grupo demonstraram uma atividade promissora deste fármaco na forma lipossomal a 0.4 mg/kg, reduzindo a carga parasitária em mais de 90% de hamsters infectados com *L. infantum* (Reimao et al. 2012). Apesar disso, poucos estudos vêm abordando o mecanismo de ação deste fármaco (Muller & Jacobs 2002, Gokhale et al. 2003, Venkatesh et al. 2008), evidenciando a carências de estudos desse promissor fármaco para leishmaniose.

## **OBJETIVO**

## 1. Objetivo Geral:

Estudo do metabolismo energético de *Leishmania* spp. como alvo terapêutico para compostos tanto de nova síntese, com as benzofenonas, como de reposicionamento, com o fármaco buparvaquona.

## 2. Objetivos específicos:

1. Determinação da atividade leishmanicida *in vitro* de uma biblioteca de 63 benzofenonas e do fármaco buparvaquona.

1.a - Avaliar *in vitro* a Concentração Efetiva  $CE_{50}$  e Concentração inibitória  $CI_{50}$  nas formas, promastigota de *L. donovani* e amastigota axênico de *L. pifanoi* dos 63 compostos, e do fármaco buparvaquona em *L. infantum* e *L. pifanoi*.

1.b - Determinação do índice de seletividade desses compostos sintéticos e do fármaco BPQ.

1.c - Seleção, das benzofenonas com os maiores valores de índice de seletividade, sendo esse critério utilizado como indicador do potencial para a futura implementação na terapia de *Leishmania*, para o estudo do metabolismo bioenergético através das variações dos níveis de ATP intracelular.

2.-Estudo da sua ação sobre o metabolismo energético do parasita, através do monitoramento dos níveis de ATP intracelular.

3.- Localização dos danos funcionais na mitocôndria do parasita após a eliminação da permeabilização da membrana plasmática como possível causa da alteração dos níveis de ATP. Definição da disfunção mitocondrial mediante a medida do potencial eletroquímico da mitocôndria ( $\Psi_m$ ), inibição do consumo de oxigênio e alteração estrutural através da microscopia eletrônica de transmissão e confocal.

4 - Determinar o Complexo da cadeia respiratória de atuação das benzofenonas selecionados e fármaco buparvaquona.

5 - Determinar a importância da morte do parasita da via intrínseca mitocondrial nos processos de alteração do ciclo celular.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## 1. Compostos de estudo

### 1.1. Compostos sintéticos

Foi estudada a atividade anti-*Leishmania* de 63 compostos. Esses compostos foram sintetizados pelo Dr. Christophe Dardonville pesquisador do Instituto de Química Médica-CSIC (Consejo Superior de Investigación Científica) em Madri-Espanha.

Desses 63 compostos 39 são sais de bifosfônio, 10 são sais de monofosfônio e 14 são amônio / piridínicos / quinolínicos.

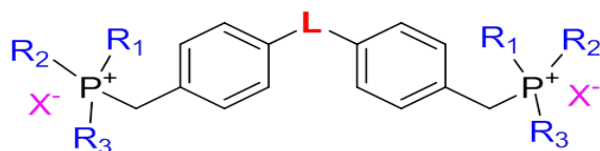
Os compostos sofreram as seguintes variações: (a) tamanho e tipo dos substituintes ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ); (b) carga do sal (mono ou bivalente); (c) tipo de contra íon  $X^-$ , (d) substituinte L. Os compostos amônio /piridínicos/quinolínicos, substituíram o fósforo por N (ver esquema nas **tabelas II a IV**).

O padrão de substituição de compostos bifosfônio é mostrado na **Tabela II**. Sais de monofosfônios (**Tabela III**) e amônios quaternários/ piridínicos/ quinolínicos (**Tabela IV**).

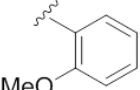
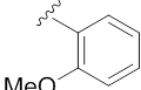
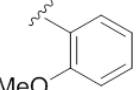
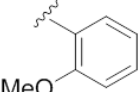
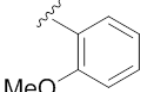
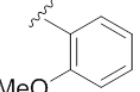
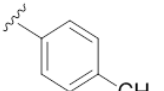
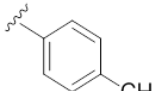
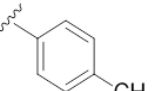
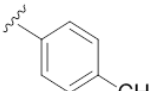
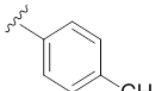
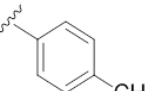
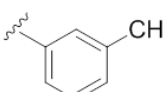
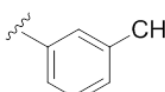
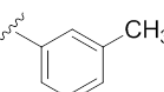
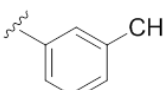
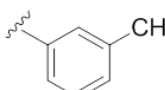
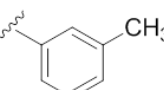
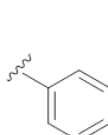
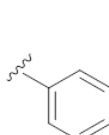
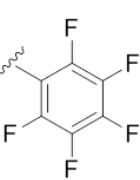
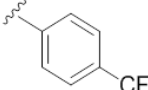
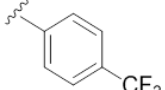
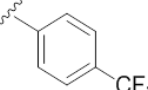
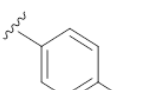
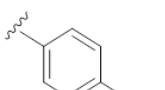
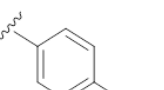
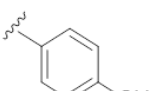
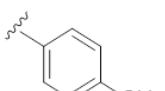
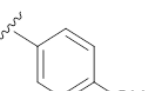
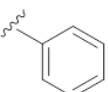
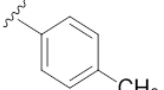
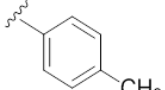
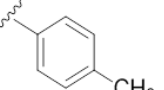
Todos os compostos foram caracterizados por RMN (Ressonância magnética nuclear) e IR (Espectroscopia de infravermelho) e o grau de pureza sempre foi superior a 99,5%.

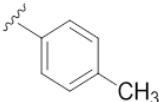
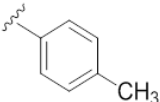
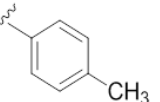
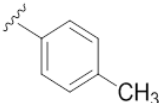
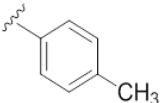
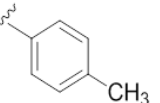
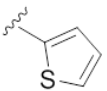
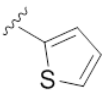
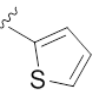
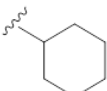
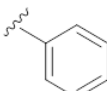
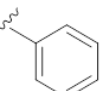
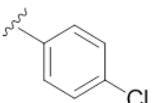
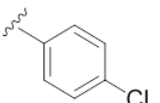
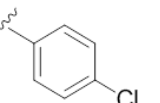
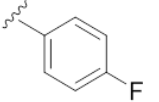
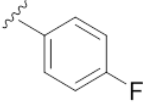
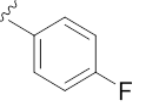
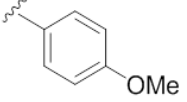
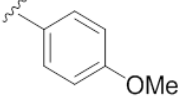
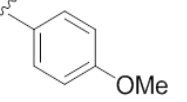
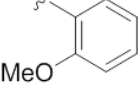
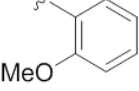
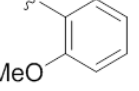
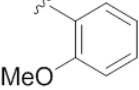
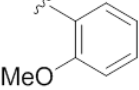
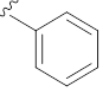
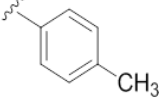
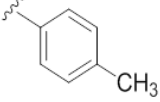
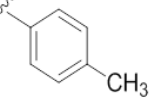
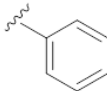
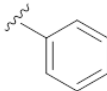
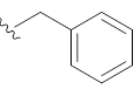
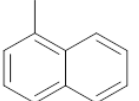
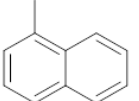
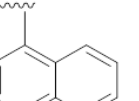
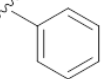


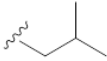
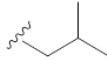
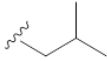
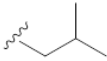
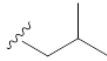
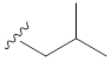
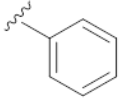
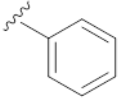
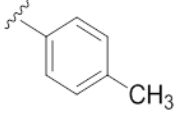
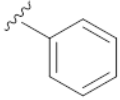
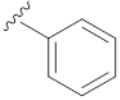
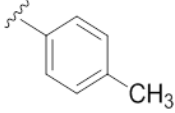
**Tabela II:** Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos de bifosfônio.



Compostos	X	L	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PM
CRMI 46	Br	CO				941.02
AHI 04	Br	O	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		632.35
AHI 9	Br	O				908.68
AHI 10	Br	CH <sub>2</sub>				906.70
AHI 15	Br	O				929.00
AHI 16	Br	CH <sub>2</sub>				927.03
AHI 17	Br	O				964.78
AHI 18	Br	CH <sub>2</sub>				962.81
AHI 19	Br	O				1180.98
AHI 20	Br	CH <sub>2</sub>				1179.00

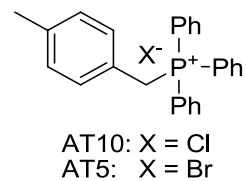
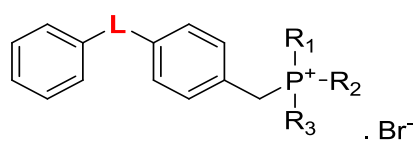
AHI 21	Br	O				1060.78
AHI 22	Br	CH <sub>2</sub>				1058.81
AHI 30	Br	SO <sub>2</sub>				1012.85
AHI 43	Br	NAc				1005.83
AT 8	Br	CH <sub>2</sub>				962.81
AT 17	Br	O				964.78
AT 19	Br	O				1060.52
AT37	Br	CH <sub>2</sub>				1286.64
Efpl 27	Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>				990.86
Efpl 28	Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>				976.84
Efpl 32	Br	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		658.43
VHI 19	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>				901.96

VHI 20	Cl	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>				887.93
VHI 22	Cl	CO				887.89
CDIV57	Br	CO				928.8
Efpl 1	Br	CO				904.7
Efpl 2	Br	CO				1099.3
Efpl 3	Br	CO				1000.6
Efpl 4	Br	CO				1072.8
Efpl 11	Br	CO				1072.8
Efpl 6	Br	CO				1012.7
Efpl 7	Br	CO				976.8
Efpl 8	Br	CO				920.7
Efpl 10	Br	CO				1193
AHI05	Br	CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>		630.37

<b>AHI07</b>	Br	O				760.64
<b>AHI08</b>	Br	CH <sub>2</sub>				758.71
<b>AHI09</b>	Br	O				908.68
<b>AHI10II</b>	Br	CH <sub>2</sub>				906.70

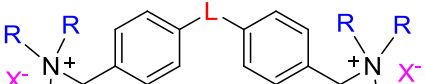

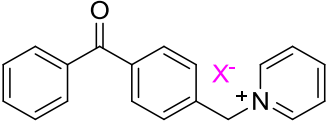
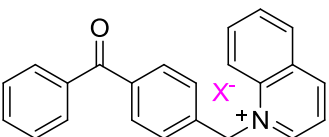
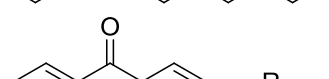
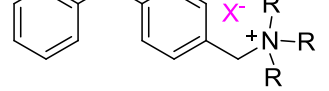
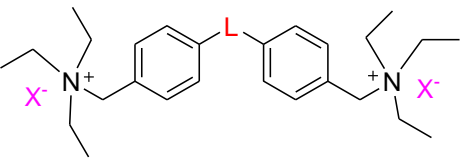
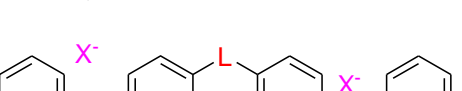
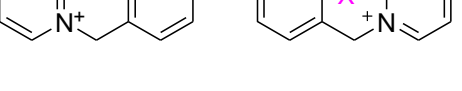
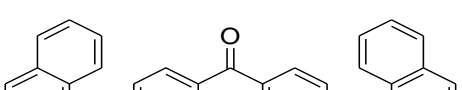
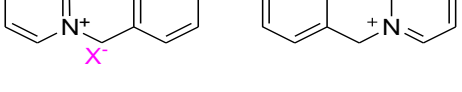
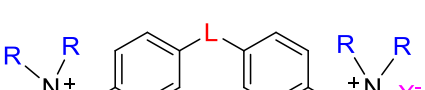
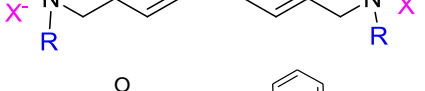
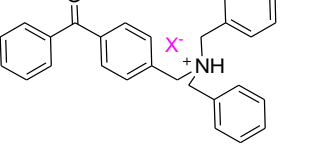
---

**Tabela III:** Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos de sais de monofosfônio.



Compostos	X	L	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	PM
AT 10	Cl	-				402.90
AT 21	Br	CO				579.37
AT 22	Br	CO				579.37
AT 27	Br	CO				477.76
AT 28	Br	CO				551.45
AT 29	Br	CO				393.30
AT 30	Br	CO				627.50
AT 31	Br	CO				561.62
AT 33	Br	O				567.50
AT 34	Br	O				567.50

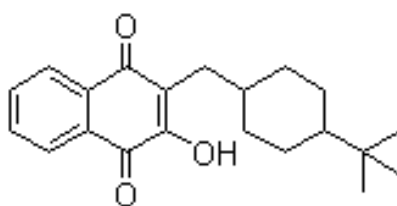
**Tabela IV:** Estrutura e massa molar dos compostos sintéticos amônios quaternários/piridínicos/quinolínicos.

Compostos	Estrutura	X	L	R	PM
CDV28		Br	CO	Et	570.44
CDV31		Br	O	n-Bu	726.75
CDV33		Br	--	--	354.24
CDV34		Br	--	--	404.3
CDV35		Br	--	n-Hex	544.65
CDV36		Br	--	n-Bu	460.49
CDV25		Br	--	--	558,43
CDV26		Br	O	--	514.25
CDV29		Br	O	--	526.26
CDV27		Br	O	--	614.37
CDV30		Br	CO	--	626.38
CDV32		Br	CO	n-Bu	738.76
CDV38		Br	CO	n-Hex	895.07
CDV46		Cl	--	--	427.97

## 1.2. Fármaco

A buparvaquona 2- ( ( 4-tert-butilciclohexil ) metil ) – 3 – hydroxi - 1,4 - naftoquinona (PM = 326,42) (**Figura 17**) é vendida comercialmente como Butalex®, foi doada pela empresa farmacêutica Glaxo Smith Kline ao Dr. André Gustavo Tempone Cardoso.

O fármaco foi dissolvido em DMSO para os experimentos de eletrodo de oxigênio e em etanol para os demais experimentos.



**Figura 17:** Estrutura da buparvaquona

## 2. Cultura celular

### 2.1. Cepas utilizadas e meio de cultivo

Os promastigotas utilizados foram: *L. donovani* cepa MHOM/SD/00/1S-2D, fornecida por S. Turco, Kentucky University; a cepa *L. infantum* cepa M/CAN/ES/96/BCN150, *L. major* cepa MHOM/JL/80/Friedlin, foram cultivadas em RPMI 1640 (Gibco, Paisley, Reino Unido), suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (HIFCS), 5 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 50 U de unilina/mL, e 24 µg de gentamicina/mL a pH 7,2 a 25 °C. A cepa 3-Luc *L. donovani* foi obtida por transfecção com o vetor de expressão pX63NEO-3Luc, que codifica para uma forma de *Photinus pyralis* luciferase mutante na seu tripéptido C-terminal (Luque-Ortega et al. 2001), que determina que a enzima permaneça no citoplasma e que no seja reconhecida pela maquinaria de importância glicosomal. Os parasitas foram cultivados sob condições idênticas no meio

descrito acima, mas foram suplementados com 30 µg de geneticina/mL (G418; Gibco). Os amastigotas axénico *L. pifanoi* (MHOM/VE/60/Ltrod) foram fornecidos por AA Pan e foram mantidos a 32 °C em meio 199 (Gibco-BRL), suplementado com 20% de HIFCS, 50 mg de hemina por L e 5% de tripticasa.

Para o experimento de toxicidade foram utilizadas as células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais de BALB/c. As células RAW 264.7, são macrófagos da linha monocítica murina e foram cultivadas em RPMI 1640 nas mesmas condições do promastigota. A manutenção da cultura era realizada entre 3 a 5 dias, utilizando tripsina para desprender as células da garrafa de cultura. Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidos após uma injeção intraperitoneal de 1 mL de tioglicolato de sódio a 3%, 4 dias anteriores ao experimento, para retirada dos macrófagos por lavagem peritoneal.

## **2.2. Viabilidade e proliferação celular (CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>)**

Para determinar a concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) os promastigotas e amastigotas na fase exponencial tardia (~ 10<sup>7</sup> parasitas/mL) foram concentrados por centrifugação (centrífuga refrigerada Beckman GPR, rotor GH-H7, 1000 x g, 10 min, 4 °C). Foram lavados em tampão de solução salina de Hank's (137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 4.2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4.1 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH = 7.2), suplementado com 10 mM de D-glicose (HBSS-Glc) a 4°C, e ressuspensos no mesmo tampão a uma densidade 2x10<sup>7</sup> células/mL. Alíquotas (120 µL) da suspensão celular foram incubadas com os compostos durante 4 h, a 25 °C ou 32 °C (promastigotas e amastigotas respectivamente). No final de 4 h, 20 µL da alíquota do experimento anterior foi transferida para uma microplaca de 96 poços com 120 µL de meio RPMI para promastigota e 180 µL de meio M199 para a forma amastigota, incubando agora por 72 h a 25 °C para promastigotas; 96 h a 32 °C para amastigota. Esse experimento permitiu determinar o valor da



concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>), ou seja, a capacidade de recuperação do parasita sem a concentração inicial dos compostos e do fármaco.

Outro experimento de proliferação dos parasitas também foi realizado com os compostos selecionados e com o fármaco, foi o CE<sub>50b</sub>, que consistiu em ressuspender o parasita a uma densidade  $3,3 \times 10^6$  células/mL em meio de crescimento para o respectivo parasita (72 h a 25 °C para promastigotas; 96 h a 32 °C para amastigotas) a fim de determinar a proliferação do parasita em presença constante dos compostos e do fármaco. Para medir essas atividades foi utilizada a técnica de inibição da redução de MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium bromideo. Uma solução de 50 µL de MTT (0,5 mg/mL) em HBSS-Glc foi adicionado a solução e incubado durante 1 h a 25 e 32 °C para promastigotas e amastigotas respectivamente, após essa incubação foi adicionado 50 µL de solução de 10% (peso/volume) de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) e 24 h depois se procedeu a leitura das placas no Bio-Rad leitor de microplacas ELISA a 590 nm. Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Fernández-Reyes 2010).

### **2.3. Ensaio de citotoxicidade em RAW 264.7 e macrófagos peritoneais**

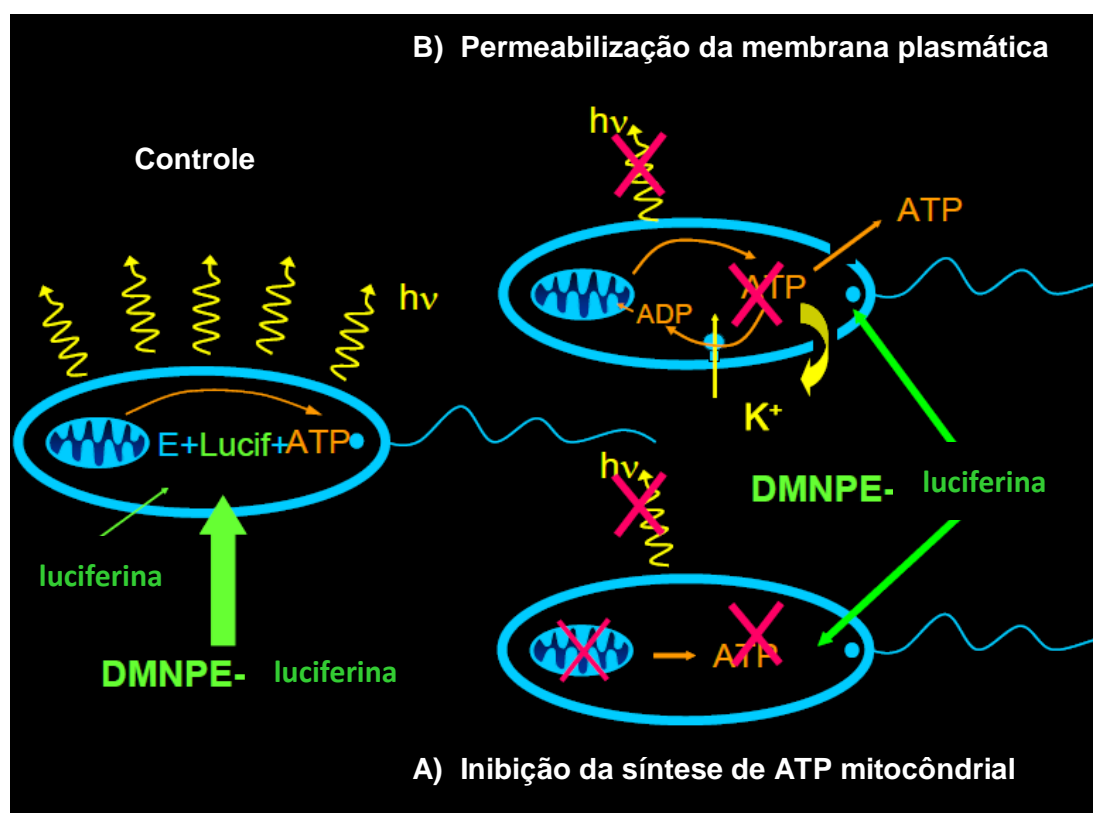
Para a realização do experimento as células foram lavadas duas vezes em Hank's e ressuspensas no mesmo, a uma densidade de  $10^6$  células/mL. As células foram ressuspensas em meio RPMI a uma concentração final de  $10^6$  células/mL, colocadas em uma microplaca de cultura de 96 poços (100 µL/poço).

Ambas as células foram incubadas com os compostos e o fármaco do estudo por 4 h. A citotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio colorimétrico de redução do MTT e foi expressa como a porcentagem do valor obtido em relação às células do controle (Saugar 2004).

### 3. Estudo do mecanismo de ação dos compostos selecionados e do fármaco buparvaquona

#### 3.1. Variação *in vivo* dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de *L. donovani*.

A manutenção de um nível de ATP intracelular adequada é essencial para a homeostase celular. A variação de ATP detectada por esse experimento pode ser ocasionada por uma alteração na membrana plasmática ou por uma alteração da síntese de ATP, que como foi mencionado na introdução, em *Leishmania* é essencial devido a fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria (**Figura 18**).



**Figura 18:** Diagrama do ensaio de luminescência e os processos celulares ocasionados pela ação da droga.

Fonte:(Luque-Ortega et al. 2003)

Esse ensaio tem como base a reação catalisada pela luciferase que permite a conversão de D-luciferina a D-oxoluciferina na presença de O<sub>2</sub>, com consumo de uma molécula de ATP e a emissão de um fóton (Luque-Ortega et al. 2001) **(Figura 18)**.

A variação *in vivo* em níveis intracelulares de ATP foi monitorada em promastigotas da cepa *L. donovani* 3-Luc que expressava luciferase, no citoplasma, a baixa permeabilidade da luciferina através da membrana plasmática, se soluciona utilizando-se o éster de luciferina DMNP-luciferina, que ao esterificar o grupo carboxílico da luciferina, permite o livre acesso através da membrana, uma vez no interior do parasita as esterases citoplasmática geram D-luciferina, devido a essas condições o substrato limitante da reação luminescente é o ATP livre, que em presença dos substratos é capaz de emitir luminescência. O substrato para a luciferase, DMNPE-luciferina, foi preparado a partir da solução-stock de 5 mM em DMSO. Sendo adicionado à suspensão de promastigotas 3-Luc ( $2 \times 10^7$  células/mL) em HBSS-Glc a uma concentração final de 25 µM, e alíquotas desta suspensão foram imediatamente distribuídas em uma microplaca preta de 96 poços (100 µL/poço) (Luque-Ortega et al. 2001). Os compostos testados e o fármaco foram adicionados somente quando a luminescência atingiu a estabilidade. Este ponto foi considerado como tempo zero e a sua luminescência foi tomada como 100%. As concentrações testadas dos compostos foram de 1,5 µM, 3 µM, 5 µM, 10 µM e 15 µM e do fármaco BPQ foram 0,01 µM, 0,02 µM, 0,04 µM, 0,08 µM e 0,1 µM. A leitura ocorreu por 45 minutos. No caso do fármaco BPQ ocorreu também à incubação do parasita com o fármaco por 4 h, após esse período se procedeu a adição do DMNPE-luciferina e a posterior leitura.

As mudanças no sinal de luminescência foram monitoradas em um Leitor Galaxy Polarstar (Labotechnologies BMG, Offenburg, Alemanha).

### 3.2. Permeabilização da membrana plasmática

Para detectar se a alteração de ATP observada no experimento anterior se deve a uma permeabilização da membrana plasmática, foi utilizada a sonda fluorescente vital SYTOX Green (Molecular Probes, Leiden, Holanda) (PM = 600), a membrana plasmática da *Leishmania* é impermeável a essa sonda, porém quando se produz um poro na membrana, suficientemente grande para permitir a entrada dessa sonda no interior das células e esta se uniu aos ácidos nucleicos intracelulares e possível detectar a fluorescência pelo espectrofotômetro, podendo dessa forma avaliar a permeabilização da membrana.

Os compostos foram testados frente ao promastigota de *L. donovani* e o fármaco BPQ frente ao promastigota de *L. infantum* em HBSS-Glc ( $2 \times 10^7$  promastigotas/mL), os parasitas foram pré-incubadas com 1  $\mu$ M SYTOX Green durante 5 minutos em alíquotas de 100  $\mu$ L. Após a estabilização da fluorescência, as drogas foram adicionadas, na concentração máxima 15  $\mu$ M para os compostos sintéticos e as concentrações 0,04  $\mu$ M, 0,2  $\mu$ M, 0,75  $\mu$ M e 3  $\mu$ M para a buparvaquona. O aumento de fluorescência, devido à ligação da sonda com de ácidos nucleicos, foi monitorada utilizando filtros de comprimentos de onda de 504 e de 523 nm de excitação e de emissão, respectivamente, em leitor de microplaca Fluorostat Galaxy. A permeabilização completa (100%) de *Leishmania* foi obtida com 0,1% de Triton X-100 (TX-100). Todos os ensaios se realizaram em triplicata a 26 °C. Realizou-se a leitura assim que adicionado os compostos e se chamou de  $t=0$  e também se realizou a leitura após 12 h de incubação (Diaz-Achirica et al. 1998).

### 3.3. Despolarização da membrana mitocondrial

Outra das possíveis causas da diminuição dos níveis intracelulares de ATP observados no experimento de bioluminescência pode ser também a ação dos compostos ou do fármaco na mitocôndria, como já relatado no item

3.1, pois a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa requer a manutenção do gradiente de potencial eletroquímico através da membrana interna das mitocôndrias, de modo que a sua variação é um parâmetro apropriado para a avaliação de ação de possíveis fármacos.

A variação do potencial de membrana mitocondrial de promastigotas foi medida pela acumulação de Rodamina-123. A sonda Rodamina-123 é um cátion lipofílico que é retido pela seletividade do potencial da membrana mitocondrial, a marcação é dependente do potencial da membrana, produzindo-se uma menor fluorescência em caso de despolarização da membrana mitocondrial (Emaus et al. 1986).

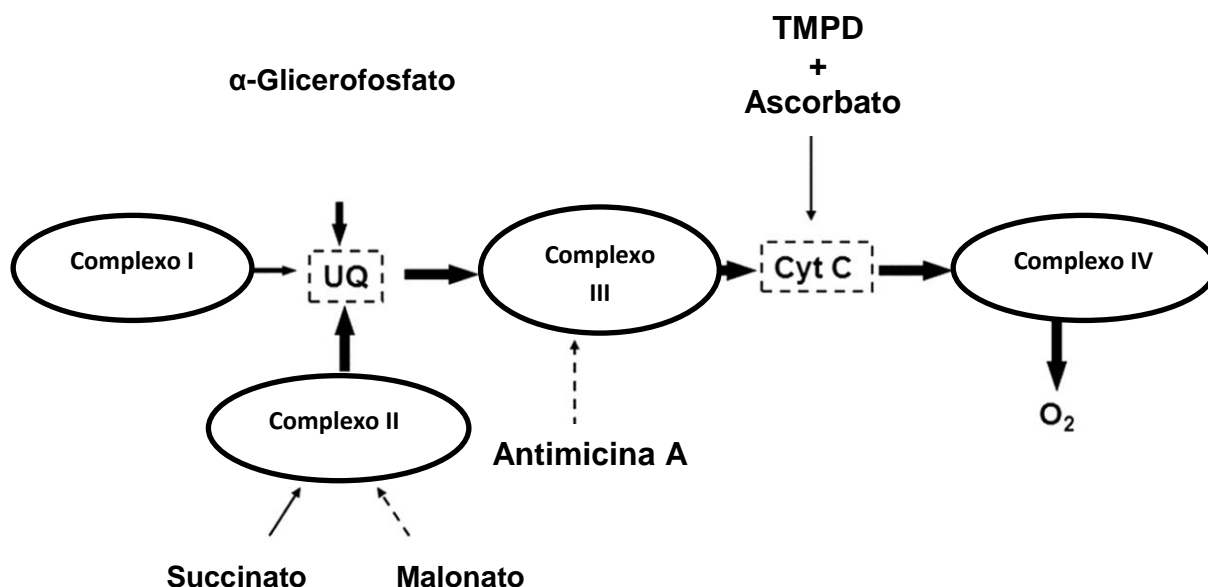
Os parasitas ( $2 \times 10^7$  promastigotas/mL) foram ressuspensos em HBSS + Gluc e incubados (volume final 120  $\mu$ L) com os compostos EFPL6, EFPL8, EFPL 11 a concentração crescente de 3  $\mu$ M, 10  $\mu$ M e 15  $\mu$ M e AHI09 a 1  $\mu$ M, 3  $\mu$ M e 5  $\mu$ M, por 4 h a 25 °C. O fármaco BPQ foi incubado a 4 h como os compostos e também a 12 h nas concentrações crescentes de 0,05; 0,75; 1,5 e 3  $\mu$ M.

Após esse período foi adicionada a Rodamina-123 (0,3  $\mu$ g/mL) e foi incubada por 10 min a 37 °C, posteriormente as amostras foram lavadas e centrifugadas e ressuspensas em HBSS + Gluc, a leitura foi realizada em um citômetro de fluxo Beckman Coulter FC500 MPL (comprimentos de onda de excitação e emissão de 488 e 525 nm, respectivamente). Os parasitas não tratados foram considerados o controle negativo do experimento, para determinar a fluorescência basal das células, sendo que a alteração da membrana mitocondrial foi ocasionada pela incubação do parasita com KCN 1 mM, sendo este, o controle de despolarização total da membrana mitocondrial (Saugar 2004).

#### **3.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelos fármacos.**

Uma vez detectada a alteração do potencial de membrana mitocondrial, é importante posteriormente determinar qual é o complexo de

ação na cadeia respiratória é afetada pelo composto ou pelo fármaco do estudo. As taxas de consumo de oxigênio foram mensuradas com um eletrodo de oxigênio de Clark (Hansatech, KingsLynn, Reino Unido) a 25 °C, utilizando-se 1 mL de suspensão de promastigotas ( $10^8$  células/mL) em tampão de respiração (10 mM Tris-HCl, pH 7,2, 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 2,5 mM  $NaH_2PO_4$ , 0,3 mM EGTA, suplementado com 5 mM succinato (substrato doador de elétrons) e 1 mg/mL de BSA (Albumina, livre de ácidos graxos, que tem a capacidade de sequestrar ácidos graxos que atuam como desacoplante da cadeia respiratória, presente no soro com capacidade de ligar a compostos hidrofóbicos). As células foram permeabilizadas com digitonina a 6 mM, o que permitiu a permeabilização seletiva da membrana plasmática mas não da membrana mitocondrial interna. Subsequentemente, 10 mM de ADP (Adenosina difosfato) foi adicionada para restaurar a respiração ao estado 3, uma vez que a taxa de equilíbrio foi novamente alcançado, os compostos foram adicionados a concentração máxima 25  $\mu$ M para os composto sintéticos e 3  $\mu$ M para o fármaco buparvaquona. Após a adição da droga e uma vez que a taxa de equilíbrio foi alcançado, um conjunto seletivo de substratos e inibidores da cadeia respiratória foram ensaiados em concentrações finais de 6,7 mM  $\alpha$ -glicerofosfato (doador de elétrons ao complexo I em mamíferos, em *Leishmania* é alfa-glicerofosfato desidrogenase mitocondrial), 0,1 mM de tetrametil-*p*-fenilenodiamina, mais 1,7 mM, ascorbato (TMPD-ascorbato) (doador de elétrons ao citocromo *c*), malonato 2 mM (inibidor do complexo II), 1,9 mM antimicina A (inibidor do complexo III), KCN 10 mM (inibidor do complexo IV) (Carvalho et al. 2010, Luque-Ortega et al. 2010). De acordo com o complexo da cadeia respiratória em estudo (**Figura 19**).



**Figura 19:** Esquema dos inibidores e substratos específicos da cadeia respiratória de *Leishmania* usados nesse estudo. Legenda: UQ, Ubiquinona; Cyt C, citocromo c. Linhas solidas fluxo de eletrons, linhas tracejadas inibidores.

Fonte: Carvalho (2010)

### 3.4.1. Atividade succinato deshidrogenase (SDH)

Para corroborar com o resultado apresentado pelo experimento de detecção da taxa de consumo de oxigênio, foi realizado o experimento para medir a atividade da enzima SDH, que avalia a ação diretamente no complexo II.

Foi obtida uma fração enriquecida de mitocôndria. Os promastigotas de *Leishmania* foram lavadas duas vezes em PBS, ressuspensos em tampão hipo-osmótico (5 mM Tris - HCl, pH 7,4), 10 min a 26°C, depois as células foram mantidas em gelo e trituradas em Potter-Elvehjem. Os detritos celulares foram removidos por centrifugação (1000 xg, 10 min, 4 °C). O sobrenadante foi então centrifugado a 13.000 xg (20 min, 4 °C). O sedimento resultante, contendo a fração mitocondrial, foi ressuspendido em tampão salino de fosfato isotônico (50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 90 mM NaCl, e 5 mM KCl, pH

7,2). A concentração de proteína foi medida utilizando o reagente de Bradford (Bio-Rad) e ajustada a densidade para 0,2 mg/mL de alíquotas (100 µL/poço) da fração mitocondrial, sendo posteriormente adicionados a uma microplaca de 96 poços, deixando se incubar por 1 h a 25° C com os quatro compostos em concentrações diferentes, EFPL6 e AHI09 (8, 16, 32 e 64 µM); EFPL8 e EFPL11 (10, 40 e 80 µM) na presença de 10 mM de succinato substrato da reação e 10 mM de malonato como controle (inibidor do complexo II). A atividade SDH foi medida espectrofotometricamente a 415 nm, utilizando-se um modelo 680 de Bio-Rad (ELISA), e 1 mM de ferricianeto de potássio foi usado como reagente colorimétrico. O sal ferricianeto de potássio  $K_4(Fe(CN)_6)$  quando sofre redução diminui o sinal de absorbância, o ferricianeto recebe elétrons do citocromo c (Carvalho et al. 2011).

### **3.5. Ciclo celular**

A detecção da ação dos compostos e do fármaco na atividade mitocondrial poderia indicar um aumento na população sub-G1, caracterizada pela presença de fragmentos de DNA, podendo indicar uma indução de apoptose, ocasionado pelos compostos e pelo fármaco BPQ, essa ação foi monitorada pela análise do ciclo celular, especificamente pelo aumento da fase sub-G1. Os parasitas ( $2 \times 10^7$  promastigotas/mL) foram incubados por 4h com diferentes concentrações dos compostos EFPL6 (8 µM e 16 µM); EFPL8 (9 µM e 18 µM); EFPL 11 (3 µM e 6 µM) e AHI09 (5 µM e 10 µM), e BPQ (0,5 µM, 1 µM e 3 µM) e 12 h para o fármaco BPQ com as mesmas concentrações do experimento a 4 h. Após esse período de incubação, foi adicionado 1 mL RPMI a essa incubação, e novamente foram incubados, agora por 12 h a 26 °C, depois procedeu-se a lavagem com PBS, e foi fixado com etanol frio a 70% e novamente incubado por 12 h. Depois foi novamente lavado com PBS e ressuspendido em 500 µL de 25 mg/mL de iodeto de propídio (IP) e RNase A 1 mg/mL, e incubado por 30 min no escuro à temperatura ambiente. O experimento foi medido em 488 e 520 nm



por citometria de fluxo Beckman Coulter FC500 MPL cytofluorometer. Como controle positivo para a indução de populações sub-G1, os parasitas foram tratados em condições idênticas, porém foram incubados com 10 µM miltefosina, relatada por ocasionar o aumento a população de sub-G1 (Luque-Ortega & Rivas 2007, Luque-Ortega et al. 2010).

### **3.6. Microscopia**

#### **3.6.1. Microscopia confocal**

Detectando a ação dos compostos na mitocôndria, propôs se verificar visualmente essa ação dos compostos e do fármaco na mitocôndria através da visualização pela marcação dupla, utilizando a sonda fluorescente MitoTracker Red, sonda específica para a mitocôndria e DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole), sonda específica para o DNA, utilizada para definir a região do núcleo e do cinetoplasto. Os promastigotas de *L. donovani* e *L. infantum* ( $2 \times 10^6$  promastigotas/mL) foram marcados com 0,1 µM Mitotracker Red (Molecular Probes), durante 10 min a 26 °C, respectivamente foram lavados, e incubados no escuro, com os compostos durante 4 h na concentração de 15 µM para os compostos EFPL6, EFPL8, EFPL11 e 5 µM para o AHI09. Na incubação por 12 h, na concentração foi de 3 µM para todos os compostos. O fármaco BPQ foi incubado por 12 h, na concentração de 1,5 µM. Aos 30 minutos finais do experimento foi acrescentado o DAPI 1µg/mL. As imagens de confocais de foram obtidos em um TCS-SP2-AOBS-UV microscópio Leica ultraspectral confocal (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) em comprimento de excitação e de emissão de onda para MitoTracker Red foram 543 e 599 nm e DAPI 358 e 461 nm respectivamente (Luque-Ortega et al. 2008).

### 3.6.2. Microscopia eletrônica

Para o estudo das alterações ultraestruturais o parasita *L. donovani* a densidade de  $2 \times 10^7$  foi incubado em Hanks+ Glc por 4 h como os compostos sintéticos a concentração que causa ~50% de inibição da viabilidade celular. O parasita *L. infantum* a densidade de  $2 \times 10^7$  células/mL foi incubado em Hanks+ Glc por 12 h como o fármaco BPQ a concentração de 0,5  $\mu$ M

Após esse período de incubação os promastigotas foram lavadas em PBS, fixados em 5% (peso/volume) de glutaraldeído/PBS (90 min), incluído com 2,5% (peso/volume) de  $\text{OsO}_4$  durante 1 h, e, gradualmente desidratados em etanol (30, 50, 70, 90 e 100% (v/v), 30 min cada exceto 70% que a desidratação foi por 12h). Depois ressuspensos em óxido de propileno (Oxp) por 1 h e depois ocorreu a substituição do oxido propileno por uma mescla de resina de A/B [Resina A: 38% Epon 812 + 62 % DDSA (dodecenilo anidrido succínico ), Resina B: 52,6% + 47,4% Epon 812 MNA (metil anidrido ná dico )], por isso fez se incubações sucessivas de uma mistura de Oxp/resinas em diferentes proporções volumétrico, 3:1 (30 min), 1:1 (30 min), 1:3 (12h) e, finalmente, com incubação a mistura de resina na ausência de Oxp (3 min). A inclusão das células na resina foi completada com polimerização por adição do catalisador de 1,8% de DMP 30 (2,4,6 - tri (dimetilamino -metil) fenol) como o acelerador. As amostras foram distribuídas em cápsulas de gelatina 5,5 milímetros de diâmetro polimerizada (70 °C, 48 h) e depois foram cortadas com um ultramicrotomo LKB. Os cortes foram montadas em grades de trama G-200 coradas com citrato de chumbo (25 mM) para *Leishmania*. As amostras foram observadas e fotografadas em microscópio transmissão e-JEOL 1230 (Jeol Ltd. Akishima, Japão) (Fernández-Reyes 2010).

### 3.7. Infecção *in vitro*

Para observar a ação desses compostos sobre a *Leishmania* quando o parasita está infectando os macrófagos, se realizou o experimento que consistiu em plaquear os macrófagos em uma placa de 24 poços a uma densidade de  $2 \times 10^5$  células/poço em meio RPMI 1640 mais 10% de SFB. As células foram incubadas durante 1 h a 37 °C para permitir a adesão.

#### 3.7.1. Bezofenonas

Após esse período de incubação, os amastigotas de *L. pifanoi* axênico foram marcados com a sonda fluorescente CFSE (carboxifluoresceína-succinimidil-éster) a concentração de 0,4 µg/mL por 30 min e depois foram incubados durante 4 h com os macrófagos. A taxa de infecção foi de 1:4. Os amastigotas que não infectaram os macrófagos foram removidos por lavagens. Deixou-se progredir a incubação por 96 h a 32 °C, seguido do tratamento com os compostos EFPL6, EFPL8, EFPL11 15 µM e AHI09 5 µM, por 12 h de incubação. O experimento foi repetido às mesmas condições, porém a concentração de 25 µM para todos os compostos. Após a incubação em meio RPMI 1640, foi adicionado a sonda fluorescente DAPI a concentração 1µg/mL por 30 min, depois foi lavado com PBS e fixados em 4% formaldeído e foram preparadas as lâminas com meio de montagem de fluorescência Dako (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, EUA). A carga parasitária considerada foi o número médio de amastigotas em 100 macrófagos medidos em duplicata em relação à porcentagem de macrófagos não tratados. As lâminas foram lidas em um microscópio confocal TCS-SP2-AOBS-UV Leica ultraspectral confocal (Leica Microsystems, Heidelberg, Alemanha) no comprimento de excitação e de emissão de onda de 492 e 517 nm para o CFSE e DAPI 358 e 461 nm (Luque-Ortega et al. 2008, Luque-Ortega et al. 2012).

### **3.7.2. Fármaco buparvaquona**

A infecção com amastigotas intracelulares de *L. pifanoi* se realizou como descrito anteriormente no item 3.7.1, seguido do tratamento com o fármaco à 12 h a concentração de 20  $\mu\text{M}$ , depois foram lavados com PBS, fixados em metanol e corados com May-Grünwald-Giemsa. As lâminas foram preparadas com meio de montagem Eukitt quick-hardening (Fluka, BioChemika). A carga parasitária considerada foi o número médio de amastigotas em 100 macrófagos medidos por duplicata em relação à porcentagem de macrófagos não tratados. As lâminas foram lidas em um microscópio óptico.

### **3.8. Análise estatística**

Os dados apresentados foram medidos pela média das amostras em triplicata com o desvio standard correspondente. O  $\text{CE}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  foram valores calculados a partir das curvas de inibição sigmóides utilizando o pacote estatístico do Sigma Plot 8 e 9. As comparações entre os grupos foram realizadas pelos valores significância de  $P < 0,05$ , calculados por Test t Student.

## **RESULTADOS**

## 1. Compostos sintéticos

### 1.1. Triagem dos compostos

#### 1.1.1. Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade

O efeito leishmanicida dos compostos foi avaliado mediante a inibição da capacidade de redução do MTT pelo parasita. A **tabela V** mostra os valores da concentração efetiva 50% (CE<sub>50</sub>) em ensaio realizado a curto prazo (4 h), os valores da concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) (72 h) na forma promastigota de *L. donovani*. e na formas amastigotas de *L. pifanoi*, sob as mesmas condições descritas para o ensaio de CE<sub>50</sub>, porém o ensaio de CI<sub>50</sub> foi realizado à 96 h.

Dentre os 63 compostos testados, 41 apresentaram atividade anti-*Leishmania*, com CE<sub>50</sub> em promastigotas variando entre 0,9 a 16 µM e CI<sub>50</sub> entre 1,3 a 21 µM. Nos amastigotas, os valores de CE<sub>50</sub> variaram entre 0,2 a 12,4 µM, e os valores de CI<sub>50</sub> entre 0.02 a 2,3 µM. O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão e apresentou um CE<sub>50</sub>b de 12,5 µM contra as formas promastigotas e CE<sub>50</sub>b de 26,3 µM contra os amastigotas.

Para os ensaios de citotoxicidade em células RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, foram selecionados 41 compostos com valor de CE<sub>50</sub> < 50 µM nos parasitas.

Esses compostos foram incubados a 25 e 50 µM por 4 h e a atividade foi avaliada pelo método do MTT (**Tabela V**).

Os compostos de estudo foram escolhidos de acordo com o índice seletivo, esse valor foi determinado, através da seguinte expressão:

**I.S.=**Toxicidade (CC<sub>50</sub> em células de mamíferos)

CE<sub>50</sub> contra os parasitas (Forma amastigota)

Os quatro compostos com os índices seletivos mais altos foram selecionados para o estudo de mecanismo de ação junto com o fármaco buparvaquona.

**Tabela V:** Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade em células RAW 264.7 e macrófagos peritoneais.

Compostos	Promastigota <i>L.donovani</i>		Amastigota <i>L.pifanoi</i> (axênica)		RAW 264.7	Macrófago Peritoneal
	CE <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CE <sub>50</sub> (μM)	CI <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)	CC <sub>50</sub> (μM)
Efpl2	6,1 ± 0,4	5,4 ± 0,6	3,3 ± 0,5	1,5 ± 0,1	<25	<50
Efpl4	5,6 ± 0,1	5,3 ± 0,3	3,9 ± 0,4	1,5 ± 0,1	<25>50	>50
Efpl6	1,7 ± 0,2	7,9 ± 0,9	1,7 ± 0,0	0,7 ± 0,0	<25	>50
Efpl7	3,4 ± 0,4	5,5 ± 0,7	2,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0	<25	<50
Efpl8	2,5 ± 0,1	6,2 ± 1,2	5,0 ± 0,8	1,1 ± 0,2	<25>50	>50
Efpl10	2,4 ± 0,8	3,5 ± 0,6	2,6 ± 0,5	1,5 ± 0,0	<25	<50
Efpl11	2,3 ± 0,2	1,7 ± 0,1	1,2 ± 0,2	0,6 ± 0,0	<25>50	>50
Efpl27	2,6 ± 0,8	4,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	1,1 ± 0,4	<25	<50
Efpl28	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,0	1,0 ± 0,1	<25	<50
AHI09	1,9 ± 0,2	4,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2	2,3 ± 2,1	<25>50	>50
AHI10	2,2 ± 0,0	3,3 ± 2,4	4,8 ± 0,6	0,5 ± 0,3	<25>50	>50
AHI9	3,0 ± 0,5	4,1 ± 0,5	5,7 ± 1,4	0,7 ± 0,0	<25>50	>50
AHI10II	6,5 ± 4,3	7,2 ± 2,0	2,7 ± 0,3	0,6 ± 0,0	<25	<50
AHI15	5,4 ± 2,0	4,6 ± 0,8	1,0 ± 0,1	0,3 ± 0,2	<25	<50
AHI16	1,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,3 ± 0,1	<25	<50
AHI17	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<25	<50
AHI18	2,2 ± 0,3	1,4 ± 0,0	0,6 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<25	<50
AHI19	1,4 ± 0,1	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<25	<50

AHI20	1,0 ± 0,0	2,0 ± 0,1	0,7 ± 0,0	0,2 ± 0,0	<25	<50
AHI21	2,0 ± 0,1	4,7 ± 1,4	0,6 ± 0,0	0,02 ± 0,00	<25	<50
AHI22	1,1 ± 0,0	1,5 ± 0,8	0,5 ± 0,0	0,03 ± 0,00	<25	<50
AHI30	5,0 ± 2,4	5,8 ± 3,2	9,1 ± 2,4	0,04 ± 0,00	<25	>50
AHI43	6,3 ± 3,3	3,6 ± 1,4	12,4 ± 3,3	0,2 ± 0,0	<25>50	>50
AT 8	4,2 ± 0,3	4,4 ± 1,1	1,3 ± 0,6	0,3 ± 0,0	<25	<50
AT10	12,1 ± 0,0	21,0 ± 1,8	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,0	<25>50	<50
AT17	1,2 ± 0,2	6,4 ± 0,6	2,2 ± 0,4	0,3 ± 0,0	<25	<50
AT21	5,0 ± 0,3	14,6 ± 0,0	1,4 ± 0,5	0,5 ± 0,0	<25	<50
AT22	3,6 ± 0,2	7,7 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,7 ± 0,4	<25	<50
AT28	4,4 ± 0,4	4,3 ± 0,5	1,2 ± 0,3	0,7 ± 0,0	<25	<50
AT30	1,3 ± 0,8	3,4 ± 0,4	0,6 ± 0,1	0,2 ± 0,0	<25	<50
AT31	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,2	1,2 ± 0,0	0,08 ± 0,00	<25	<50
AT33	1,6 ± 0,0	1,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,3 ± 0,0	<25	<50
AT34	3,4 ± 0,0	2,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,0	<25	<50
AT37	2,1 ± 0,0	1,9 ± 0,6	2,2 ± 0,0	1,9 ± 0,0	<25	<50
VHI19	0,9 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,7 ± 1,7	0,7 ± 0,3	<25	<50
VHI20	1,1 ± 0,4	5,0 ± 0,3	1,1 ± 0,1	0,4 ± 0,1	<25	<50
VHI22	5,6 ± 1,1	5,6 ± 1,8	1,8 ± 0,4	0,6 ± 0,1	<25	<50
CDV35	1,6 ± 0,0	3,5 ± 0,9	0,8 ± 0,1	1,2 ± 0,0	<25	<25
CDV38	2,3 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,8 ± 0,1	1,2 ± 0,0	<25	<25

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva 50% determinado após 4 h de incubação; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória 50% sobre o crescimento parasitário.

Dos 41 compostos avaliados, 9 demonstraram valores de CC<sub>50</sub> >25 µM, sendo que 2 compostos apresentaram valores >50 µM em células RAW 264.7. Em macrófagos peritoneais 9 compostos apresentaram valores >50 µM. Os macrófagos peritoneais demonstraram maior resistência, uma vez



que 9 compostos não apresentaram toxicidade na maior concentração testada (50  $\mu\text{M}$ ).

O índice de seletividade (IS) foi calculado para os compostos que não apresentaram toxicidade a 50  $\mu\text{M}$  em macrófagos peritoneais e foi definido pela razão entre o  $\text{CC}_{50}$  em macrófagos /  $\text{CE}_{50}$  em amastigotas *L. pifanoi*. Dentre os 63 compostos foram selecionados os 4 com os maiores valores de índice de seletividade (EFPL6, EFPL8, EFPL11 e AHI09), o composto EFPL11 apresentou-se com o maior valor ( $> 41 \mu\text{M}$ ), enquanto o composto EFPL8, apresentou o menor valor  $> 20 \mu\text{M}$  (**Tabela VI**).

Dentre os 4 compostos mais seletivos, o EFPL11 apresentou o menor valor de  $\text{CE}_{50}$  em amastigotas (1,2  $\mu\text{M}$ ), sendo que o composto EFPL8, apresentou o maior valor (5  $\mu\text{M}$ ).

A irreversibilidade do dano sobre a *Leishmania* pode ser deduzida pela similaridade entre os valores de os valores de  $\text{CE}_{50}$  e  $\text{CI}_{50}$  apresentados na **tabela VI**. Para a forma amastigota esse padrão ocorre com os compostos EFPL6, EFPL11, EFPL8 e AHI09 resultaram em um dano irreversível para a forma amastigota, porém, o composto EFPL11 também apresentou este comportamento para as formas promastigotas (**Tabela VI**).

Os dados de  $\text{CE}_{50b}$  obtidos na presença do composto por 72 h de incubação (promastigota) e 96 h (amastigota), demonstraram valores similares ou menores em relação aos obtidos a 4 h de incubação ( $\text{CE}_{50}$ ), para os compostos EFPL6, EFPL8 e AHI09 na forma promastigota, demonstrando que a presença dos compostos aumentam a efetividade, portanto, para que sejam mais efetivos necessitam dessa pressão constante dos compostos (**Tabela VI**).

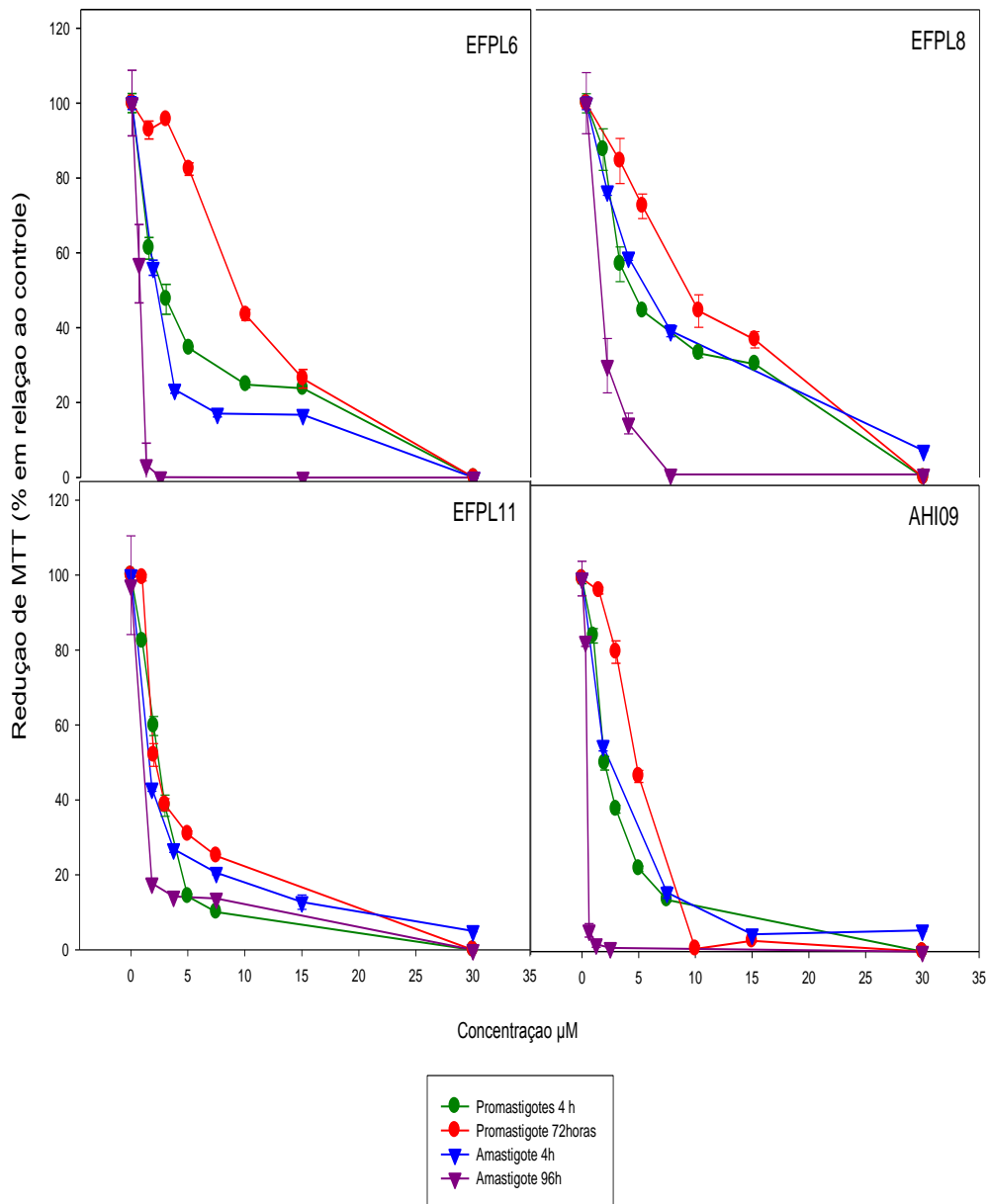
**Tabela VI:** Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade dos compostos selecionados.

Compostos	Promastigota <i>L. donovani</i>			Amastigota <i>L. pifanoi</i>			RAW 264.7	Macrófago peritoneal	IS
	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> b ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> b ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
Efpl6	1,7 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,0	1,7 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	<25	>50	>29
Efpl8	2,5 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 1,2	1,4 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,5	>50	>100	>20
Efpl11	2,3 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 0,2	0,6 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	>25	>50	>41
AHI09	1,9 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,3	0,1 $\pm$ 0,0	2,0 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	>25	>50	>25

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva 50% determinado após 4 h de incubação; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória 50% sobre o crescimento parasitário; CE<sub>50</sub>b: concentração efetiva 50% determinado após 72 horas de incubação. IS: Índice de Seletividade, dados pela razão entre CC<sub>50</sub> em células de mamíferos e CE<sub>50</sub> em amastigotas *L. pifanoi*.

A **figura 20** mostra-se a inibição dependente da redução do MTT, em relação à concentração, dos 4 compostos mais seletivos. Observou-se claramente que existe uma similaridade entre as curvas de CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub> do composto EFPL11 tanto em promastigota como amastigota, mostrando que o dano produzido após 4 h é irreversível para esse composto.

Com o fim de estudar a variabilidade da atividade desses compostos, também se realizou o ensaio frente à espécie de *L. infantum* e *L. major* (responsável conjuntamente com *L. tropica* pela Leishmaniose cutânea no velho mundo) na forma promastigota (**Tabela VII**). O composto AHI09 apresentou o menor valor de CE<sub>50</sub> na *L. donovani*, enquanto o composto EFPL11 apresentou o menor valor na *L. infantum* e na *L. major*, no ensaio de viabilidade a 4 horas (CE<sub>50</sub>).



**Figura 20:** Curva da % de redução de MTT de promastigota de *L. donovani* às 4h e 72h, e amastigota de *L. pifanoi* às 4h e 96h em presença dos 4 compostos selecionados.

**Tabela VII:** Atividade *in vitro* em *Leishmania* spp.

Compostos	Promastigota <i>L.donovani</i>		Promastigota <i>L.infantum</i>		Promastigota <i>L.major</i>	
	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CE <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	CI <sub>50</sub> ( $\mu$ M)
Efpl6	1,7 $\pm$ 0,2	7,9 $\pm$ 0,9	6,4 $\pm$ 1,2	7,6 $\pm$ 1,6	2,9 $\pm$ 0,0	3,1 $\pm$ 0,1
Efpl8	2,5 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 1,2	4,6 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 0,0	4,1 $\pm$ 0,2
Efpl11	2,5 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,2	3,0 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,0	5,0 $\pm$ 0,0
AHI09	1,4 $\pm$ 0,0	4,8 $\pm$ 0,2	4,0 $\pm$ 0,2	5,4 $\pm$ 0,7	3,0 $\pm$ 1,0	3,5 $\pm$ 0,5

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva 50% determinado após 4 h de incubação; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória 50% sobre o crescimento parasitário.

A irreversibilidade observada pela similaridade de valores entre CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>, os compostos EFPL6, EFPL8, AHI09 apresentaram atividade reversível na espécie *L. donovani*, porém nas espécies *L. infantum* e *L. major* apresentaram atividade irreversível, conforme observado pela similaridade de valores entre CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>. O composto EFPL 11 apresentou um comportamento irreversível nas espécies *L. donovani* e *L. infatum*, porém na *L. major* o dano foi reversível.

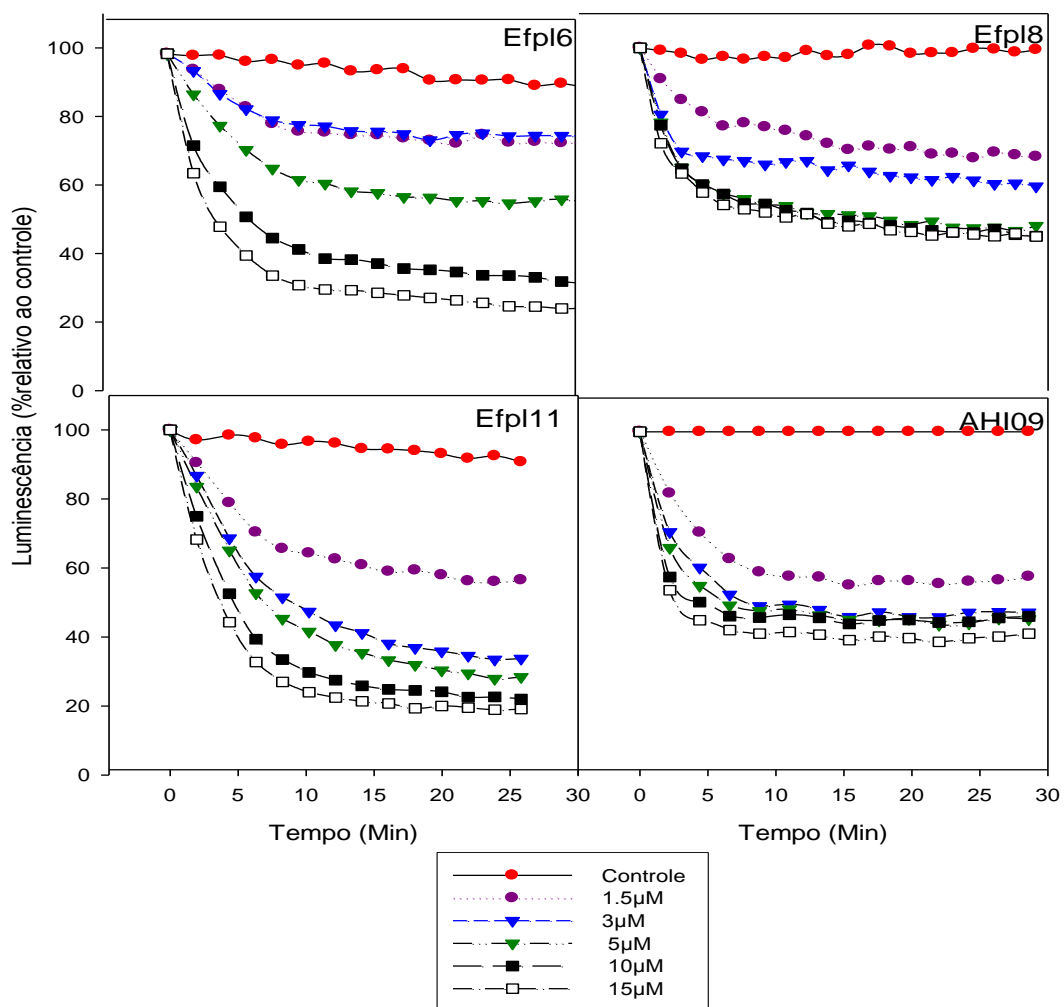
## 1.2. Mecanismo de ação

### 1.2.1. Variação *in vivo* dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de *L. donovani*.

A homeostase celular é essencial para manter a integridade do parasita, variações do nível de ATP estão intimamente associadas à homeostase. Essa variação dos níveis de ATP pode estar associada a uma alteração significativa na membrana plasmática ou por alterações no potencial da membrana mitocondrial.

A **figura 21** mostra a cinética da diminuição da luminescência associada à concentração de ATP intracelular em promastigotas de *L. donovani* 3-Luc na presença diferentes concentrações dos compostos em relação ao controle.

Esse experimento demonstrou a ação dos compostos alterando os níveis de ATP essenciais para a homeostase celular, nos primeiros minutos de incubação do parasita com o composto. Esta diminuição foi dependente da concentração dos compostos, porém, nenhum dos compostos ocasionou uma inibição completa da luminescência nesse tempo de incubação. Os compostos EFPL6 e EFPL11, quando incubados na concentração de 15  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 6x o valor de  $\text{CE}_{50}$ ), reduziram o sinal de luminescência em aproximadamente 80% em relação ao controle não tratado; já os compostos EFPL8 e AHI09 reduziram o sinal de luminescência em 60% na mesma concentração. Observou-se ainda que a redução da luminescência ocorreu em cerca de 10 min do início da incubação com os compostos, indicando uma interferência na homeostase celular do parasita.

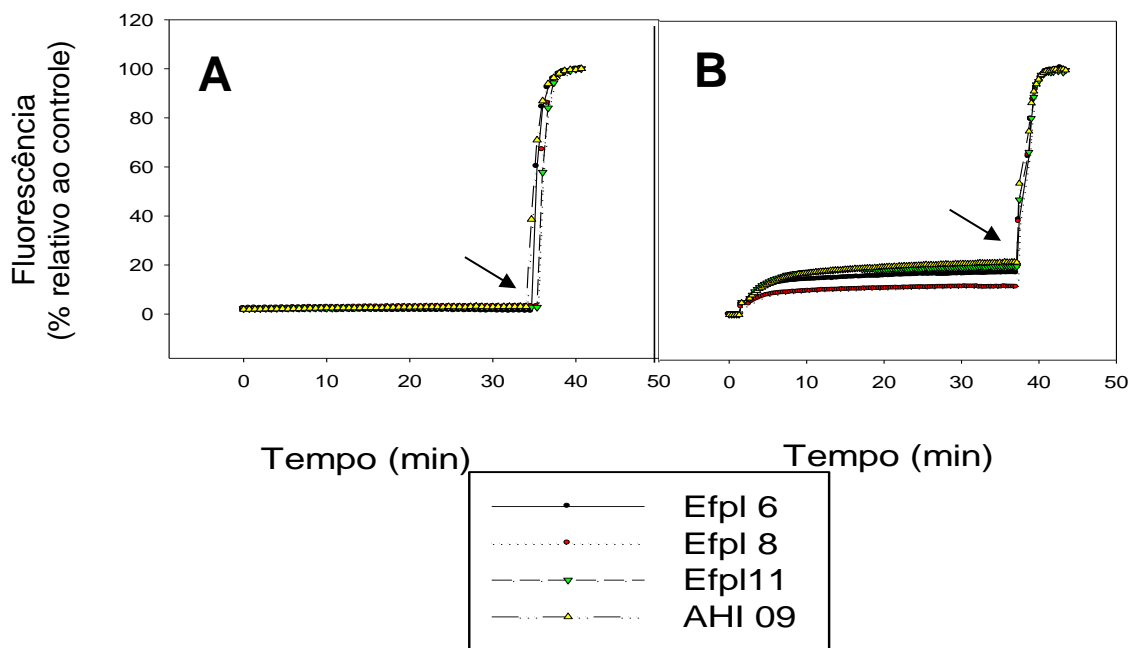


**Figura 21:** Cinética de luminescência associada aos níveis de ATP *in vivo*.

A redução dos níveis de ATP pode ser associada com a perda de ATP para o exterior, a um gasto excessivo do mesmo, ou a inibição da sua síntese. As duas primeiras afirmações estão associadas a uma inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial. Ambas alternativas foram avaliadas nos seguintes ensaios.

### **1.2.2. Permeabilização da membrana plasmática**

Uma vez observado o decréscimo nos níveis de ATP, procedeu-se o estudo da alteração da membrana plasmática através da sonda fluorescente vital SYTOX Green®, sonda esta que é incapaz de passar através da membrana plasmática do parasita quando esta se encontra intacta, porém quando está apresenta alterações suficientemente grandes para permitir a passagem dessa molécula, como a presença de poros na membrana, essa sonda entra no interior da célula e se liga ao DNA de forma irreversível, emitindo fluorescência. Com o objetivo de verificar se os níveis de ATP decaem devido às alterações estruturais na membrana plasmática, procedeu-se este estudo. Na **figura 22** se observa que todos os compostos foram testados a uma concentração máxima de 15  $\mu\text{M}$  (~6x o valor de  $\text{CE}_{50}$ ) por 40 minutos, sendo o mesmo tempo realizado no estudo de luminescência (**Figura 22 A**). Na **figura 22 B** se observa a incubação dos compostos com o parasita por 12h. Os resultados após 40 minutos demonstraram que não houve alteração do sinal de fluorescência e mesmo após 12 h de incubação, observou-se somente um aumento de 20% de fluorescência, sendo essa permeabilização observada uma consequência da morte do parasita e não a sua causa.



**Figura 22:** Fluorescência da sonda SYTOX Green® em promastigota de *L. donovani*. (A) promastigota *L. donovani* (t=0h de incubação); (B) *L. donovani* (t=12h de incubação). Todos os compostos foram testados a 15  $\mu$ M. As setas representam a adição de 0.1% Triton x -100.

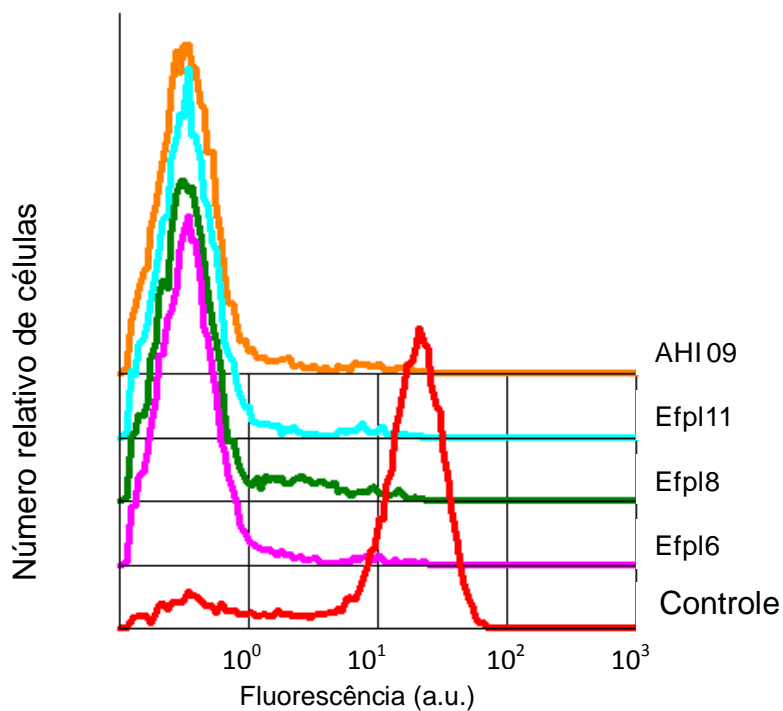
No entanto, a incorporação de sonda não atingiu os níveis alcançados nos parasitas tratados com Triton X-100, mesmo em concentrações muito superiores ao valor de  $CE_{50}$  e também em relação ao tempo de incubação.

### 1.2.3. Despolarização da membrana mitocondrial

Uma das possíveis causas da diminuição dos níveis intracelulares de ATP, uma vez observado que não houve alteração da membrana plasmática, é a ação dos compostos na mitocôndria, como já mencionado no item 3.1 dos Materiais e Métodos.

A medição da alteração da membrana mitocondrial foi realizada avaliando os níveis de acumulação de Rodamina-123, que é uma sonda

fluorescente cuja concentração é proporcional à integridade do potencial da membrana mitocondrial (Diaz-Achirica et al. 1998). Na **figura 23**, se observa o histograma obtido por citometria de fluxo que apresenta o potencial de acumulação da sonda na mitocôndria dos promastigotas de *L. donovani*. Após o tratamento com os compostos foi possível perceber uma diminuição considerável do acúmulo da sonda fluorescente, conforme observado pelo deslocamento do pico para a esquerda, indicando uma menor fluorescência média.



**Figura 23:** Histograma de representa a % acúmulo de Rodamina-123 em *L. donovani* após tratamento com EFPL6, EFPL8, EFPL11 10 $\mu$ M e AHI09 5  $\mu$ M. Teste T Student's ( $p < 0.01$ ).



Na **tabela VIII** se observa os valores em porcentagem desse acúmulo de Rodamina-123.

**Tabela VIII:** Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em *L. donovani*

Compostos	%Rodamina123
Controle	100
Controle com KCN	24.46
EFPL6 3 $\mu$ M	18.18
EFPL6 10 $\mu$ M	5.72
EEFPL6 15 $\mu$ M	6.73
EFPL8 3 $\mu$ M	36.84
EFPL8 10 $\mu$ M	9.72
EFPL8 15 $\mu$ M	9.76
EFPL11 3 $\mu$ M	8.78
EFPL11 10 $\mu$ M	4.91
EFPL11 15 $\mu$ M	4.91
AHI09 1 $\mu$ M	26.54
AHI09 3 $\mu$ M	8.71
AHI09 5 $\mu$ M	5.96

% de acúmulo de Rodamina-123 em relação ao controle

Todos os compostos resultaram em uma significativa ( $p < 0.01$ ) redução do acúmulo da sonda fluorescente nas células tratadas, com valores entre 90% a 95% em relação ao controle de células não tratadas.

Observou-se ainda que os compostos EFPL6, 8 e 11 apresentaram um efeito significativo na concentração de 10  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 4x o valor de  $\text{CE}_{50}$ ), enquanto o AHI 09, na concentração de 5  $\mu\text{M}$  (2,5x o valor de  $\text{CE}_{50}$ ). Os dados demonstraram ainda que a redução ocasionada pelos compostos foi maior que o controle negativo do experimento, quando utilizou-se o KCN (redução de 75%).

#### **1.2.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelos compostos**

A síntese de ATP requer um consumo de oxigênio como receptor final de elétrons, em consequência, esses parâmetros se relacionam com a capacidade de sínteses de ATP pela mitocôndria, quando o fluxo de elétrons através da cadeia respiratória se encontra acoplada a síntese de ATP. Em uma segunda etapa com o objetivo de identificar o alvo de ação dos compostos na cadeia respiratória, foi monitorada a taxa de consumo de oxigênio em relação à adição de substratos e inibidores da cadeia respiratória para os diferentes complexos da cadeia respiratória de acordo com a figura 19 do apartado Materiais e Métodos.

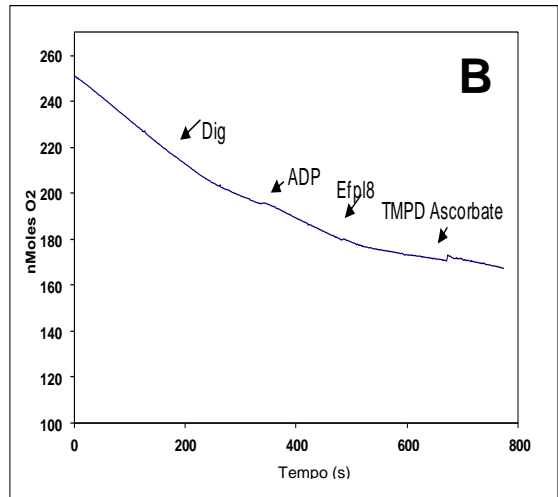
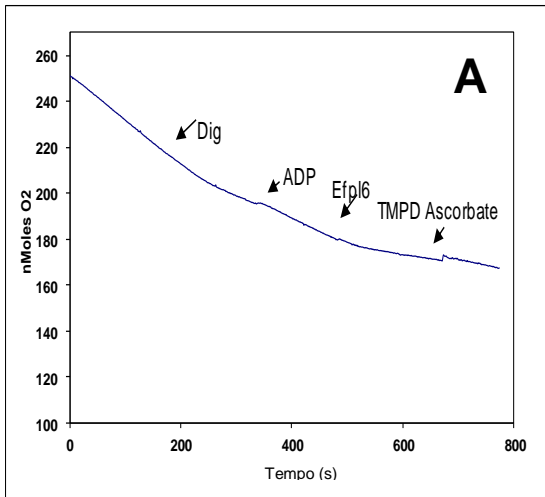
Para permitir o acesso irrestrito de substratos e inibidores da cadeia respiratória, a membrana plasmática foi permeabilizada com digitonina, que permite a permeabilização seletiva da membrana plasmática, que contém esteróis enquanto a membrana mitocondrial permanece impermeável. A integridade da membrana interna mitocondrial foi provada pela adição de ADP, e conseqüentemente o aumento da respiração, já que o ADP deixa de ser o substrato limitante da síntese de ATP ao permitir a troca do ATP intramitocondrial pelo ADP extramitocondrial através do nucleotídeo trasportase mitocondrial, sendo confirmada pelo aumento da respiração celular (Luque-Ortega et al. 2001). Os compostos EFPL6, EFPL8, EFPL11 e AHI09 foram adicionados na concentração de 25  $\mu\text{M}$  (aproximadamente 10 x o valor de  $\text{CE}_{50}$ ). O uso de uma concentração mais elevada dos compostos se deve a maior densidade parasitária exigida por esta técnica (densidade

de parasita 50 x superior ao ensaio de  $CE_{50}$ ), em meio rico com o substrato succinato, essencial para a fosforilação oxidativa do parasita.

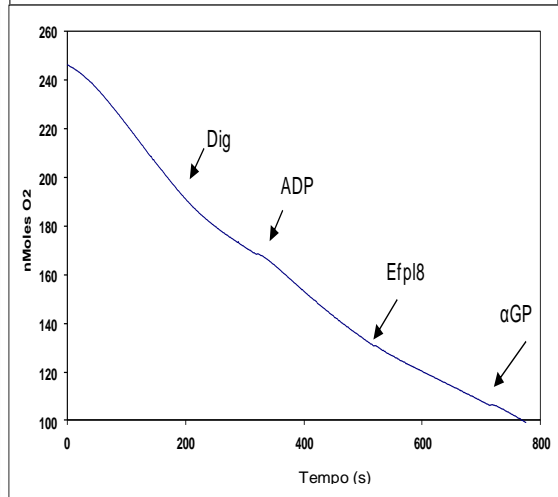
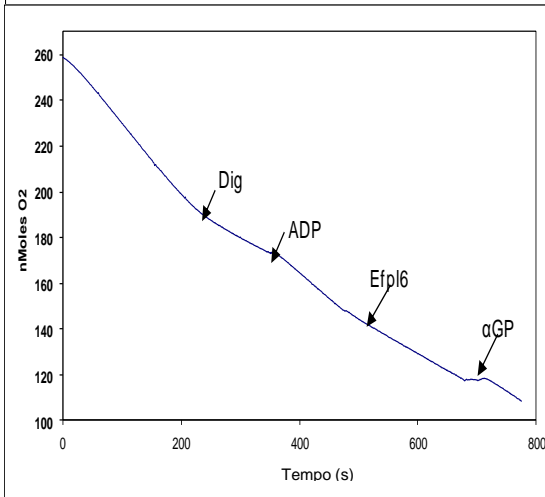
Na **figura 24 (1. A, B, C e D)**, observamos a taxa de consumo de oxigênio diante da adição dos 4 compostos. Com todos esses compostos ocorreu uma diminuição do consumo de oxigênio. Numa etapa posterior se procedeu o estudo do sítio de inibição na cadeia respiratória, utilizando promastigotas permeabilizados com digitonina. Como primeira etapa se procedeu à adição de TMDP ascorbato, um doador de elétrons ao citocromo C. Para todos os compostos testados, foi observado uma restauração da taxa de consumo de oxigênio em aproximadamente 90%, indicando que o citocromo C oxidase (Complexo IV), não foi inibido. Na **figura 24 (2. A, B, C e D)**, ocorreu a adição de  $\alpha$ -glicerofosfato, um substrato do complexo I. De forma similar, para todos os compostos testados, foi observada uma restauração da taxa de consumo de oxigênio em aproximadamente 90%, indicando também que o complexo I também não foi inibido.

Procedeu-se assim a inibição do complexo II com a adição do malonato e em seguida a adição do  $\alpha$ -glicerofosfato, um doador de elétrons através do  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase mitocondrial. A velocidade do consumo de oxigênio é menor que a conseguida pelo succinato, sem alterar a presença de benzofenonas (**Figura 24 B**). Por outra parte, quando se inibe a contribuição de succinato, com a adição do malonato (inibidor competitivo do succinato). A velocidade do consumo de oxigênio depende unicamente da contribuição do  $\alpha$ -glicerofosfato, na **figura 24 B e C**, se deduz que a entrada dos elétrons que é mediada pelo  $\alpha$ -glicerofosfato, não se altera pelas benzofenonas e o complexo III é funcional, conforme demonstra a inibição da antimicina **figura 24 C**, o qual por eliminação demonstra o complexo II como sítio de inibição.

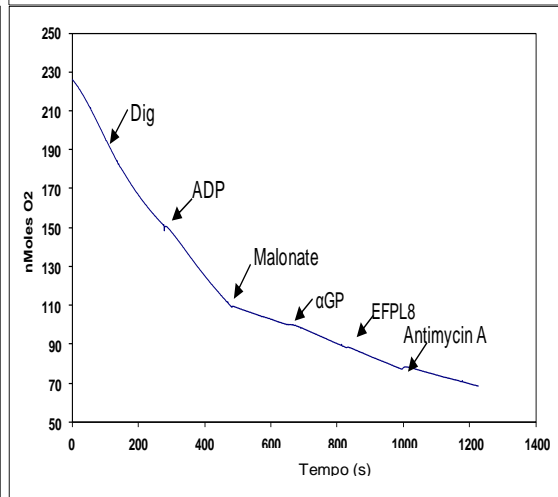
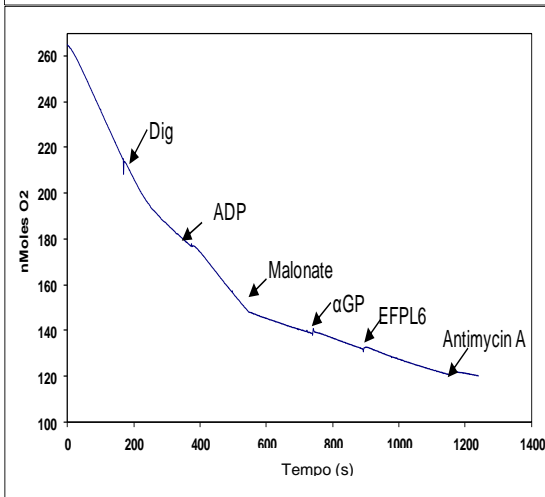
1

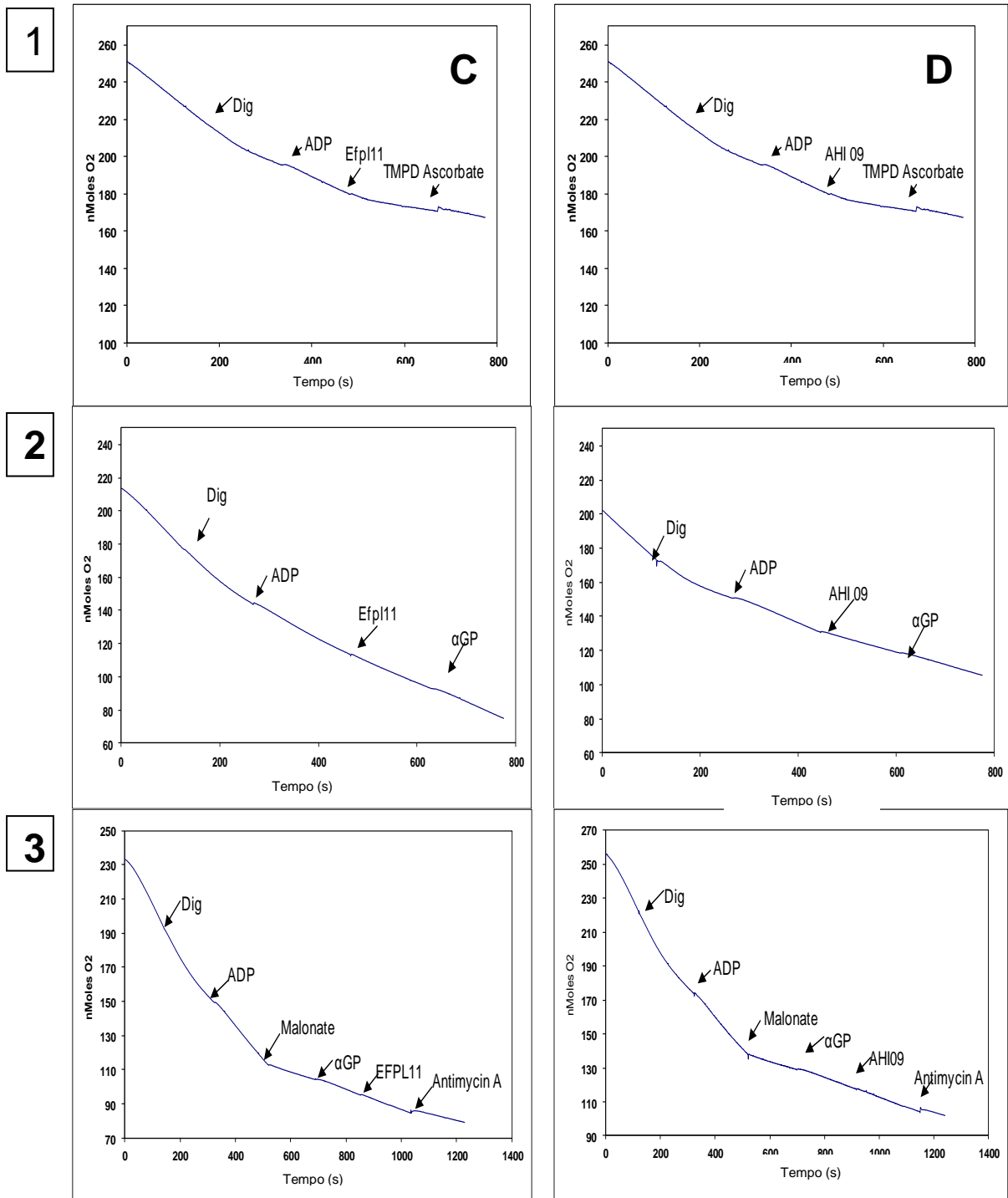


2



3

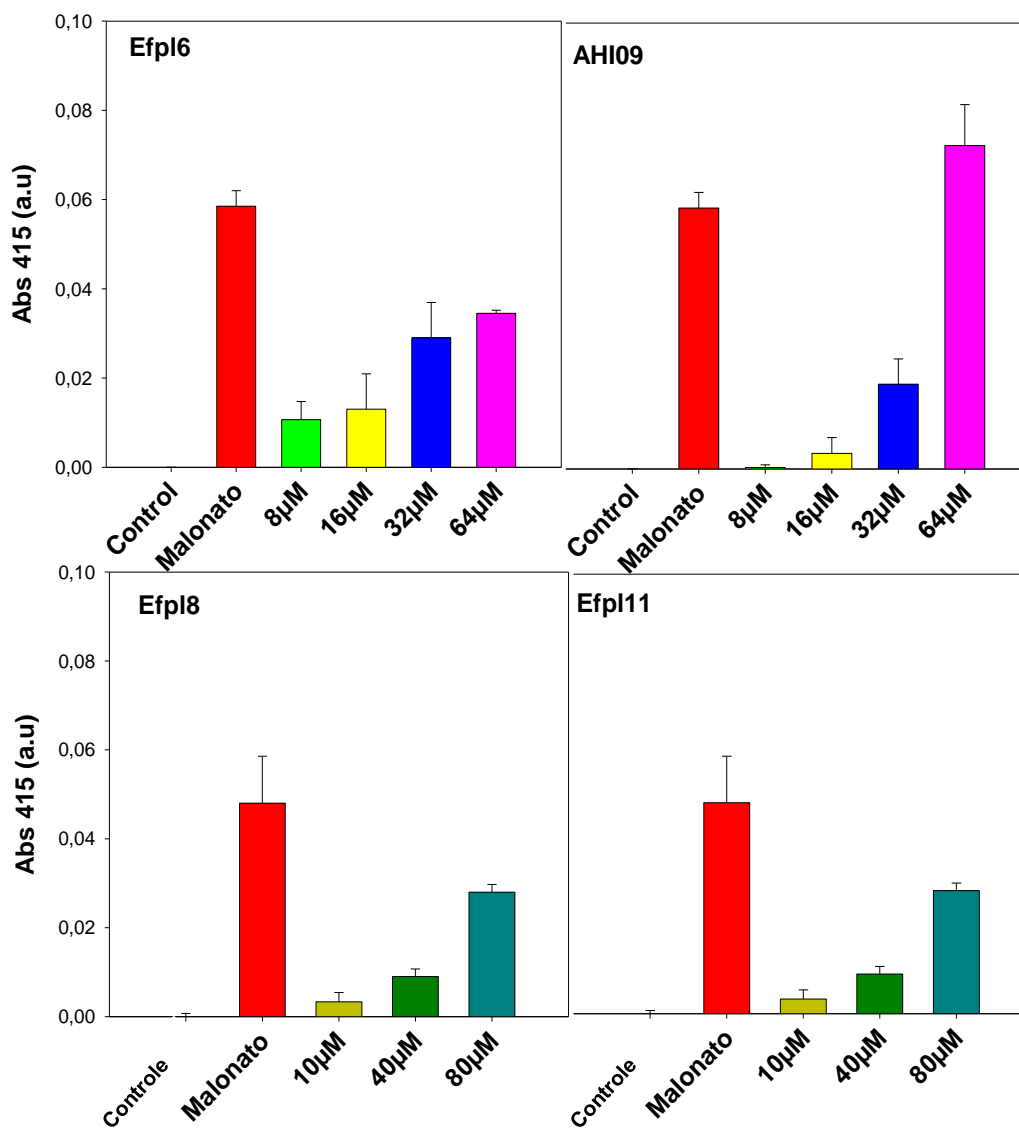




**Figura 24:** Determinação do consumo dos níveis de oxigênio e a identificação da inibição do complexo II da cadeia respiratória pelo EFPL6 (A), EFPL8 (B), EFPL11 (C) e AHI09 (D). As setas foram adicionadas para indicar os substratos e os inibitórios da cadeia respiratória.

### 1.2.5. Atividade succinato desidrogenase (SDH)

Para confirmar a ação dos compostos EFPL6, EFPL8, EFPL11 e AHI09 no complexo II detectado no estudo anterior, foi investigada a inibição da atividade SDH na fração mitocondrial. Na **figura 25** se observa a inibição dose independente da atividade SDH da fração mitocondrial de *L. donovani* tratada com os 4 compostos do estudo e sua relação com o inibidor do complexo II, o malonato, a uma concentração de 10 mM. Os compostos EFPL6, EFPL8 e EFPL11, apresentaram um aumento do sinal em 40%, 30% e 30%, respectivamente, em relação ao controle nas concentrações mais elevadas. O composto AHI09 demonstrou o maior sinal (80%) de absorbância quando testado na concentração mais elevada, resultando em um valor superior ao próprio controle o malonato, indicando uma atividade maior de inibição do complexo II que o próprio controle do experimento.



**Figura 25:** Atividade SDH da fração mitocondrial na presença do succinato em concentrações crescentes dos compostos. Densidade de proteína utilizada 0,2 mg/mL. Barra de erros indica o desvio padrão.

### 1.3. Microscopia

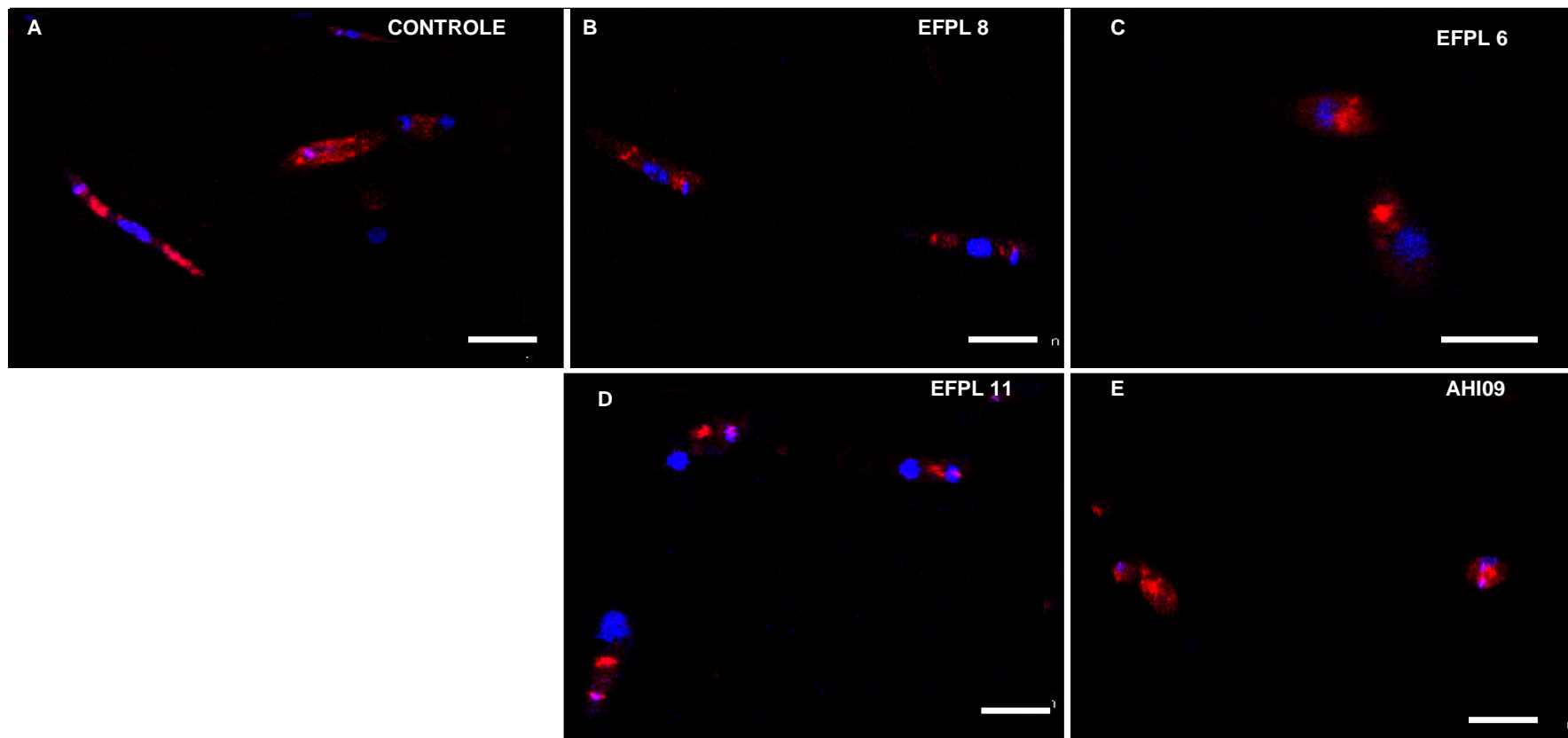
#### 1.3.1. Microscopia laser confocal

A fim de corroborar os experimentos quantitativos e observar alterações morfológicas na mitocôndria, foi realizado o experimento de microscopia confocal em promastigotas de *L. donovani*, utilizando para esse estudo o marcador específico Mitotracker Red, cuja acumulação irreversível na mitocôndria depende da existência de um potencial mitocondrial. Os núcleos foram corados com DAPI. Na **figura 26** foi observada a distribuição do marcador em relação ao controle com um tempo de incubação de 4h.

É possível observar uma diferença qualitativa existente entre os parasitas tratados com os compostos em relação ao controle; os parasitas tratados pelos compostos EFPL6, AHI09, EFPL8 e EFPL11 apresentaram uma distribuição mais pontual (menos difusa) que indicaria uma possível fragmentação da mitocôndria, quando comparados ao grupo controle. O grupo controle apresentou ampla e intensa distribuição da fluorescência do Mitotracker Red após 4h, diferente do ocorrido com os parasitas tratados com os compostos.

Os compostos EFPL8 e EFPL11 se observa claramente a fragmentação da mitocôndria, devido uma visualização pontual da sonda.

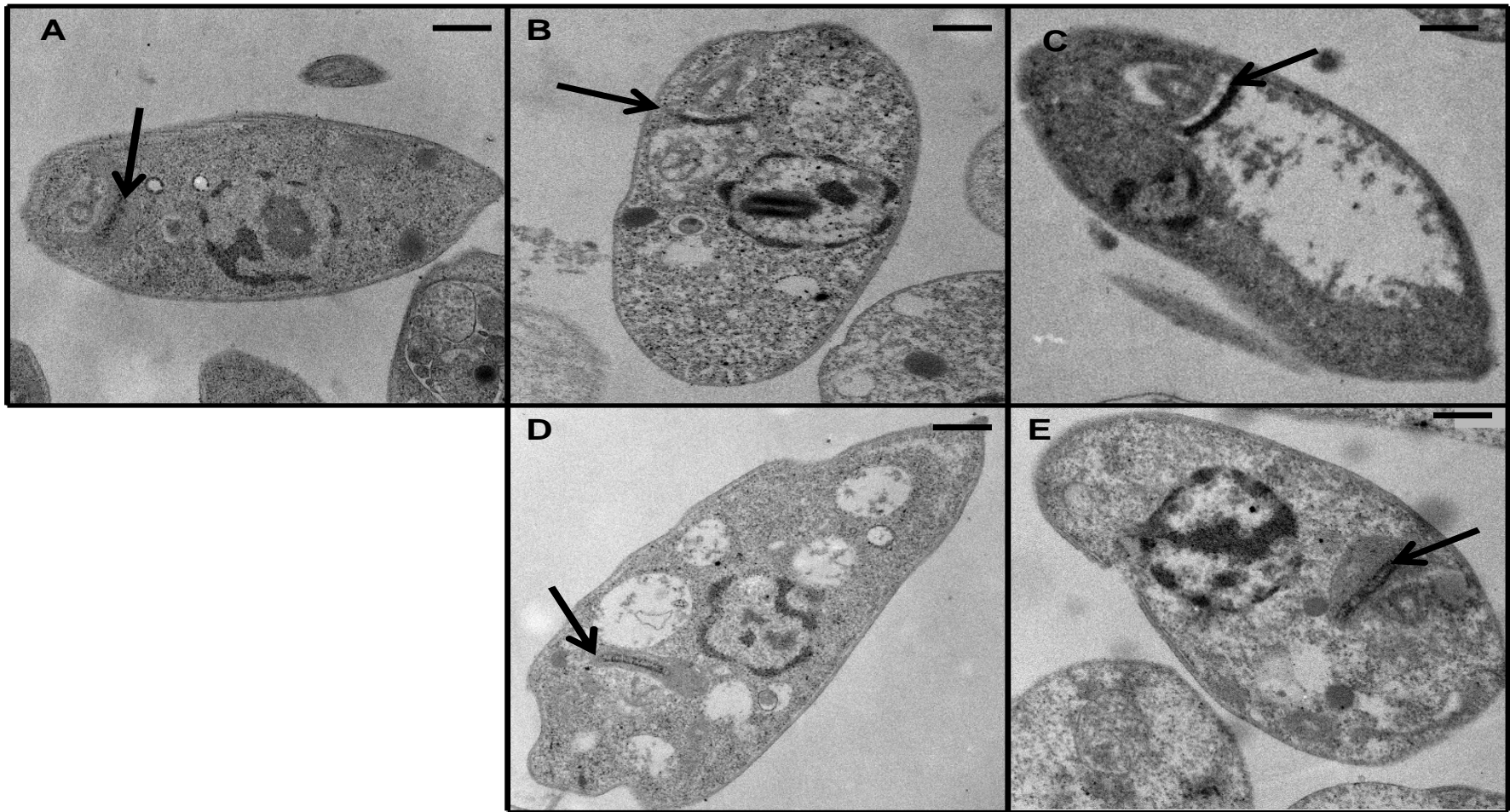




**Figura 26:** Microscopia confocal de *L. donovani*. Os parasitas foram tratados com 0,1 μM Mitotracker Red (Vermelho) e DAPI (Azul) 1 μg/mL. Os promastigotas foram tratados por 4 horas com os compostos na concentração de 15 μM para os compostos EFPL6, EFPL8 e EFPL11 e 5 μM para o composto AHI09. Controle (A), EFPL8 (B), EFPL6 (C), EFPL11(D), (E) AHI09. Barra, 10 μm.

### 1.3.2. Microscopia eletrônica

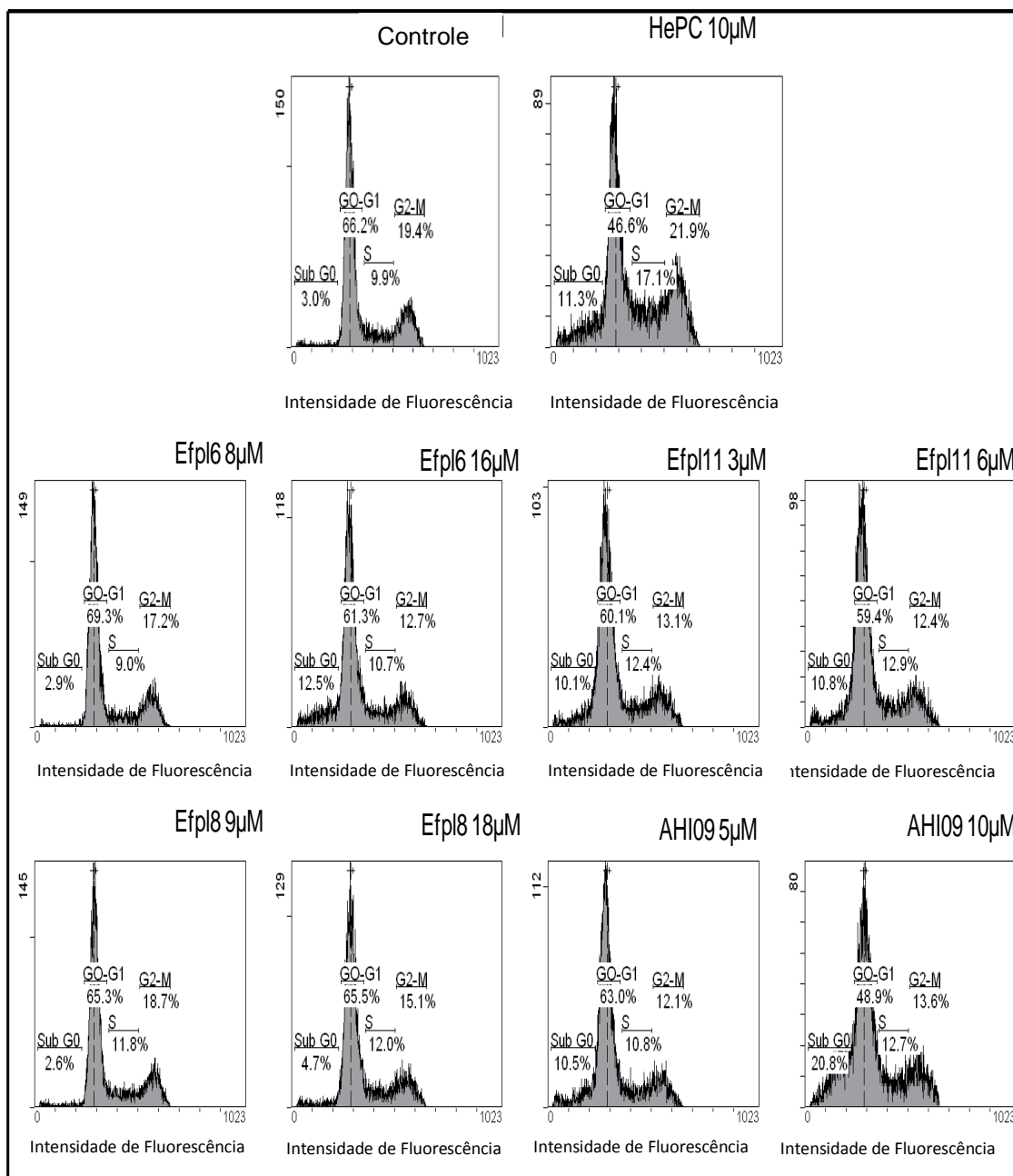
Com o objetivo de se avaliar os danos ultraestruturais nos promastigotas incubados com os compostos em estudo, foi realizada uma microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, os parasitas foram incubados durante 4 h em uma concentração que reduziria 50% da viabilidade dos parasitas ( $CE_{50}$ ). Nas **figura 27 (B, C, D, E)** podemos observar que os compostos induziram um aumento do volume mitocondrial dos promastigotas, uma degradação de organelas intracelulares, assim como uma intensa vacuolização no citoplasma após 4 h de incubação. Em EFPL11 (**Figura 27 D**) se observa uma vacuolização mais acentuada em relação aos outros compostos. Dentre os compostos estudados observou-se nitidamente um dano mitocondrial mais intenso induzido pelo composto EFPL8 (**Figura 27 C**). Ainda assim, não foram observados poros ou alterações na integridade da membrana plasmática para os 4 compostos estudados, assim como nenhuma significativa alteração a nível nuclear, o que indicaria um dano mitocondrial. Na **figura 27 A**, observa-se o grupo controle (não tratado), contemplando estruturas íntegras como o núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar e membrana plasmática.



**Figura 27:** Microscopia eletrônica de promastigota de *L. donovani* incubado por 4h na concentração que causa ~50% de inibição da viabilidade celular: Controle (A), EFPL6 (B), EFPL8 (C), EFPL11 (D), AHI09 (E). O cinetoplasto é indicado pelas setas pretas. Barra, 0.5 $\mu$ m.

### 1.3.3. Ciclo celular

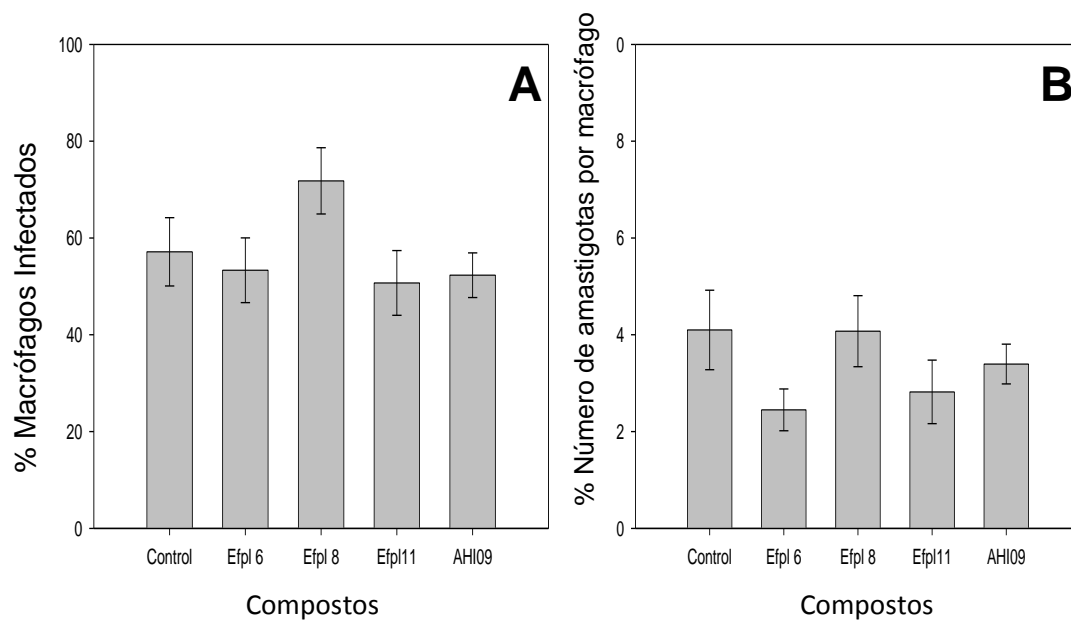
A diminuição dos níveis de ATP e a relação estabelecida com os níveis de consumo de oxigênio, indicando uma ação na mitocôndria especificamente no complexo II, poderiam alterar os processos de divisão celular da *Leishmania*, por isso foi estudado o ciclo celular. A incubação da *Leishmania* com os compostos EFPL6, EFPL11 e AHI09, resultou em um significativo ( $p < 0.02$ ) aumento da população celular na fase sub-G1, marcada com a sonda fluorescente iodeto de propídio. Esses compostos induziram a degradação de DNA, gerando fragmentos que foram detectados por citometria de fluxo. Os valores de fluorescência detectados na fase sub-G1 variaram de 10,8% (EFPL11) a 20,8% (AHI09), sendo valores similares ou superiores ao controle com miltefosina (11,3%). O composto EFPL8, submetido às mesmas condições dos demais compostos, resultou em 4,7% da população na fase sub-G1, demonstrando pouca indução de fragmentação do DNA, indicando uma não alteração no ciclo celular (**Figura 28**).



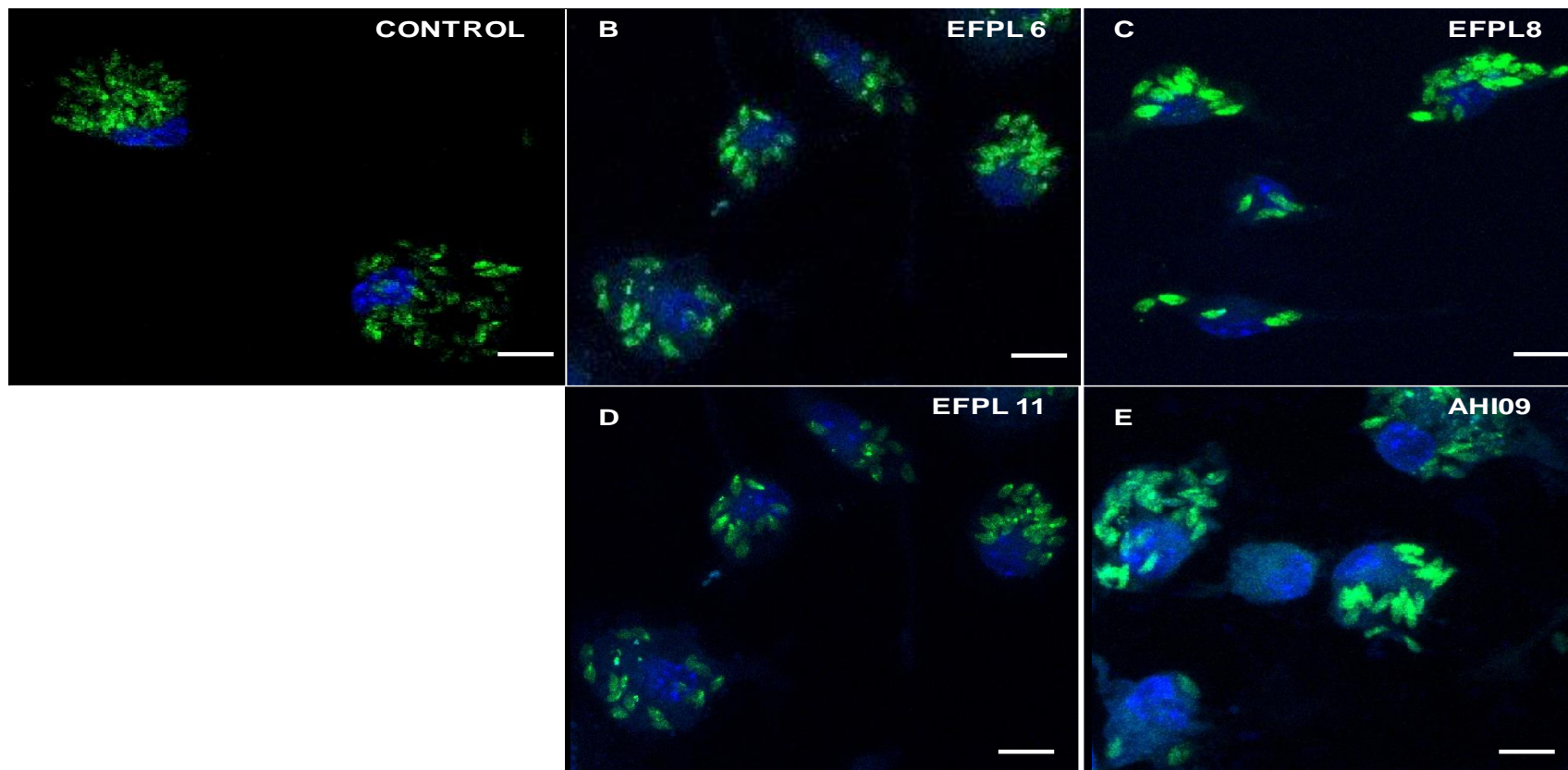
**Figura 28:** Indução da população sub-G1 ocasionado pelas benzofenonas: Histogramas do ciclo celular obtidos mediante citometria de fluxo de formas promastigotas *L. donovani* tratados com os compostos sintéticos EFPL6, EFPL11, EFPL8 e AHI09 por 4 horas e marcados com iodeto de propídio. As diferenças foram determinadas pelo Teste T Student's ( $p < 0.02$ ).

#### 1.4. Atividade em macrófagos peritoneais e amastigotas intracelulares de *Leishmania*

Diante do estudo do mecanismo de ação bioenergético, era importante conhecer o comportamento desses compostos em macrófagos peritoneais infectados. Uma vez estabelecida a infecção intracelular, os macrófagos foram tratados primeiramente com os compostos EFPL6, EFPL8, EFPL11 a 15  $\mu\text{M}$  e o composto AHI09 a 5  $\mu\text{M}$  (~6x o valor de  $\text{CE}_{50}$  em amastigota axênica). (**Figura 29**). O tratamento dos macrófagos infectados com amastigotas de *L. pifanoi* não produziu redução significativa no número de macrófagos infectados nem mesmo no número de amastigotas por macrófago infectado. Esse experimento foi repetido à concentração de 25  $\mu\text{M}$  para todos os compostos, porém não houve alteração dos resultados. Na **Figura 30** observamos os amastigotas, previamente marcadas com sonda a fluorescente CFSE, que se liga covalentemente aos grupos aminos das proteínas do parasita. Os núcleos dos macrófagos foram marcados com DAPI (azul). Na microscopia de fluorescência, foi observada a quantidade de macrófagos por campo e a número de parasitas por macrófago; não se observou diferenças significativas entre os parasitas tratados e não tratados (controle).



**Figura 29:** Macrófagos peritoneais infectados por *L. donovani* incubados por 12 h com os 4 compostos. (A) % de infecção de macrófagos com EFPL6, EFPL8, EFPL11 15  $\mu$ M e AHI09 5  $\mu$ M. (B) Número de amastigotas por macrófagos.



**Figura 30:** Microscopia confocal, os parasitas foram marcados com CFSE com 0,4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e DAPI (Blue) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Foram tratados com os compostos, as concentrações de EFPL6, EFPL8 e EFPL11 15  $\mu\text{M}$ ; AHI09 5  $\mu\text{M}$ , (A) Controle, (B) EFPL8, (C) EFPL8, (D) EFPL11, (E) AHI09. Barra 10  $\mu\text{m}$



## 2. Fármaco buparvaquona

### 2.1. Atividade anti-*Leishmania* e citotoxicidade

A atividade do fármaco buparvaquona foi avaliada frente às formas promastigotas das espécies *L. infantum* e *L. donovani*, e na forma amastigota da espécie *L. pifanoi*. Na **tabela IX**, observou-se a 4 h de incubação, uma inibição significativa da redução do MTT, indicando uma redução da viabilidade nas espécies testadas, com valores de CE<sub>50</sub> de 0,8 µM na forma amastigota e 0,04 µM (*L. donovani*) e 0,03 µM (*L. infantum*) na forma promastigota. O fármaco miltefosina foi utilizado como padrão e resultou em uma CE<sub>50b</sub> de 12,5 µM. Considerando as espécies *L. donovani* e *L. infantum*, observou-se um comportamento similar à 4h, com valores de CE<sub>50</sub> bastante próximos.

**Tabela IX:** Valores de viabilidade e proliferação celular de *Leishmania* na presença da buparvaquona.

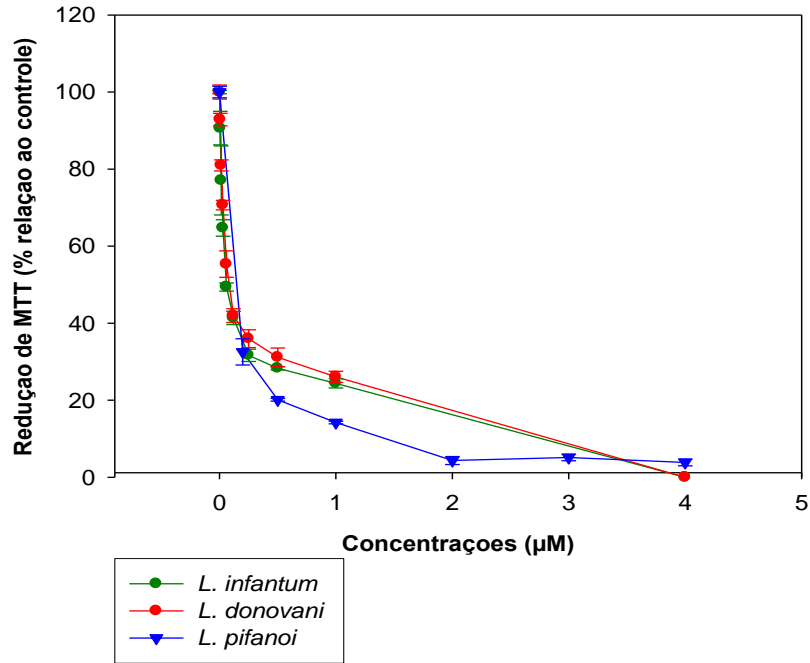
Fármaco	Promastigota <i>L. donovani</i>			Promastigota <i>L. infantum</i>			Amastigota <i>L. pifanoi</i>		
	CE <sub>50</sub> (µM)	CI <sub>50</sub> (µM)	CE <sub>50b</sub> (µM)	CE <sub>50</sub> (µM)	CI <sub>50</sub> (µM)	CE <sub>50b</sub> (µM)	CE <sub>50</sub> (µM)	CI <sub>50</sub> (µM)	CE <sub>50b</sub> (µM)
BPQ	0.04 ± 0.0	2.6 ± 0.8	0.16 ± 0.0	0.03 ± 0.0	3.4 ± 0.4	1.0 ± 0.0	0.8 ± 0.0	2.0 ± 1.0	0.3 ± 0.0

CE<sub>50</sub>: concentração efetiva 50% determinado após 4 h de incubação; CI<sub>50</sub>: concentração inibitória 50% sobre o crescimento parasitário; CE<sub>50b</sub>: concentração efetiva 50% determinado após 72 h ou 96 h de incubação.

De acordo com a **figura 31**, observou-se uma similaridade entre as curvas dose-reposta. Quando comparados os valores de CE<sub>50</sub> e CI<sub>50</sub>, observou-se uma variação significativa, com valores de CI<sub>50</sub> 2,5 x superiores para a forma amastigota (96 h), e 65 x (*L. donovani*) e 113 x (*L. infantum*) superiores para a forma promastigota (72 h) esses valores indicam um dano reversível à 4h, fato esse observado nas duas espécies de *Leishmania*

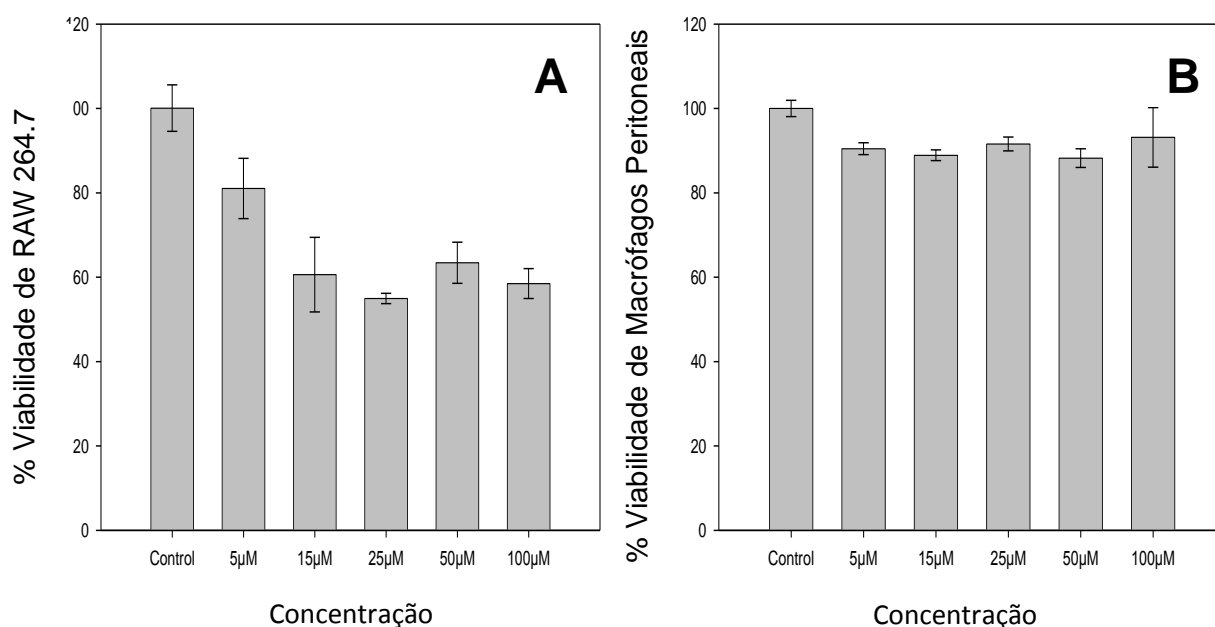
testadas, demonstrando que o parasita é capaz de se recuperar do ano ocasionado, demonstrando uma ação do fármaco entre 4 a 72 h.

Os valores de  $CI_{50}$ , foram superiores aos valores de  $CE_{50}$ ; na forma promastigota de *L. infantum* os valores variaram de 0,03  $\mu$ M a 1,0  $\mu$ M (33 x superior), corroborando com a informação de ação a longo prazo.



**Figura 31:** Atividade de BPQ sobre a redução de MTT de promastigota de *L. infantum*, *L. donovani* e *L. pifanoi*. Curva de inibição de 4 h.

Na **figura 32** observamos a citotoxicidade do fármaco buparvaquona, em células RAW 264.7 e em macrófagos peritoneais. Nossos dados demonstraram que a BPQ na concentração de 100  $\mu$ M resultou em uma viabilidade de 60% das células RAW 264.7 (**Figura 32 A**) e de 100% para os macrófagos peritoneais (**Figura 32 B**), resultado em um IS de > 125.



**Figura 32:** Toxicidade *in vitro* em células: (A) RAW 264.7 e (B) macrófagos peritoneais.

### 2.3. Mecanismo de ação

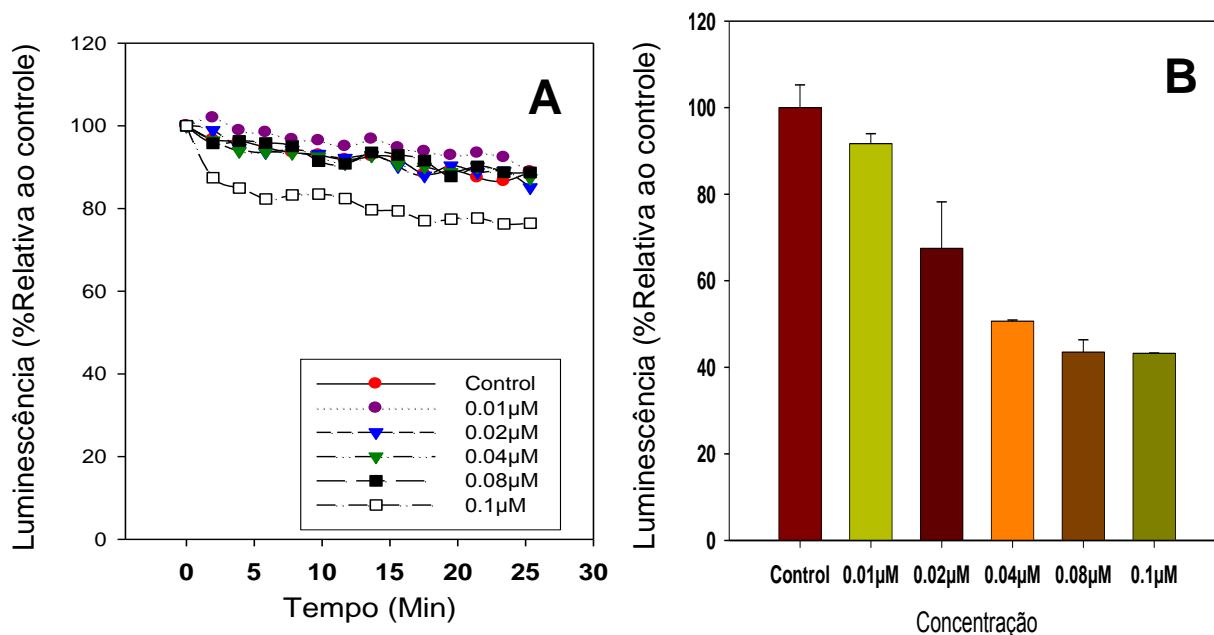
#### 2.3.1. Variação *in vivo* dos níveis de ATP intracelular em promastigotas de *L. donovani*.

Seguindo o procedimento idêntico às benzofenonas, se analisou as variações dos níveis de ATP em promastigotas de *L. donovani* pela BPQ. Para verificar a homeostase celular, foi monitorado os níveis de ATP na presença do fármaco BPQ.

Na **figura 33 A**, observamos a variação de luminescência após a adição de BPQ na concentração mais elevada testada de 0,1 μM ( 3 x o valor de CE<sub>50</sub>) se observou somente uma queda no sinal de luminescência de 20% a 30 minutos, o tempo máximo de observação.

Com o fim de se averiguar se o tempo de observação do experimento anterior foi muito reduzido para observar um efeito significativo, se procedeu à incubação dos promastigotas com BPQ por 4 h antes da adição do

substrato de luciferase DMNP-luciferina. Na **figura 33 B**, observamos que, na mesma concentração, porém com um tempo de incubação de 4 h, uma queda de 50% de luminescência, indicando que o tempo de ação do fármaco no metabolismo energético do parasita necessita de um tempo de incubação maior, estando esse tempo possivelmente entre 4 h à 12 h.

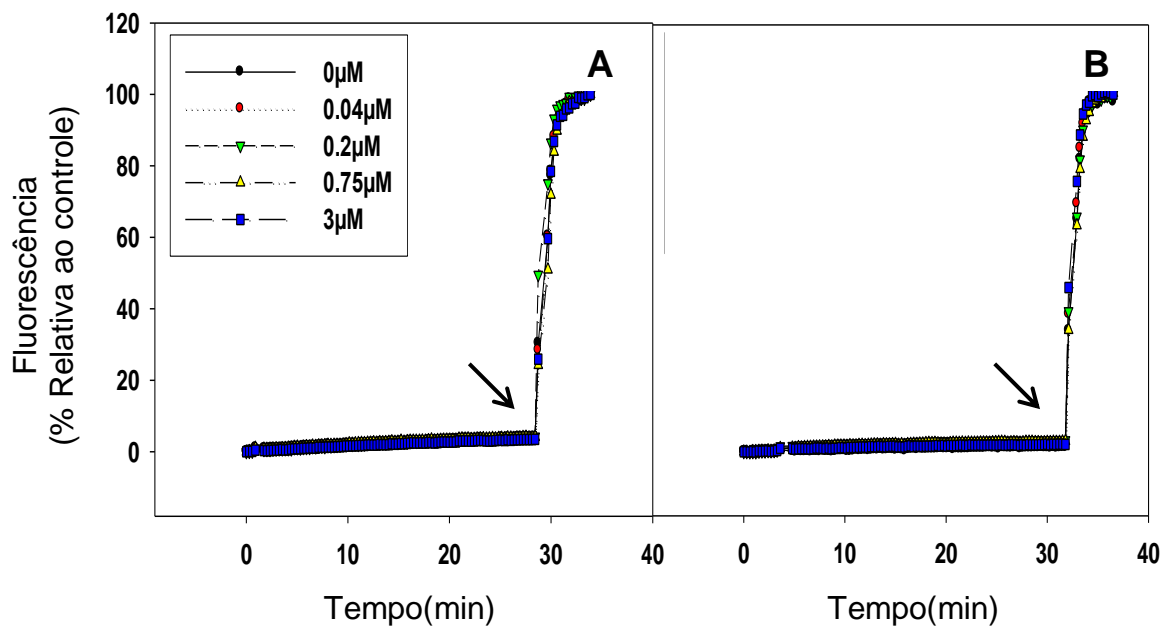


**Figura 33:** Variação da luminescência *in vivo*. A) Queda do nível ATP intracelular após a adição do fármaco. B) Variação da luminescência após incubação por 4 h com o fármaco

### 2.3.2. Permeabilização da membrana plasmática

Para verificar se a alteração dos níveis de ATP era devido a uma permeabilização da membrana plasmática, realizou-se o experimento com a sonda fluorescente SYTOX Green®. Na **figura 34 A** se observa que em concentrações crescentes do fármaco BPQ, não há sinal de fluorescência durante 30 minutos na forma promastigota de *L. infantum*. Mesmo em concentrações 100 vezes maior que o valor de CE<sub>50</sub>, sem prévia incubação, esse resultado se repete mesmo com uma incubação prévia de 12 h (**Figura 34 B**); portanto, a incorporação da sonda não atingiu os níveis alcançados

nos parasitas tratados com Triton X-100, mesmo em concentrações muito superiores ao valor de  $CE_{50}$  e também em relação ao tempo de incubação, indicando que a queda dos níveis de ATP observados no experimento de bioluminescência não se deve a uma alteração na membrana plasmática do parasita.



**Figura 34:** Entrada da sonda SYTOX<sup>TM</sup> Green em promastigota *L.infantum*: (A) t=0 de incubação, (B) t= 12h de incubação. As setas representam a adição de 0.1% Triton x 100.

### 2.4.3. Despolarização da membrana mitocondrial

A alteração dos níveis de ATP observado no item 2.3.1, poderia estar relacionado a uma ação do fármaco na mitocôndria.

Na **tabela X**, observam-se os valores normalizados referentes ao potencial de membrana mitocondrial utilizando-se Rodamina-123 em promastigotas de *L. infantum*. Observa-se uma despolarização da membrana mitocondrial conforme o aumento crescente das concentrações

da BPQ. Na concentração mais elevada de 3  $\mu\text{M}$  (100 vezes o valor de  $\text{CE}_{50}$ ), se observa uma queda do potencial em 88% quando comparado ao grupo controle, indicando que esse fármaco alterou o potencial de membrana mitocondrial.

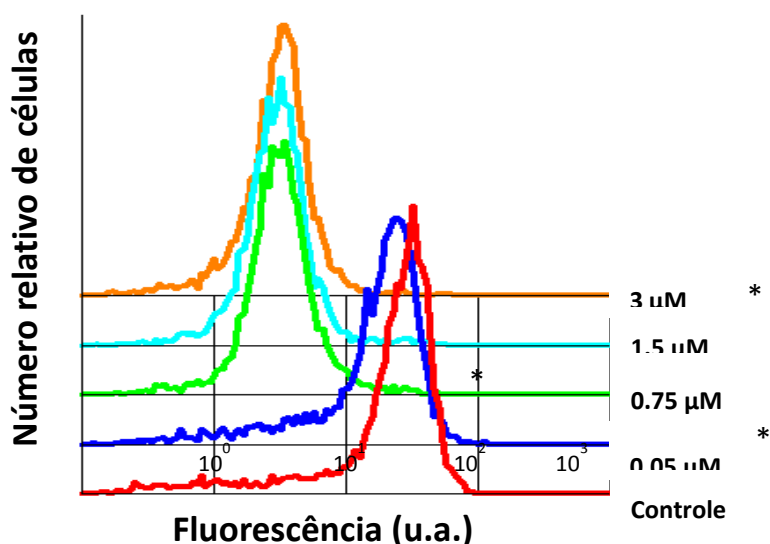
Na concentração de 0,75  $\mu\text{M}$  de BPQ, demonstrou-se uma queda do potencial de 80,5% em 4 h de incubação; essa capacidade não se alterou mesmo com o aumento das concentrações, indicando que nessa concentração foi atingido o máximo da ação do fármaco.

**Tabela X:** Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em *Leishmania infantum* em 4 h de incubação com BPQ.

	Controle		0.05 $\mu\text{M}$ %	0.25 $\mu\text{M}$ %	0.75 $\mu\text{M}$ %	1.5 $\mu\text{M}$ %	3 $\mu\text{M}$ %
	Controle	KCN					
	%	%					
<i>L.infantum</i>	100	48.32	85.95	35.92	19.52	19.14	18.01

% de acúmulo de Rodamina-123 em relação ao controle

Na **figura 35** foi observada essa diferença entre as concentrações com o deslocamento do pico para a esquerda em relação ao controle.



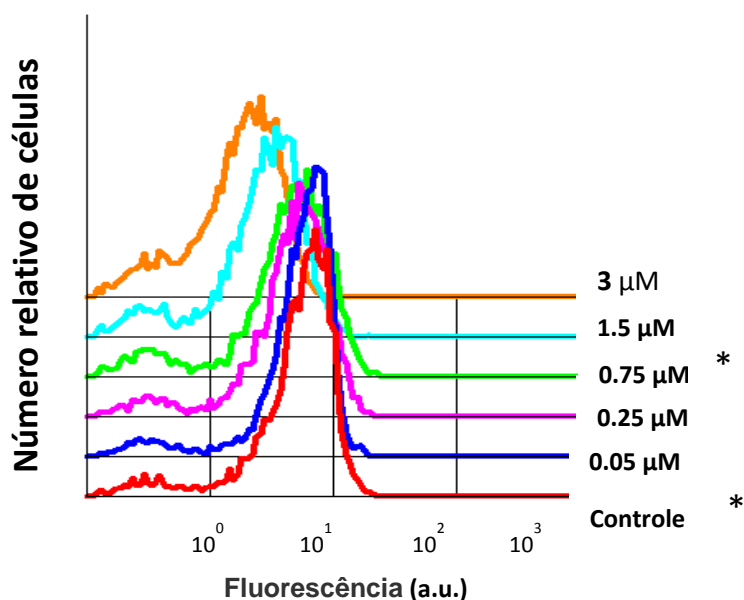
**Figura 35:** Acumulação de Rodamina 123 em promastigotas de *L. infantum* tratados com BPQ. Os promastigotas foram tratados por 4 h com diferentes concentrações de BPQ (0.05  $\mu\text{M}$ , 0.25  $\mu\text{M}$ , 0.75  $\mu\text{M}$ , 1.5  $\mu\text{M}$  e 3  $\mu\text{M}$ ). Teste t Student's \* ( $p < 0.05$ ) controle vs concentração.

Com o objetivo de se observar se a 4 h de incubação com a BPQ se produzia o máximo de efeito do fármaco, o experimento foi repetido a 12 h de incubação. Na **tabela XI** e **figura 36**, os valores de acumulação de Rodamina123 medidos por 12 h. Pela similariedade com os valores correspondentes na **tabela X** e na **figura 35**, se deduz que uma incubação superior a 4 h não aumenta as porcentagens de inibição (**Figura 36**), é possível observar as diferenças dos valores mostrados na **tabela XI**.

**Tabela XI:** Porcentagem de intensidade média de Rodamina-123 em *Leishmania infantum* em 12 h de incubação com BPQ.

	Controle						
	Controle %	Controle com KCN%	0.05µM%	0.25µM%	0.75µM%	1.5µM%	3µM%
<i>L. infantum</i>	100	34.29	100	88.05	72.67	46.01	29.2

% de acúmulo de Rodamina-123 em relação ao controle



**Figura 36:** Acumulação de Rodamina 123 em promastigotas de *L. infantum* tratados com BPQ medidos por citometria de fluxo. Os promastigotas foram tratados por 12 h com diferentes concentrações(0.05 µM, 0.25 µM, 0.75 µM, 1.5 µM e 3 µM) a 12 h de incubação. Teste t Student`s \* ( $p < 0.05$ ) controle vs concentração.

#### **2.4.4. Identificação dos complexos da cadeia respiratória de elétrons afetados pelo fármaco.**

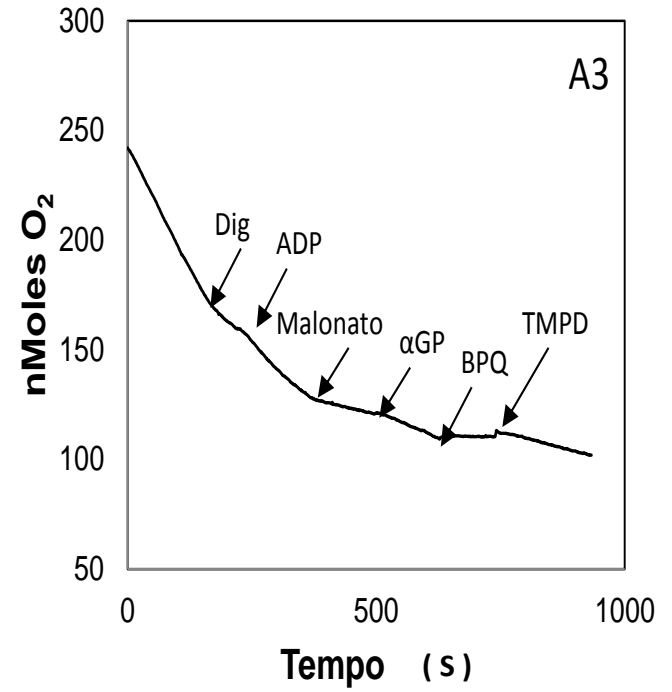
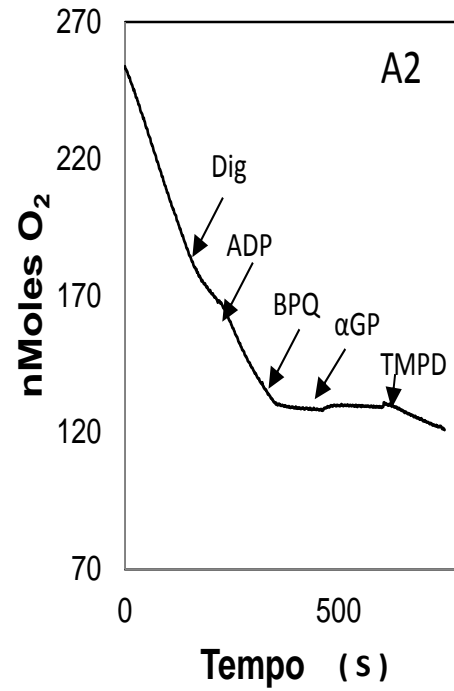
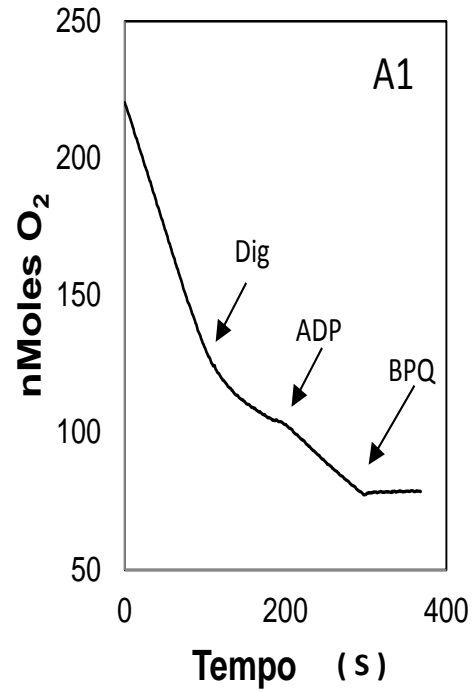
A alteração significativa na mitocôndria, observada pelo acúmulo de Rodamina-123, demonstrou a ação da BPQ na mitocôndria, despertando o interesse de se estudar sua ação nos complexos da cadeia respiratória. Para isso, procedeu-se o estudo de forma similar ao ocorrido com os compostos sintéticos anteriores.

Primeiramente, os parasitas foram permeabilizados com digitonina, permitindo assim, o acesso aos substratos e inibidores específicos. A integridade da membrana mitocondrial foi demonstrada pelo aumento da respiração após a adição de ADP. O succinato foi mantido durante o experimento como substrato do complexo II. Na **figura 37 A**, observa-se que após a adição da BPQ houve uma diminuição no processo de respiração celular.

Observamos na **figura 37 A**, a parada da respiração, dada a linearização da curva. Na **figura 37 B**, observamos que após a parada da respiração, dada pela adição do fármaco BPQ, a adição de  $\alpha$ -glicerofosfato (doador de elétrons ao complexo I), não foi possível reverter esse processo. Porém, após a adição de TMPD+Ascorbato (doador do complexo IV), foi observada uma recuperação da respiração celular, eliminando assim, a ação da BPQ no complexo IV.

Também observou-se na **figura 37 B** que, após a adição do  $\alpha$ -glicerofosfato, não houve a recuperação do processo de respiração, resultado esta informação, diferente daquela obtida pelos compostos sintéticos, demonstrando que a BPQ não inibe o complexo II. Na **figura 37 C** foi confirmada a ação do BPQ no complexo III da cadeia respiratória. Observou-se que após a adição do malonato (Inibidor do complexo II), ocorreu a parada da respiração, recuperada apenas pela adição do  $\alpha$ -glicerofosfato. Porém, após a adição do fármaco BPQ, a taxa de consumo de oxigênio voltou a subir, sendo recuperada apenas após a adição de TMPD + Ascorbato, indicando por exclusão, que a ação da BPQ se deu no complexo III da cadeia respiratória.



**A**

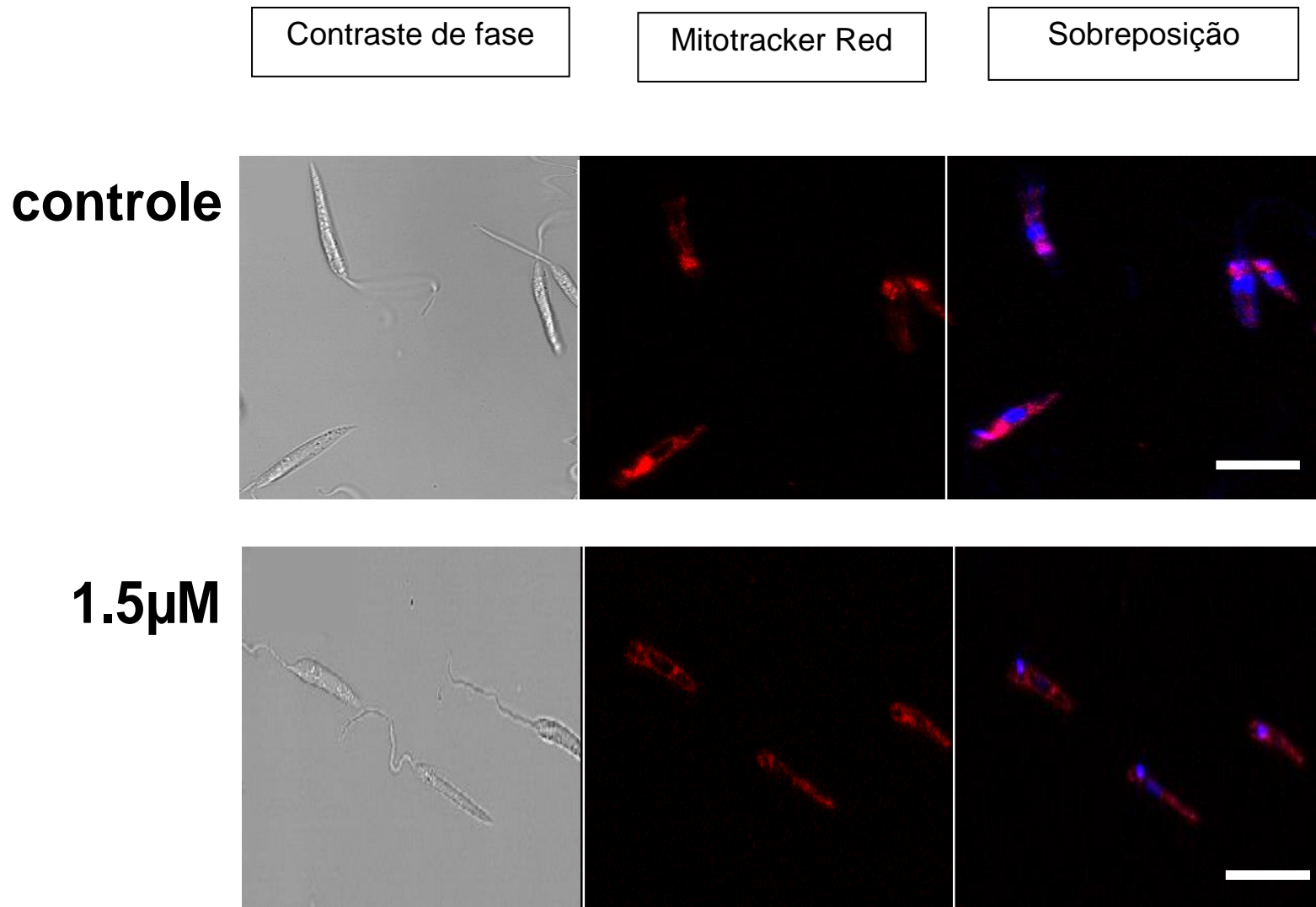
**Figura 37:** Identificação do sítio de inibição da cadeia respiratória de *Leishmania infantum* pelo fármaco BPQ (3  $\mu$ M). As setas indicam a adição de substratos e inibidores.

## 2.5. Microscopia

### 2.5.1. Microscopia laser confocal

Para verificar qualitativamente alterações na mitocôndria procederam-se o estudo com a sonda Mitotracker Red

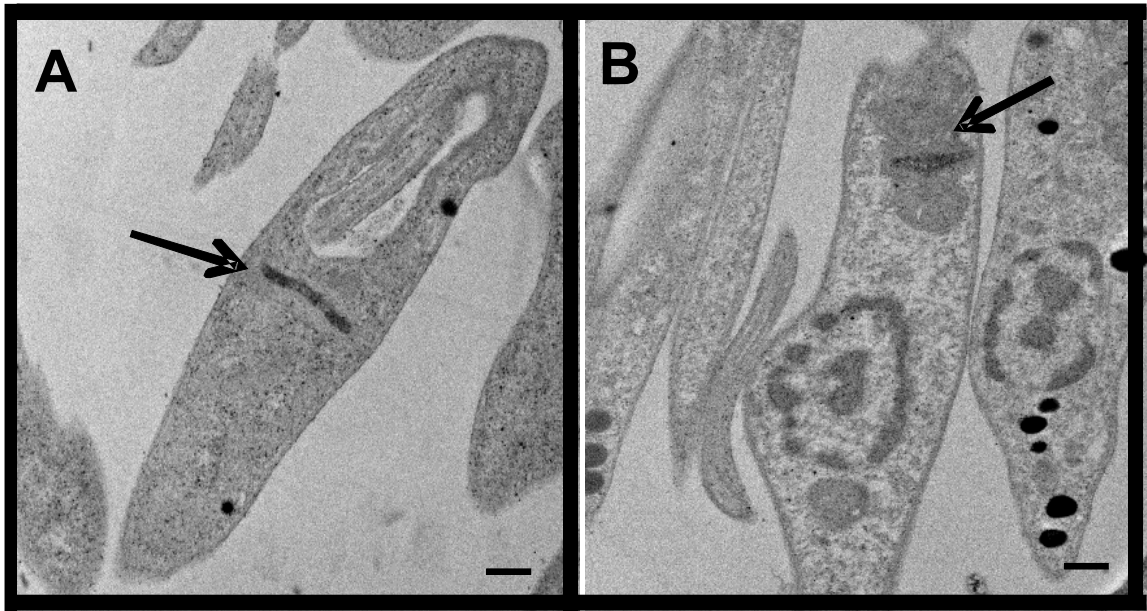
Na **figura 38** foi observada a distribuição do marcador específico de mitocôndria Mitotracker Red em relação ao controle. Os núcleos foram corados com DAPI. O tempo de incubação foi de 12 h. Nossos dados demonstram uma diferença qualitativa entre os parasitas tratados com o fármaco BPQ em relação ao controle, ocorrendo uma distribuição mais difusa da sonda, possivelmente ocasionada pela alteração na membrana mitocondrial.



**Figura 38:** Microscopia confocal de *L. infantum*, os parasitas foram marcados com 0.1 µM MitoTracker Red (Vermelho) e DAPI (Azul) 1 µg/mL. Os promastigotas foram tratados por 12 h com 1.5 µM. Barra, 10 µm.

### 2.5.2. Microscopia eletrônica

Para verificar os danos na mitocôndria, se realizou também o estudo dos danos ultraestruturais. Na **figura 39** observam-se qualitativamente, através da microscopia eletrônica, os dados obtidos nos experimentos anteriores, onde foi possível observar que na espécie de *L. infantum*, houve um aumento do volume mitocondrial e uma vacuolização no citoplasma e um inchaço na região do cinetoplasto após 12 h de incubação. Ainda assim, não foram observados poros ou alterações na integridade da membrana plasmática e do núcleo. Na **figura 39 A**, observa-se o grupo controle (não tratado), contemplando estruturas íntegras como o cinetoplasto, bolsa flagelar, membrana plasmática.

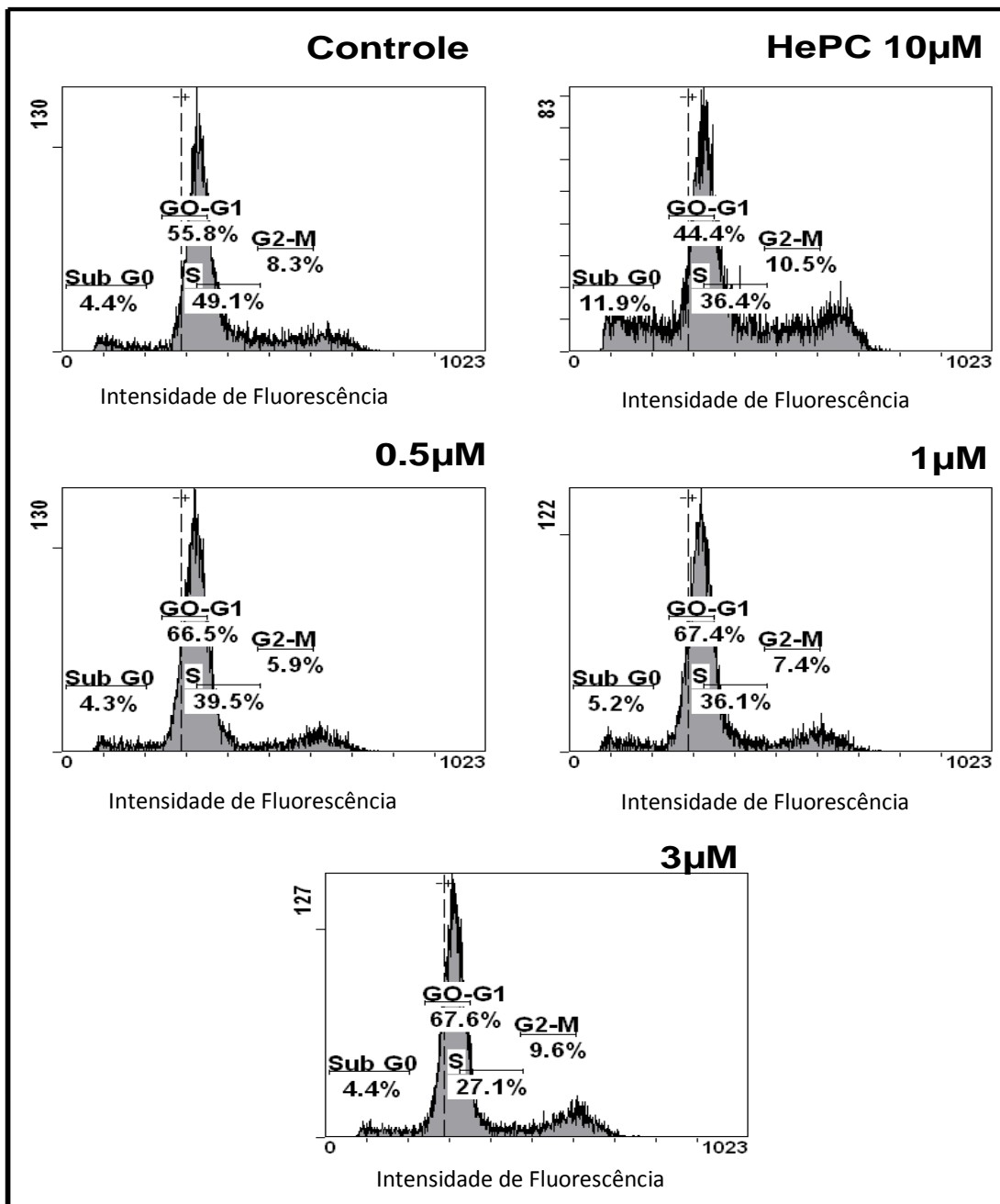


**Figura 39:** Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas da cepa de *L. infantum* incubados com BPQ por 12 h. Controle (A) e (B) 0.5  $\mu$ M. O cinetoplasto é indicado pelas setas pretas. Barra, 10 $\mu$ m.

## 2.6. Ciclo celular

Como já observado anteriormente, compostos ou fármacos que ocasionam a diminuição dos níveis de ATP, devido a uma ação na mitocôndria, podem ocasionar alterações no processo de divisão celular da *Leishmania*. A população sub-G1 (indicadora de apoptose), foi determinada utilizando a citometria de fluxo com os parasitas marcados pelo IP (iodeto de propídio).

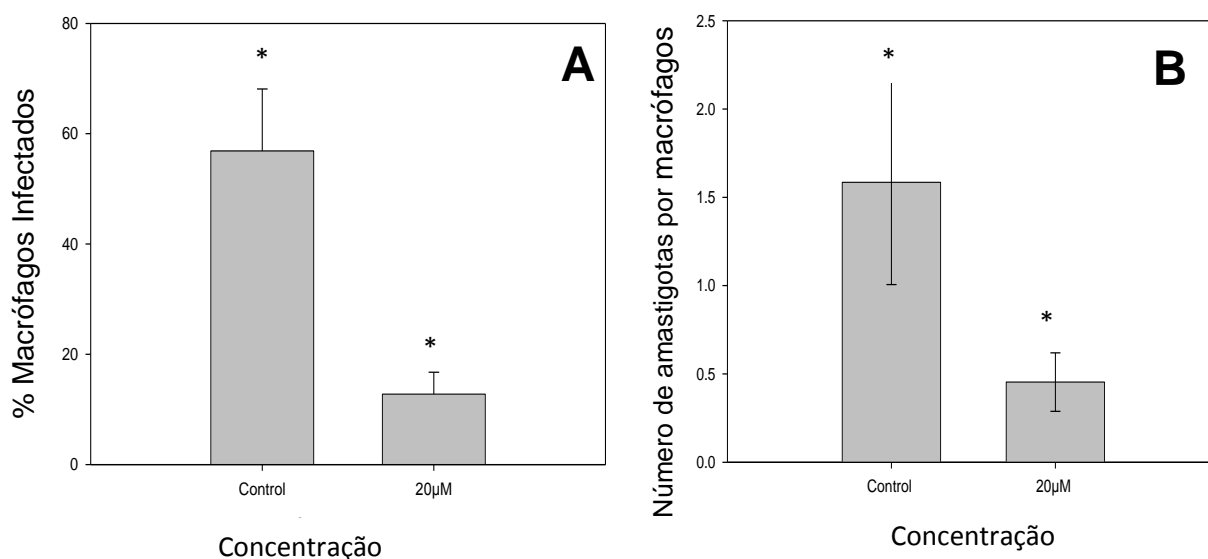
Não foi observada a formação de populações sub-G1, quando os parasitas foram incubados a 4 h e 12 h e os dados foram os mesmos, inclusive na concentração mais elevada de 3  $\mu$ M (**Figura 40**).



**Figura 40:** Análise da população sub-G1 em promastigotas de *L. infatum* tratados com BPQ através da citometria de fluxo.

## 2.6. Atividade em macrófagos peritoneais e amastigotas intracelulares de *Leishmania*

O tratamento dos macrófagos infectados com amastigotes *L. pifanoi* pelo fármaco produziu redução significativa no número de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos infectados. Uma vez estabelecida à infecção intracelular, os macrófagos foram tratados com uma concentração de 20  $\mu$ M. O fármaco BPQ reduziu em 80% o número de macrófagos infectados em relação ao controle em 4 h de incubação (**Figura 41 A**), mostrando a ação efetiva do fármaco. Na **figura 41 B** observamos a diminuição de amastigotas por macrófagos, de 1,5 eles reduziram para 0,5.



**Figura 41:** Macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania infantum* incubado com o fármaco BPQ (A) % de macrófagos infectados com BPQ a 20  $\mu$ M. (B) Número de amastigotas por macrófagos. Diferença foi significativa Test t \* ( $p < 0.01$ ).

## **DISCUSSÃO**



## **1. Importância do estudo do mecanismo bioenergético na quimioterapia de *Leishmania***

A necessidade de novos alvos para o tratamento quimioterápico de Tripanosomatídeos impostas pela crescente resistência e pelos diversos efeitos colaterais associados a muitos dos fármacos em uso atualmente, fazem surgir características essenciais que devem ser cumpridas pelos novos fármacos em pesquisa, como, a atividade, alta biodisponibilidade; ação seletiva e baixa indução de resistência. Além dessas, há outras características importantes para as doenças tropicais, como a produção a baixo custo, administração oral e poucos efeitos colaterais. A farmacologia contra os Tripanosomatídeos é baseado nas diferenças de seus hospedeiros vertebrados, a presença de organelas e rotas metabólicas específicas ou características moleculares diferenciadas, tornando o desenvolvimento de terapias com sucesso muito variável (Urbina 1997, Fernandes Rodrigues et al. 2008) .

Os Tripanosomatídeos, ao contrário das células de mamíferos, apresentam uma mitocôndria única que ocupa um volume de aproximadamente 11% do corpo do parasita, em comparação com as células de mamíferos que apresentam de 25 - 300 mitocôndrias por célula (Carvalho & Recco-Pimentel 2007 Fidalgo & Gille 2011).

A mitocôndria abriga os componentes da maquinaria correspondentes à fosforilação oxidativa, responsáveis pela síntese de ATP no glicolítico, que em *Leishmania* é essencial para atender às necessidades energéticas necessárias para a sobrevivência e proliferação do parasita, já que a glicólise, ao contrario das formas sanguíneas em tripanosomas africanos, somente atua num papel secundário. Apesar da conservação evolutiva deste sistema, os Tripanossomatídeos são os eucariotas mais antigos evolutivamente, com uma mitocôndria funcional. Conseqüentemente, existem diferenças estruturais e funcionais que permitem um desenvolvimento quimioterápico específico contra os sistemas mitocondriais dos parasitas. Em *Leishmania* este processo é essencial para a sua

sobrevivência em comparação com formas sanguíneas. A importância da glicólise é muito menor (Sen et al. 2006 Van Hallemond et al. 1997).

Fármacos em uso ou em ensaio clínico contra leishmaniose como a miltefosina, pentamidina, ou sitamaquina atuam sobre a mitocôndria, já como o único alvo ou como parte de um mecanismo letal multifatorial. Por outro lado, a funcionalidade e a importância da mitocôndria em *Leishmania* se mantem durante todo o seu ciclo celular; tanto em promastigotas como em amastigotas de *Leishmania* (Luque-Ortega et al. 2007).

Uma característica única da mitocôndria, que não ocorre com as outras organelas é o seu elevado potencial eletroquímico negativo, no interior das mitocôndrias, podendo atingir -140 mV em promastigotes *L. donovani* de tal forma que esses fármacos com carga elétrica, acabam sendo permeável a membrana, podendo ser distribuídos em ambos os lados de acordo com a equação de Nernst (Vercesi et al. 1991).

Os íons lipofílicos cumprem os requisitos que permitem a entrada pela membrana sem danificá-la, através de carga elétrica pontual localizada exclusivamente em um átomo, e que está protegido do ambiente polar por grupos hidrofóbicos que impedem tanto a solvatação do íon como a formação de ligações de hidrogênio com outras moléculas vizinhas, desses que deslocam a sua carga por ressonância com outros anéis aromáticos hidrofóbicos, de modo a ficar com pouca densidade de carga em toda a molécula e uma hidrofobicidade suficiente para ser capaz de atravessar a matriz hidrofóbica das membranas (Ruy et al. 2006).

Esta estratégia tem sido utilizada para alcançar uma acumulação mitocondrial seletiva para uma ampla variedade de moléculas, desde fármacos a lipossomas ou peptídeos. Dessa forma, direcionar a busca de fármacos que tenham como principal mecanismo de ação, o metabolismo bioenergético da *Leishmania*, tem sido uma estratégia promissora.

## 1.1. Estrutura-atividade Leishmanicida de benzofenonas

A Benzofenona como um grupo funcional está presente em ambos os produtos naturais e sintéticos. Sua utilização varia desde do componente ativo para protetores solares, a antioxidantes ou agentes antipatogênicos, incluindo também as atividades anti-protozoárias, incluindo a *Leishmania*. Em trabalhos anteriores se demonstraram a capacidade de benzofenonas constituídas de fosfônio atuando como leishmanicidas, especificamente no complexo II mitocondrial. Em Este trabalho se ampliou o seu mecanismo de ação, incluindo outros íons lipofílicos como substituintes de benzofenonas (Kinnamon et al. 1979 Taladriz et al. 2012).

Em nosso estudo foi avaliada a atividade anti-*Leishmania* de 63 compostos sintéticos, utilizando-se ambas as formas do parasita: promastigotas e amastigotas axênicas. Observou-se nesta triagem que 66% dos compostos foram ativos contra promastigotas de *Leishmania*, com valores de  $CE_{50}$  até 15 vezes menores que o fármaco padrão miltefosina. Com exceção dos compostos CDV 27 e CDV 31 (ativos apenas na forma promastigota), todos demonstraram atividade quando testados contra formas amastigotas axênicas. Luque-Ortega e colaboradores (2010) demonstraram também a atividade anti-*Leishmania* de uma série de sais de bifosfônio, com  $CE_{50}$  variando entre 0,97 e 19  $\mu$ M.

Sais de fosfônio vêm sendo bastante explorados como protótipos antiparasitários. Kinnamon et al (1979) relataram pela primeira vez, a atividade *in vivo* de sais de benziltrifenilfosfônio, contra *Trypanosoma rhodesiense*. Compostos derivados de dibrometo de bifosfônio (4,4'-bis ((tri-*n*-pentilfosfônio)metil) benzofenona) também demonstraram atividade anti-*Trypanosoma brucei* (Taladriz et al. 2012). Estudos demonstraram a atividade anti-*T. brucei rhodesiense*, anti-*T. cruzi* e anti- *Leishmania mexicana* de derivados de benziltrifosfônio em modelo experimental *in vivo*. No entanto, informações sobre os possíveis mecanismos letais destes compostos são escassos na literatura.

Entre os compostos que não apresentaram atividade, os compostos EFPL32, AHI04, AHI05, apresentavam como substituinte em R1 e R2 o radical metila (CH<sub>3</sub>). Foi observado também que os compostos que apresentavam como substituintes em R1, R2 e R3, radicais alifáticos de cadeia curta, não demonstraram atividade, sendo estes AHI07, AHI08, AT27, e AT 29. Comparando as estruturas desta série, nota-se que substituintes que conferiram um maior grau de lipofilicidade aos compostos, assim como aumento da massa molecular, resultaram em compostos mais ativos contra *Leishmania*. Esses dados corroboram os estudos de Taladriz e colaboradores (2010), onde relataram uma atividade mais promissora (CE<sub>50</sub> <5µM) de compostos de bifosfônio contendo substituintes fenil contra *Trypanosoma brucei*.

Foi observado também que a introdução do substituinte F conferiu uma ausência de atividade antiparasitária para os compostos AT19 e EFPL3. Sendo o F, o substituinte mais eletronegativo da tabela periódica, sua introdução nos compostos bifosfônio podem ter alterado a distribuição das cargas na molécula. Por outro lado, nossos dados diferem dos dados observados por Taladriz, 2012, onde foi verificado que a presença do F nos compostos bifosfônio contribuiu com o aumento da atividade contra *T. b. brucei*, conferindo valores de CE<sub>50</sub> de até 0,85 µM.

Para explicar esta discrepância, é importante salientar que na forma sanguínea de *Trypanosoma brucei*, a mitocôndria carece de uma cadeia respiratória funcional, ainda que apresente um potencial eletroquímico, atuando inversamente, hidrolizando ATP pela ATP sintase que atua como ATPase para criar um gradiente eletroquímico., pelo qual a presença de alvos alternativos nesse parasita é muito factível (Nolan & Voorheis 1992, Brown et al. 2006).

Dentre os 10 compostos monofosfônicos, 3 não apresentaram atividade frente a *Leishmania*, tanto contra a forma promastigota como para a forma amastigota. Dentre os 7 compostos que apresentaram atividade anti-*Leishmania*, com valores de CE<sub>50</sub> similares aos sais de bifosfônio, todos os compostos monofosfônicos apresentaram uma toxicidade mais elevada

frente aos macrófagos peritoneais quando comparado aos sais de bifosfônio. Esse comportamento também foi observado por Taladriz, 2012, justificando que o fato ao maior de grau de hidrofobicidade destes compostos monofosfônio, conferindo um maior acesso ao interior dos macrófagos e elevando a toxicidade. Sendo assim, este fato poderia ser uma justificativa para a ausência de atividade dos compostos bifosfônio frente aos macrófagos infectados, que apesar de demonstrarem valores baixos de  $CE_{50}$  contra os parasitas axênicos, podem ter encontrado maior dificuldade para a entrada no interior dos macrófagos. Uma alternativa para aumentar a atividade de compostos e reduzir toxicidade seria a utilização de sistemas de direcionamento de fármacos, como os lipossomos, o encapsulamento em nanopartículas. Tempone e colaboradores (2005) demonstraram que o antimônio pentavalente quando encapsulado em lipossomos contendo fosfatidilserina foi cerca de 16 vezes mais ativo quando comparado ao fármaco livre. Sendo assim, sistemas de liberação controlada poderiam facilitar a entrada dos compostos de fosfônio no interior dos macrófagos.

Na série de compostos amônios/piridínicos e quinolínicos o ponto em comum é a substituição do elemento P (fósforo) por N (nitrogênio). Dos 14 compostos 2 compostos foram ativos frente a *L. donovani*, porem estes compostos foram tóxicos em macrófagos peritoneais. Em trabalhos com fármacos com atividade anti-*Leishmania*, relacionam a atividade desses compostos com o elemento N, no nosso trabalho não observamos essa associação, apenas foi observado com o elemento P (Mesquita et al. 2013, Mesquita et al. 2014).

Com base nos índices de seletividade foram selecionados 4 compostos sendo cerca de 5 vezes mais ativo que o fármaco padrão miltefosina, a qual apresentou um valor de  $CE_{50}$  de 12,50  $\mu$ M (Luque-Ortega et al. 2010).

Em nosso estudo, observamos na forma promastigota, que quando a razão entre a  $CE_{50}$  /  $CI_{50}$  foi próxima ou superior a 1, o dano ao parasita é irreversível. Sendo assim, considerou-se que não houve recuperação do promastigota após 72 h de incubação, mostrando que o dano letal ocorreu

nas 4 horas iniciais de incubação. Isso foi observado no composto EFPL11 onde a razão foi de 0,92. Os demais compostos apresentaram valores  $CE_{50}/CI_{50}$  de 0,21, 0,40 e 0,29 (EFPL6, EFPL8 e AHI09 respectivamente), sugerindo um efeito reversível no promastigota. Já quando os 4 compostos selecionados foram incubados com as formas amastigotas axênicas, foi observado esse efeito irreversível, fato este possivelmente explicado pela diferenças metabólicas entre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (Chicharro et al. 2001). Apesar dos compostos terem exercido um efeito predominantemente reversível contra as formas promastigotas da espécie *L. donovani*, nas espécies *L. infantum* o comportamento foi similar a *L. donovani*, porem na *L. major*, espécie responsável pela forma cutânea da Leishmaniose, o comportamento foi inverso ao encontrado nas outras cepas. O composto EFPL11 teve um efeito reversível enquanto os outros compostos tiveram um efeito irreversível. Essas diferenças de comportamento entre as espécies de *Leishmania* já foram reladas em diversos estudos (Tempone et al. 2009, Reimao et al. 2010, Reimao et al. 2011).

Comparada com outros microrganismos, a produção de ATP na *Leishmania* é empregada para a manutenção do potencial da membrana (Ter Kuile & Opperdoes 1993). No ensaio de bioluminescência, utilizando a cepa 3-Luc, responsável por medir as variações de ATP (Luque-Ortega et al. 2001), observou-se que os compostos EFPL6 e EFPL11 resultaram em uma diminuição da intensidade de luminescência em 80% após 25 minutos de incubação (concentração de 6 X o valor da  $CE_{50}$ ), enquanto o EFPL8 e AHI09, foi observada uma redução de 60%. Essa queda de luminescência poderia ser devida a uma permeabilização da membrana plasmática, com a saída de ATP, pela despolarização da membrana plasmática ou pela perda dos gradientes iônicos através dela, obrigando as bombas iônicas a uma hidrólise massiva de ATP com o objetivo de recuperar os valores perdidos ou mesmo, uma inibição da síntese de ATP em *Leishmania* que é essencialmente mitocondrial (Luque-Ortega et al. 2001).

A estratégia consistiu em estudar ambas as hipóteses, para documentar a permeabilização da membrana plasmática se utilizou a sonda SYTOX Green, nossos dados confirmaram a hipótese de que a diminuição dos níveis de ATP, observada anteriormente em 30 minutos de incubação, não era devido ao surgimento de poros na membrana plasmática. Compostos que causam diminuição nos níveis de ATP devido a uma perturbação da membrana plasmática, ocasionam reduções dos sinais fluorescência de até 80% em tempos de 20 minutos de incubação, e em concentrações próximas aos seus valores de  $CE_{50}$  (Luque-Ortega et al. 2008, Fernández-Reyes 2010). Portanto, esses resultados sugerem uma ação na mitocôndria do parasita, sítio responsável pela produção de ATP.

Para verificar o efeito sobre a mitocôndria, utilizou-se a sonda Rodamina-123, um cátion lipofílico cuja acumulação está associada à presença de um gradiente eletroquímico na membrana mitocondrial, essencial para a síntese de ATP. Na presença dos 4 compostos, onde pode-se observar uma despolarização da membrana mitocondrial superior ao grupo tratado com KCN (atua inibindo a cadeia respiratória). Desta forma, notou-se que a capacidade de acúmulo de Rodamina foi de 24,46% em relação às células não tratadas, ou seja, com o potencial de membrana normal, enquanto para as células tratadas com os compostos, foi de até 4,91%. Estes dados sugerem um dano na fosforilação oxidativa e sugere um acúmulo desses compostos na mitocôndria, ocasionando uma ação letal, como também observado por Luque-Ortega e colaboradores (2010), quando estudou benzofenonas similares. Indicando uma rápida ação desses compostos, causando pela acumulação rápida na mitocôndria, medida pelo potencial eletroquímico do mesmo (Vercesi et al. 1991).

Uma vez confirmado que os compostos inibiam a síntese de ATP e diminuíam o potencial eletroquímico da mitocôndria, necessário para o mesmo, buscou-se identificar o complexo da cadeia respiratória que estes compostos poderiam estar inibindo. Por meio do ensaio que monitorou o consumo de oxigênio nos parasitas, foi possível observar em 20 minutos, uma queda de consumo de oxigênio de 20% a 35%, Para o estudo do sítio

de ação na cadeia respiratória, a utilização de digitonina na concentração adequada, foi essencial, permitindo a permeação das substâncias na membrana plasmática dos promastigotas, sem, contudo alterar a integridade da membrana interna mitocondrial (Vercesi et al. 1991). Este efeito é devido à afinidade da digitonina por esteróis em membranas celulares, uma vez que a proporção de esterol / fosfolípido na membrana plasmática é elevada, sendo ausente na membrana mitocondrial (Fiskum & Lehninger 1980).

O consumo de  $O_2$  dos parasitas na presença dos substratos e inibidores específicos da cadeia respiratória determinou que um dos alvos dos compostos, foi o complexo II da cadeia de transporte de elétrons. Estes dados foram corroborados por nossos estudos utilizando o ensaio enzimático com a fração mitocondrial. Além disso, compostos que atuam no complexo II da mitocôndria de tripanossomatídeos tem sido valorizados como potenciais candidatos a fármacos (Chen et al. 2001, Vieites et al. 2008)

A enzima succinato desidrogenase, é uma enzima fundamental no ciclo de Krebs. Essa enzima localiza-se na membrana interna da mitocôndria, enquanto todas as demais enzimas do Ciclo de Krebs são encontradas na matriz mitocondrial. A succinato-desidrogenase é uma flavoproteína, ou seja, quando participa em processos oxidativos, o FAD será reduzido a  $FADH_2$ , assim a reação catalisada pela succinato-desidrogenase, resulta na oxidação do succinato à fumarato. Por meio do  $FADH_2$  reduzido, a succinato-desidrogenase fornece elétrons para a cadeia respiratória (fosforilação oxidativa). Essa doação de elétrons é mediada por um transportador de elétrons de natureza lipídica, a ubiquinona, transformando-se em ubiquinol. Em nosso estudo, utilizamos como inibidor o malonato, que por apresentar similaridades estruturais com o succinato (análogo estrutural), atua como inibidor competitivo da succinato-desidrogenase (Van Hellemond & Tielens 1997, Chen et al. 2001, Besteiro et al. 2002, Denicola et al. 2002, Coustou et al. 2005). O papel desta enzima como um produtor de succinato em *Leishmania* é vital, considerando que este metabólito é doador de elétrons primário da cadeia respiratória do



parasita e assim, o principal substrato oxidável para a fosforilação oxidativa em *Leishmania*, já que o complexo I, a outra possibilidade fonte de ubiquinona reduzida, tem uma atividade nula em *Leishmania* respeito ao potencial eletroquímico mitocondrial e a atividade de  $\alpha$ -glicerofosfato desidrogenase, que também gera ubiquinona reduzida, é muito inferior ao succinato desidrogenase (Van Hellemond & Tielens 1997).

Por meio dos inibidores específicos de cada complexo, nossos dados sugerem que uma ação no complexo II da cadeia respiratória, desestabilizando a produção de ATP, levando a célula a supressão energética e morte celular. Esses dados são corroborados por nossos estudos em microscopia eletrônica de transmissão, onde observou-se danos ultraestruturais consideráveis na mitocôndria, efeito também observado por compostos da mesma classe por Luque-Ortega, 2010. Sendo que o composto EFPL8 foi que ocasionou um inchaço maior, ocupando mais da metade do corpo do parasita. Além disso, nossos estudos em microscopia confocal, confirmaram a alteração mitocondrial, dado pela uma diferença qualitativa encontrada no grupo de parasitas tratados com os compostos e os não tratados.

O acúmulo de cátions lipofílicos na mitocôndria podem levar a uma disfunção mitocondrial, e conseqüentemente, acionar o processo de morte celular programada, fato este observado em Tripanossomatídeos (Debrabant et al. 2003, Debrabant & Nakhasi 2003, Ouaisi 2003), incluindo *Leishmania* (Barcinski & DosReis 1999, de Freitas Balanco et al. 2001, Debrabant et al. 2003, Debrabant & Nakhasi 2003). Recentemente, foi sugerido que a miltefosina induz a morte celular programada em *L. donovani* (Paris et al. 2004). Nossos estudos demonstraram que os compostos EFPL6, EFPL11 e AHI09 resultaram em um sinal de fluorescência de até 20,8% na população Sub G1 em relação à miltefosina (controle positivo), a qual apresentou um sinal de 11,3%. Mesmo em uma concentração 7x superior ao valor de CE<sub>50</sub>, o composto EFPL8 não induziu modificações significativas na população Sub G1, indicando que, apesar de seu acúmulo na mitocôndria, o composto não resultou em ativação dos processos de morte celular programada.

## 1.2. Fármaco buparvaquona

A estratégia de reposicionamento de fármacos vem sendo uma abordagem amplamente utilizada. Encontrar novas indicações terapêuticas para um fármaco aprovado no mercado, reduz o tempo e o custo das pesquisas (Ekins et al. 2011). O exemplo da eficácia dessa técnica é o reposicionamento da miltefosina, desenvolvida inicialmente para o tratamento do câncer de mama e hoje utilizada para o tratamento da leishmaniose (Sundar et al. 2002). Outros exemplos são a pentamidina, um hipoglicemiante, assim como a anfotericina B e os azóis, usado no tratamento de infecções fúngicas que hoje tiveram seu uso direcionado para o tratamento da leishmaniose (Croft et al. 2006).

Coletar e disponibilizar ao público o máximo de dados possível sobre o perfil e alvo dos fármacos oferece oportunidades para redefinição do seu uso. O estudo do mecanismo de ação e a compreensão de um fármaco no reposicionamento são de suma importância (Oprea & Mestres 2012). A miltefosina apresenta mais de um sítio de ação na *Leishmania*, porém, somente dois sítios de ação estão perfeitamente descritos, isso demonstra a importância de trabalhos sobre o mecanismo e a importância de estudos com futuro fármacos de reposicionamento (Luque-Ortega & Rivas 2007, Luque-Ortega et al. 2012). Portanto, quanto mais estudo forem realizados, mais podemos entender e prever futuros problemas na proposição dessa reposição.

A buparvaquona é uma naftoquinona, e as naftoquinonas são conhecidas pela sua atividade antimicrobiana e propriedades fungicidas (Kaneshiro et al. 2001). Porém as naftoquinonas são pouco solúveis em água por serem moléculas lipofílicas (Mantyla et al. 2004, Guo et al. 2012). Naftoquinonas também são encontradas na natureza; plantas da ordem Caryophyllales produzem diversos derivados (Guo et al. 2012).

A BPQ foi desenvolvida na década de 80, desde então vem sendo utilizada para o tratamento veterinário da Theleriose tropical (McHardy et al. 1985). Na literatura existem trabalhos que propõem o uso da buparvaquona no tratamento de cães com leishmaniose. No trabalho de Vexenat e

colaboradores (1998) foram estudados a atividade em 7 cães com leishmaniose, porém, os resultados não foram promissores, não havendo redução da carga parasitária nesse estudos (Vexenat et al. 1998). Segundo alguns autores a baixa atividade *in vivo* deste composto é consequência de sua baixa hidrossolubilidade (<1mg/L em água), o que compromete a sua biodisponibilidade (Muller & Jacobs 2002).

Estudos recentes propõem formulações lipossomais para melhorar a atividade do fármaco *in vivo* (Reimao et al. 2012). Porém, poucos trabalhos foram publicados sobre a atividade do fármaco. Luque-Ortega e colaboradores em 2001 observaram a alteração dos níveis de ATP de *Leishmania* spp. de 15 naftoquinonas e entre elas, o fármaco buparvaquona.

No presente trabalho a buparvaquona apresentou um valor de  $CE_{50}$  de 0,04  $\mu$ M em *L. donovani*, enquanto o fármaco padrão miltefosina, apresentou um valor de  $CE_{50}$  de 12,50  $\mu$ M; assim, a buparvaquona demonstrou ser aproximadamente 300 vezes mais ativa que a miltefosina. Na espécie *L. infantum* o valor foi similar ( $CE_{50}$  0,03  $\mu$ M) àqueles relatados em outros estudos (Croft et al. 1992, Luque-Ortega et al. 2001, Mantyla et al. 2004).

Nossos dados demonstraram que a BPQ não apresentou toxicidade para macrófagos de linhagem tumoral (Raw 264.7) e macrófagos peritoneais de camundongos, resultando assim, em um índice de seletividade (IS) maior que 125. Nossos dados corroboram os dados obtidos por Reimão e colaboradores (2012), onde foi observado um IS maior que 150.

A relação entre os valores de inibição de curto prazo e proliferação, ou seja,  $CE_{50} / CI_{50}$  foram superiores a 1, sugerindo que o dano celular tenha sido irreversível. O valor de  $CI_{50}$  foi 113 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  para a espécie de *L. infantum*; esse padrão também se repetiu para a espécie *L. donovani*, sugerindo uma ação de leishmanioestática quando o fármaco foi incubado pelo período de 4 horas. Porém, uma ação leishmanicida foi observada quando a BPQ foi incubada por um tempo superior a 4 horas, conforme observado pelo valor de  $CE_{50b}$  (72 h), que se apresentou 33 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$  (4h). Reimão e

colaboradores (2012) observaram que entre 24 e 72 horas não houve variação dos valores de  $CE_{50}$ , assim, possivelmente a ação desse fármaco deve ocorrer entre 4h a 24h.

A ação letal mais prolongada do fármaco também foi corroborada pelos nossos dados de bioluminescência com a cepa *L. donovani* 3Luc. Na leitura após 30 minutos, observou-se apenas uma queda 20% no sinal de luminescência a uma concentração de 0,1  $\mu$ M (2,5 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$ ). O mesmo experimento realizado após 4 h de incubação na mesma concentração demonstrou uma queda de sinal de 50%, corroborando os dados obtidos por Luque-Ortega (2001).

Nossos dados indicaram que a buparvaquona não afetou a permeabilidade da membrana plasmática. No experimento de permeabilização com a sonda fluorescente SYTOX Green, não se observou aumento do sinal de fluorescência, mesmo quando se utilizou diferentes tempos de incubação e uma concentração 100 vezes maior que o valor de  $CE_{50}$ . Assim, a diminuição dos níveis de ATP observados com queda da luminescência, pôde ser correlacionada a uma ação do fármaco na mitocôndria do parasita, ainda que com respeito às benzofenonas estudadas anteriormente, a aquisição de um nível tóxico para o parasita mais lentamente.

Para se estudar uma possível ação do fármaco na mitocôndria, utilizou-se a sonda Rodamina-123, um fluoróforo que se acumula em membranas mitocondriais intactas. Nossos dados demonstraram que na concentração mais elevada (3  $\mu$ M), houve um acúmulo de 18% da sonda, enquanto que na célula tratada com o KCN, o acúmulo foi de 48%. Assim, observou-se que a taxa de acúmulo da sonda na mitocôndria pôde ser relacionado a um evento dose dependente do fármaco. Ainda, quando comparamos as taxas de acúmulo entre as concentrações de 0,25  $\mu$ M a 0,75  $\mu$ M, observou-se que a queda foi de 16%, enquanto entre as concentrações seguintes (> 0.75  $\mu$ M), não houve diferença significativa em relação a taxa de acúmulo da sonda. Estes dados sugerem que a BPQ causa uma despolarização do potencial de membrana mitocondrial e ainda,

que a concentração máxima de 0,75  $\mu\text{M}$  é suficiente para interferir neste potencial.

Na busca do sítio de ação na mitocôndria, foi realizado o monitoramento dos níveis de consumo de oxigênio com a adição de inibidores e substratos da cadeia respiratória. Nossos dados demonstraram uma ação da buparvaquona na mitocôndria da *Leishmania*, sugerindo o complexo III, denominado Coenzima Q-Citocromo C oxidoredutase, ou Citocromo  $\text{bc}_1$ , como o alvo do fármaco. Segundo Morello e colaboradores, naftoquinonas inibem a respiração celular (Morello et al. 1995). A atovaquona, uma hidroxinaftoquinona relacionada à buparvaquona, vendida comercialmente com o nome de Wellvone, é usada no tratamento do protozoário *Cryptosporidium parvum*. Foi relatada sua capacidade de se ligar irreversivelmente no citocromo b no complexo  $\text{bc}_1$  dentro das mitocôndrias, interrompendo dessa forma o transporte de elétrons e inibindo a fosforilação oxidativa e da síntese de ATP do *C. parvum* (Cushion et al. 2000, Kaneshiro et al. 2000, Kaneshiro et al. 2006). Em *Plasmodium* também foi observada a ação de hidroxinaftoquinonas no complexo III da cadeia respiratória (Ellis 1994). Trabalhos que relatam a resistência a BPQ também relacionam a mutações no gene do citocromo b do parasita em *Theileria annulata*, como possíveis causadores da resistência desse parasita ao fármaco buparvaquona (Sharifiyazdi et al. 2012). Assim, sugere-se que a BPQ atue na *Leishmania* de forma similar ao fármaco atovaquona em *Plasmodium* e *Cryptosporidium parvum*; além disso, sua ação na *Leishmania* pode estar também relacionada àquela observada pelo fármaco na *Theileria*.

A função do complexo III da mitocôndria é permitir que uma molécula de  $\text{CoQH}_2$  reduza duas moléculas do citocromo por meio de uma bifurcação do fluxo de elétrons da  $\text{CoQH}_2$  para os citocromos c1 e b, permitindo o bombeamento de prótons da matriz para o espaço intermembrana. A  $\text{CoQH}_2$  transfere um dos elétrons para a proteína Fe-S liberando dois prótons no espaço intermembrana e produzindo a  $\text{CoQ}^-$ . A proteína Fe-S reduz o citocromo c1, enquanto a  $\text{CoQ}^-$  transfere os elétrons restantes para o citocromo b, produzindo uma  $\text{CoQ}$  oxidada. A  $\text{CoQ}$  oxidada

recebe o elétron novamente do citocromo b, revertendo à forma CoQ- (Salvador 2003).

Nossos estudos ultraestruturais, assim como em microscopia confocal, confirmaram a ação da BPQ na mitocôndria da *Leishmania*. Os danos na região do cinetoplasto, assim como a alteração do potencial de membrana mitocondrial, confirmam a ação da BPQ na mitocôndria, efeito este, também observado por outros compostos que atuam na mitocôndria, com uma morfologia semelhante a outros compostos leishmanicidas que atuam na mitocôndria (Luque-Ortega, 2010).

Como já citado anteriormente, compostos que atuam na mitocôndria podem levar a uma disfunção desta organela, podendo acionar o processo de morte celular programada (Debrabant et al. 2003, Debrabant & Nakhasi 2003, Ouaisi 2003). Porém, nossos estudos em citometria de fluxo não sugeriram que a BPQ induza um processo de morte celular programada (apoptose-like) na *Leishmania*, devido a não formação de populações Sub-G1 em diferentes tempos de incubação. Porém, em células CD8+ e linfócitos infectados com *Theileria*, a BPQ induziu um processo de apoptose por meio da ativação da enzima caspase 9 e caspase 3 (Guergnon et al. 2003).

O estudo do mecanismo de ação de fármacos pode contribuir com importantes dados para a identificação de novas rotas de morte celular, possibilitando ainda, o desenho de fármacos mais seletivos. Antes de se propor novas alternativas para o tratamento da leishmaniose é preciso se intensificar os estudos dos possíveis mecanismos de ação de novos compostos, assim como de fármacos existentes no mercado. Nosso trabalho corrobora a importância dos estudos de mecanismo de ação, pois apresentando a *Leishmania* uma única mitocôndria, a buparvaquona torna-se um excelente candidato a fármaco, uma vez que sua ação está diretamente relacionada a esta organela.

Em resumo o presente trabalho demonstrou a importância do metabolismo energético de *Leishmania* como um alvo terapêutico de novas fármacos e a importância do estudo de mecanismos de ação permitindo a otimização de novas gerações de fármacos com base em modelos e

estruturas de complexos supramoleculares da cadeia respiratória. Bem como ferramentas de modelagem molecular cada vez mais poderosas, para inferir diferenças estruturais nos parasita, permitindo a ancoragem e realizando uma síntese dirigida .

Abrindo perspectivas futuras de confirmação experimental, já iniciada, e cujo desenvolvimento vai continuar nos anos seguintes.

## **CONCLUSÃO**



- Entre os 63 compostos sintetizados, observou atividade anti-*Leishmania* de 42 compostos em *L. donovani*
- A citotoxicidade foi determinada em células de mamífero e foi observado índices de seletividade entre 29 e > 41.
- Foram escolhidos 4 compostos com atividade anti-*Leishmania* em concentrações de micromolar sobre promastigotas de *Leishmania donovani* e sobre amastigotas axênicos de *L. pifanoi*; os compostos EFPL6, EFPL8, EFPI11 e AHI09 apresentaram os maiores índices de seletividade e foram selecionados para o estudo de mecanismo de ação.
- Os 4 compostos sintetizados alteraram os níveis de ATP intracelular em *L. donovani*, mas não ocasionaram nenhum dano na membrana plasmática, sendo essa alteração ocasionada pela inibição do complexo II da cadeia respiratória
- Dos 4 compostos, 3 compostos (EFPL6, EFPL11 e AHI09) induziram alterações do ciclo celular.
- O fármaco buparvaquona apresentou os menores valores de CE<sub>50</sub>, variando de 0,03 a 0,8 µM em *Leishmania*.
- Com base nos estudos de citotoxicidade, observou-se um índice de seletividade >125 para a buparvaquona.
- O fármaco buparvaquona alterou os níveis de ATP intracelular, porém não ocasionou alteração da permeabilidade da membrana plasmática.
- As alterações dos níveis de ATP induzidas pela buparvaquona foram demonstradas por inibição do complexo III da cadeia respiratória.
- Os estudos de microscopia confocal demonstram alterações do potencial de membrana mitocondrial, induzidas tanto pelos 4 compostos sintéticos quanto pelo fármaco buparvaquona.
- Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão demonstraram significativas alterações no cinetoplasto de promastigotas de *L. donovani* tanto para os 4 compostos sintéticos em *L. infantum* quanto para o fármaco buparvaquona.
- O fármaco buparvaquona não induziu alterações no ciclo celular do parasita.

- Estes estudos poderiam auxiliar a descoberta de novas rotas de morte celular da *Leishmania*, contribuindo na seleção de novos fármacos para leishmaniose.

## **REFERÊNCIAS**

Alberio, S. O., S. S. Dias, F. P. Faria, R. A. Mortara, C. L. Barbieri e E. Freymuller Haapalainen. "Ultrastructural and cytochemical identification of megasome in Leishmania (Leishmania) chagasi." Parasitol Res (2004).**92**(3): 246-254.

Alencar, J. E. e J. Neves. Leishmaniose Visceral (calazar) In: Doenças Infecciosas e Parasitárias., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan;.( 1982).

Alvar, J., S. Croft e P. Olliaro. "Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis." Adv Parasitol (2006).**61**: 223-274.

Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, M. den Boer e W. H. O. L. C. Team. "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One (2012).**7**(5): e35671.

Amaral, P. A., G. Neves, F. Farias e V. L. Eifler-Lima. "Química Combinatória: moderna ferramenta para a obtenção de candidatos a protótipos de novos fármacos." Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences (2003).**39**: 4.

Ashburn, T. T. e K. B. Thor. "Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs." Nat Rev Drug Discov (2004).**3**(8): 673-683.

Bajorath, J. "Integration of virtual and high-throughput screening." Nat Rev Drug Discov (2002).**1**(11): 882-894.

Banuls, A. L., M. Hide e F. Prugnolle. "Leishmania and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans." Adv Parasitol (2007).**64**: 1-109.

Barcinski, M. A. e G. A. DosReis. "Apoptosis in parasites and parasite-induced apoptosis in the host immune system: a new approach to parasitic diseases." Braz J Med Biol Res (1999).**32**(4): 395-401.

Beetham, J. K., K. S. Myung, J. J. McCoy, M. E. Wilson e J. E. Donelson. "Glycoprotein 46 mRNA abundance is post-transcriptionally regulated during development of Leishmania chagasi promastigotes to an infectious form." J Biol Chem (1997).**272**(28): 17360-17366.

Bermudez, R., F. Dagger, J. A. D'Aquino, G. Benaim eK. Dawidowicz. "Characterization of mitochondrial electron-transfer in *Leishmania mexicana*." Mol Biochem Parasitol (1997).**90**(1): 43-54.

Besteiro, S., M. Biran, N. Biteau, V. Coustou, T. Baltz, P. Canioni eF. Bringaud. "Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase." J Biol Chem (2002).**277**(41): 38001-38012.

Bleicher, K. H., H. J. Bohm, K. Muller eA. I. Alanine. "Hit and lead generation: beyond high-throughput screening." Nat Rev Drug Discov (2003).**2**(5): 369-378.

Blum, J. J. "Intermediary metabolism of *Leishmania*." Parasitol Today (1993).**9**(4): 118-122.

Brown, S. V., P. Hosking, J. Li eN. Williams. "ATP synthase is responsible for maintaining mitochondrial membrane potential in bloodstream form *Trypanosoma brucei*." Eukaryot Cell (2006).**5**(1): 45-53.

Burchmore, R. J. eS. M. Landfear. "Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*." J Biol Chem (1998).**273**(44): 29118-29126.

Carvalho, L., J. R. Luque-Ortega, C. Lopez-Martin, S. Castanys, L. Rivas eF. Gamarro. "The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase." Antimicrob Agents Chemother (2011).**55**(9): 4204-4210.

Carvalho, L., J. R. Luque-Ortega, J. I. Manzano, S. Castanys, L. Rivas eF. Gamarro. "Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets leishmania respiratory complex III and induces apoptosis." Antimicrob Agents Chemother (2010).**54**(12): 5344-5351.

Cavalier-Smith, T. "A revised six-kingdom system of life." Biol Rev Camb Philos Soc (1998).**73**(3): 203-266.

Chen, D. Q., B. K. Kolli, N. Yadava, H. G. Lu, A. Gilman-Sachs, D. A. Peterson eK. P. Chang. "Episomal expression of specific sense and antisense mRNAs in *Leishmania amazonensis*: modulation of gp63 level in promastigotes and their infection of macrophages in vitro." Infect Immun (2000).**68**(1): 80-86.

Chen, M., L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander eA. Kharazmi. "Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones." Antimicrob Agents Chemother (2001).**45**(7): 2023-2029.

Chicharro, C., C. Granata, R. Lozano, D. Andreu eL. Rivas. "N-terminal fatty acid substitution increases the leishmanicidal activity of CA(1-7)M(2-9), a cecropin-melittin hybrid peptide." Antimicrob Agents Chemother (2001).**45**(9): 2441-2449.

Coombs, G. H., L. Tetley, V. A. Moss eK. Vickerman. "Three dimensional structure of the *Leishmania* amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections." Parasitology (1986).**92** ( Pt 1): 13-23.

Cota, G. F., M. R. de Sousa eA. Rabello. "Predictors of visceral leishmaniasis relapse in HIV-infected patients: a systematic review." PLoS Negl Trop Dis (2011).**5**(6): e1153.

Coustou, V., S. Besteiro, L. Riviere, M. Biran, N. Biteau, J. M. Franconi, M. Boshart, T. Baltz eF. Bringaud. "A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*." J Biol Chem (2005).**280**(17): 16559-16570.

Croft, S. L. eG. H. Coombs. "Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs." Trends Parasitol (2003).**19**(11): 502-508.

Croft, S. L., J. Hogg, W. E. Gutteridge, A. T. Hudson eA. W. Randall. "The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*." J Antimicrob Chemother (1992).**30**(6): 827-832.

Croft, S. L., K. Seifert eV. Yardley. "Current scenario of drug development for leishmaniasis." Indian J Med Res (2006).**123**(3): 399-410.

Cupolillo, E., G. Grimaldi, Jr. eH. Momen. "A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy." Am J Trop Med Hyg (1994).**50**(3): 296-311.

Cushion, M. T., M. Collins, B. Hazra eE. S. Kaneshiro. "Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on the cellular ATP of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*." Antimicrob Agents Chemother (2000).**44**(3): 713-719.

Dardonville, C. eR. Brun. "Bisguanidine, bis(2-aminoimidazoline), and polyamine derivatives as potent and selective chemotherapeutic agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Synthesis and in vitro evaluation." J Med Chem (2004).**47**(9): 2296-2307.

de Freitas Balanco, J. M., M. E. Moreira, A. Bonomo, P. T. Bozza, G. Amarante-Mendes, C. Pirmez eM. A. Barcinski. "Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity." Curr Biol (2001).**11**(23): 1870-1873.

Debrabant, A., N. Lee, S. Bertholet, R. Duncan eH. L. Nakhasi. "Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms." Int J Parasitol (2003).**33**(3): 257-267.

Debrabant, A. eH. Nakhasi. "Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest?" Kinetoplastid Biol Dis (2003).**2**(1): 7.

Denicola, A., H. Rubbo, L. Haden eJ. F. Turrens. "Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol (2002).**133**(1): 23-27.

Desjeux, P. "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol (1996).**14**(5): 417-423.

Diaz-Achirica, P., J. Ubach, A. Guinea, D. Andreu eL. Rivas. "The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide." Biochem J (1998).**330** ( Pt 1): 453-460.

Dietze, R., S. F. Carvalho, L. C. Valli, J. Berman, T. Brewer, W. Milhous, J. Sanchez, B. Schuster eM. Grogl. "Phase 2 trial of WR6026, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*." Am J Trop Med Hyg (2001).**65**(6): 685-689.

DNDi, D. f. N. D. i. (2014). "Visceral Leishmaniasis: Tratamentos atuais." Retrieved 01/02/2014, 2014, from <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/leishmaniose-visceral/tratamentos-atuais.html>.

Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen eP. J. de Vries. "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." J Antimicrob Chemother (2012).**67**(11): 2576-2597.

Ekins, S., A. J. Williams, M. D. Krasowski eJ. S. Freundlich. "In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases." Drug Discov Today (2011).**16**(7-8): 298-310.

Ellis, J. E. "Coenzyme Q homologs in parasitic protozoa as targets for chemotherapeutic attack." Parasitol Today (1994).**10**(8): 296-301.

Emaus, R. K., R. Grunwald eJ. J. Lemasters. "Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties." Biochim Biophys Acta (1986).**850**(3): 436-448.

Ernest, I., M. Callens, F. R. Opperdoes eP. A. Michels. "Pyruvate kinase of *Leishmania mexicana mexicana*. Cloning and analysis of the gene, overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the enzyme." Mol Biochem Parasitol (1994).**64**(1): 43-54.

Fernandes Rodrigues, J. C., J. L. Concepcion, C. Rodrigues, A. Caldera, J. A. Urbina eW. de Souza. "In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects." Antimicrob Agents Chemother (2008).**52**(11): 4098-4114.

Fernández-Reyes, M. Bases Moleculares de Actividad y Resistencia de Péptidos Membrano-Activos en Procariontes. Comparación con *Leishmania* como Modelo Eucariota., Universidad Complutense de Madrid; (2010).

Fidalgo, L. M. eL. Gille. "Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs." Pharm Res (2011).**28**(11): 2758-2770.

Fiskum, G. eA. L. Lehninger. "The mechanisms and regulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport." Fed Proc (1980).**39**(7): 2432-2436.

Fumarola, C. eG. G. Guidotti. "Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death." Apoptosis (2004).**9**(1): 77-82.

Genaro, O. Leishmaniose Visceral Americana. In: Parasitologia Humana. São Paulo, Atheneu.(2003).



Gokhale, N. H., S. B. Padhye, S. L. Croft, H. D. Kendrick, W. Davies, C. E. Anson eA. K. Powell. "Transition metal complexes of buparvaquone as potent new antimalarial agents. 1. Synthesis, X-ray crystal-structures, electrochemistry and antimalarial activity against Plasmodium falciparum." J Inorg Biochem (2003).**95**(4): 249-258.

Goldman, L. "Pre-Columbian leishmaniasis." Arch Dermatol (1983).**119**(7): 540.

Guernon, J., F. Dessauge, G. Langsley eA. Garcia. "Apoptosis of Theileria-infected lymphocytes induced upon parasite death involves activation of caspases 9 and 3." Biochimie (2003).**85**(8): 771-776.

Guha-Niyogi, A., D. R. Sullivan eS. J. Turco. "Glycoconjugate structures of parasitic protozoa." Glycobiology (2001).**11**(4): 45R-59R.

Guo, J., W. Song, F. Ding, J. Zhang eZ. Sun. "Study on cytotoxicity and structure-activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones." Environ Toxicol Pharmacol (2012).**33**(3): 408-413.

Hart, D. T., K. Vickerman eG. H. Coombs. "Respiration of Leishmania mexicana amastigotes and promastigotes." Mol Biochem Parasitol (1981).**4**(1-2): 39-51.

Hill, G. C. "Electron transport systems in kinetoplastida." Biochim Biophys Acta (1976).**456**(2): 149-193.

Ilg, T., D. Harbecke eP. Overath. "The lysosomal gp63-related protein in Leishmania mexicana amastigotes is a soluble metalloproteinase with an acidic pH optimum." FEBS Lett (1993).**327**(1): 103-107.

Kaneshiro, E. S., M. Basselin, S. Merali eO. Kayser. "Ubiquinone synthesis and its regulation in Pneumocystis carinii." J Eukaryot Microbiol (2006).**53**(6): 435-444.

Kaneshiro, E. S., D. Sul, M. Basselin eO. Kayser. "Pneumocystis carinii synthesizes four ubiquinone homologs: inhibition by atovaquone and buparvaquone but not by stigmatellin." J Eukaryot Microbiol (2001).**Suppl**: 172S-173S.

Kaneshiro, E. S., D. Sul eB. Hazra. "Effects of atovaquone and diospyrin-based drugs on ubiquinone biosynthesis in *Pneumocystis carinii* organisms." Antimicrob Agents Chemother (2000).**44**(1): 14-18.

Kayser, O., W. R. Waters, K. M. Woods, S. J. Upton, J. S. Keithly eA. F. Kiderlen. "Evaluation of in vitro activity of aurones and related compounds against *Cryptosporidium parvum*." Planta Med (2001).**67**(8): 722-725.

Korolkovas, A. Química Farmacêutica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.(1982).

Lainson, R. eE. F. Rangel. "Lutzomyia longipalpis and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review." Mem Inst Oswaldo Cruz (2005).**100**(8): 811-827.

Lainson, R. eJ. J. Shaw. "Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. ." Nature. ( 1978). **273**: 595-600.

Lesnefsky, E. J., S. Moghaddas, B. Tandler, J. Kerner eC. L. Hoppel. "Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure." J Mol Cell Cardiol (2001).**33**(6): 1065-1089.

Lincoln, L. M., M. Ozaki, J. E. Donelson eJ. K. Beetham. "Genetic complementation of *Leishmania* deficient in PSA (GP46) restores their resistance to lysis by complement." Mol Biochem Parasitol (2004).**137**(1): 185-189.

Lindoso, J. A., P. C. Cotrim eH. Goto. "Apoptosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis." Int J Parasitol (2004).**34**(1): 1-4.

Liu, B., Y. Liu, S. A. Motyka, E. E. Agbo eP. T. Englund. "Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA." Trends Parasitol (2005).**21**(8): 363-369.

Lodge, R. eA. Descoteaux. "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*." Clin Immunol (2005).**114**(3): 256-265.

Lodge, R. eA. Descoteaux. "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. ." Clinical immunology (2005).**Fla 114** 256-265.

Loeffler, M. eG. Kroemer. "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." Exp Cell Res (2000).**256**(1): 19-26.

Lotrowska, M. eC. Zackiewscz. "Pesquisas Negligenciam Doenças de Populações Pobres. ." Ser Médico (2005 ).**3**: 10-13.

Luque-Ortega, J. R., B. G. de la Torre, V. Hornillos, J. M. Bart, C. Rueda, M. Navarro, F. Amat-Guerri, A. U. Acuna, D. Andreu eL. Rivas. "Defeating Leishmania resistance to miltefosine (hexadecylphosphocholine) by peptide-mediated drug smuggling: a proof of mechanism for trypanosomatid chemotherapy." J Control Release (2012).**161**(3): 835-842.

Luque-Ortega, J. R., P. Reuther, L. Rivas eC. Dardonville. "New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II." J Med Chem (2010).**53**(4): 1788-1798.

Luque-Ortega, J. R. eL. Rivas. "Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes." Antimicrob Agents Chemother (2007).**51**(4): 1327-1332.

Luque-Ortega, J. R., O. M. Rivero-Lezcano, S. L. Croft eL. Rivas. "In vivo monitoring of intracellular ATP levels in Leishmania donovani promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism." Antimicrob Agents Chemother (2001).**45**(4): 1121-1125.

Luque-Ortega, J. R., J. M. Saugar, C. Chiva, D. Andreu eL. Rivas. "Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP." Biochem J (2003).**375**(Pt 1): 221-230.

Luque-Ortega, J. R., W. van't Hof, E. C. Veerman, J. M. Saugar eL. Rivas. "Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in Leishmania." FASEB J (2008).**22**(6): 1817-1828.

Lux, H., D. T. Hart, P. J. Parker eT. Klenner. "Ether lipid metabolism, GPI anchor biosynthesis, and signal transduction are putative targets for anti-leishmanial alkyl phospholipid analogues." Adv Exp Med Biol (1996).**416**: 201-211.

Malhi, H., G. J. Gores eJ. J. Lemasters. "Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths?" Hepatology (2006).**43**(2 Suppl 1): S31-44.

Mantyla, A., J. Rautio, T. Nevalainen, J. Vepsalainen, R. Juvonen, H. Kendrick, T. Garnier, S. L. Croft eT. Jarvinen. "Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives." Bioorg Med Chem (2004).**12**(13): 3497-3502.

Martin, D. C., J. D. Arnold, D. F. Clyde, M. al-Ibrahim, P. E. Carson, K. H. Rieckmann eD. Willerson, Jr. "A quinoline methanol (WR 30090) for treatment of acute malaria." Antimicrob Agents Chemother (1973).**3**(2): 214-219.

Martin, E. eA. J. Mukkada. "Identification of the terminal respiratory chain in kinetoplast . mitochondrial complexes of *Leishmania tropica* promastigotes." J Biol Chem (1979).**254**(23): 12192-12198.

Mauricio, I. L., M. W. Gaunt, J. R. Stothard eM. A. Miles. "Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions." Parasitology (2001).**122**(Pt 4): 393-403.

Mauricio, I. L., M. K. Howard, J. R. Stothard eM. A. Miles. "Genomic diversity in the *Leishmania donovani* complex." Parasitology (1999).**119** ( Pt 3): 237-246.

Mauricio, I. L., J. R. Stothard eM. A. Miles. "The strange case of *Leishmania chagasi*." Parasitol Today (2000).**16**(5): 188-189.

McAllister, P. R., M. J. Dotson, S. O. Grim eG. R. Hillman. "Effects of phosphonium compounds on *Schistosoma mansoni*." J Med Chem (1980).**23**(8): 862-865.

McConville, M. J., K. A. Mullin, S. C. Ilgutz eR. D. Teasdale. "Secretory pathway of trypanosomatid parasites." Microbiol Mol Biol Rev (2002).**66**(1): 122-154; table of contents.

McHardy, N., L. S. Wekesa, A. T. Hudson eA. W. Randall. "Antitheilerial activity of BW720C (buparvaquone): a comparison with parvaquone." Res Vet Sci (1985).**39**(1): 29-33.

McKerrow, J. H., E. Sun, P. J. Rosenthal eJ. Bouvier. "The proteases and pathogenicity of parasitic protozoa." Annu Rev Microbiol (1993).**47**: 821-853.

Medeiros, I. M., E. L. T. Nascimento eS. L. Hinrichsen. Leishmanioses - Visceral e Tegumentar. In Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.(2005).

Mesquita, J. T., T. A. da Costa-Silva, S. E. Borborema eA. G. Tempone. "Activity of imidazole compounds on *Leishmania (L.) infantum chagasi*: reactive oxygen species induced by econazole." Mol Cell Biochem (2014).**389**(1-2): 293-300.

Mesquita, J. T., A. G. Tempone eJ. Q. Reimao. "Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes." Acta Trop (2013).**130C**: 112-116.

Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman eV. Hannaert. "Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids." Biochim Biophys Acta (2006).**1763**(12): 1463-1477.

Mishra, B. B., R. R. Kale, R. K. Singh eV. K. Tiwari. " Review Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis." Fitoterapia. (2009).**80**: 81–90.

Mondal, S., P. Bhattacharya eN. Ali. "Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis." Expert Rev Anti Infect Ther (2010).**8**(8): 919-944.

Morello, A., M. Pavani, J. A. Garbarino, M. C. Chamy, C. Frey, J. Mancilla, A. Guerrero, Y. Repetto eJ. Ferreira. "Effects and mode of action of 1,4-naphthoquinones isolated from *Calceolaria sessilis* on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites." Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol (1995).**112**(2): 119-128.

Morgan, G. W., B. S. Hall, P. W. Denny, M. Carrington eM. C. Field. "The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences." Trends Parasitol (2002).**18**(11): 491-496.

Moyersoen, J., J. Choe, E. Fan, W. G. Hol eP. A. Michels. "Biogenesis of peroxisomes and glycosomes: trypanosomatid glycosome assembly is a promising new drug target." FEMS Microbiol Rev (2004).**28**(5): 603-643.

MS, M. d. S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. (2006) Brasília DF: 120.

Muller, R. H. eC. Jacobs. "Buparvaquone mucoadhesive nanosuspension: preparation, optimisation and long-term stability." Int J Pharm (2002).**237**(1-2): 151-161.

Nolan, D. P. eH. P. Voorheis. "The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase." Eur J Biochem (1992).**209**(1): 207-216.

Olliaro, P. L., P. J. Guerin, S. Gerstl, A. A. Haaskjold, J. A. Rottingen eS. Sundar. "Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004." Lancet Infect Dis (2005).**5**(12): 763-774.

Opperdoes, F. R. "The glycosome of trypanosomes and *Leishmania*." Biochem Soc Trans (1990).**18**(5): 729-731.

Opperdoes, F. R. eG. H. Coombs. "Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted." Trends Parasitol (2007).**23**(4): 149-158.

Oprea, T. I. eJ. Mestres. "Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs." AAPS J (2012).**14**(4): 759-763.

Ouaissi, A. "Apoptosis-like death in trypanosomatids: search for putative pathways and genes involved." Kinetoplastid Biol Dis (2003).**2**(1): 5.

Paris, C., P. M. Loiseau, C. Bories eJ. Breard. "Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes." Antimicrob Agents Chemother (2004).**48**(3): 852-859.

Pedersen, P. L. "Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview." J Bioenerg Biomembr (1999).**31**(4): 291-304.

Pessoa, S. B. Histórico da Geografia Médica; Educação Sanitária; Universidade Ensino e Pesquisa. In: Ensaio Médico-Sociais. . Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.(1963 ).

Rainey, P. M. eN. E. MacKenzie. "A carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of the products of glucose metabolism in *Leishmania pifanoi* amastigotes and promastigotes." Mol Biochem Parasitol (1991).**45**(2): 307-315.

Rassam, M. B. eZ. J. Robert. "Solubilization and kinetic characterization of mitochondrial adenosine triphosphatase from *Leishmania donovani* promastigotes." Mol Biochem Parasitol (1988).**29**(2-3): 153-158.

Rath, S., L. A. Trivelin, T. R. Imbrunito, D. M. Tomazela, M. N. Jesús, P. C. Marzal, H. F. Andrade-Junior eA. G. Tempone. "Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. ." Quim. Nova. (2003). **26**(4) 550-555.

Reimao, J. Q., F. A. Colombo, V. L. Pereira-Chioccola eA. G. Tempone. "Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania (L.) infantum chagasi*." Exp Parasitol (2012).**130**(3): 195-199.

Reimao, J. Q., F. A. Colombo, V. L. Pereira-Chioccola eA. G. Tempone. "In vitro and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR." Exp Parasitol (2011).**128**(2): 111-115.

Reimao, J. Q., M. T. Scotti eA. G. Tempone. "Anti-leishmanial and anti-trypansomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure-activity relationship study." Bioorg Med Chem (2010).**18**(22): 8044-8053.

Rey, L. Parasitologia. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan (2001).

Ribeiro, V. M. eM. S. M. Michalick. "Leishmaniose, Estratégia de Controle." Nosso Clínico (2001).**34**.

Rivas, L., L. Kahl, K. Manson eD. McMahon-Pratt. "Biochemical characterization of the protective membrane glycoprotein GP46/M-2 of *Leishmania amazonensis*." Mol Biochem Parasitol (1991).**47**(2): 235-243.

Roberts, L. J., E. Handman eS. J. Foote. "Science, medicine, and the future: Leishmaniasis." BMJ (2000).**321**(7264): 801-804.

Rogers, M. E., T. Ilg, A. V. Nikolaev, M. A. Ferguson eP. A. Bates. "Transmission of cutaneous leishmaniasis by sand flies is enhanced by regurgitation of fPPG." Nature (2004).**430**(6998): 463-467.

Sacks, D. eS. Kamhawi. "Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis." Annu Rev Microbiol (2001).**55**: 453-483.

Salvador, M. d. J. R. Influência de grupos amínicos na actividade dos complexos respiratórios mitocondriais. Mestrado, Universidade de Coimbra; (2003).

Santhamma, K. R. eA. Bhaduri. "Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes." Mol Biochem Parasitol (1995).**75**(1): 43-53.

Santos, D. O., C. E. R. Coutinho, M. F. Madeira, C. G. Bottino, R. T. Vieira, S. B. Nascimento, A. Bernardino, S. C. Bourguignon, S. Corte-Real, R. T. Pinho, C. R. Rodrigues eH. C. Castro. "Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review " Parasitol Res. (2008).**103**: 1–10.

Saugar, J. M. La Membrana Plasmática como Diana de Acción de Nuevas Moléculas Leishmanicidas, Universidad Complutense de Madrid; (2004).

Secundino, N., N. Kimblin, N. C. Peters, P. Lawyer, A. A. Capul, S. M. Beverley, S. J. Turco eD. Sacks. "Proteophosphoglycan confers resistance of *Leishmania major* to midgut digestive enzymes induced by blood feeding in vector sand flies." Cell Microbiol (2010).**12**(7): 906-918.

Sen, N., B. B. Das, A. Ganguly, B. Banerjee, T. Sen eH. K. Majumder. "*Leishmania donovani*: intracellular ATP level regulates apoptosis-like death in luteolin induced dyskinetoplastid cells." Exp Parasitol (2006).**114**(3): 204-214.

Sharifiyazdi, H., F. Namazi, A. Oryan, R. Shahriari eM. Razavi. "Point mutations in the *Theileria annulata* cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure." Vet Parasitol (2012).**187**(3-4): 431-435.

Sucen.-. Leishmaniose Visceral Americana. Paulo. (2001)São Paulo (SP).



Sundar, S., T. K. Jha, C. P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson eJ. Berman. "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis." N Engl J Med (2002).**347**(22): 1739-1746.

Taladriz, A., A. Healy, E. J. Flores Perez, V. Herrero Garcia, C. Rios Martinez, A. A. Alkhalidi, A. A. Eze, M. Kaiser, H. P. de Koning, A. Chana eC. Dardonville. "Synthesis and structure-activity analysis of new phosphonium salts with potent activity against African trypanosomes." J Med Chem (2012).**55**(6): 2606-2622.

Tempone, A. G., C. Martins de Oliveira eR. G. Berlinck. "Current approaches to discover marine antileishmanial natural products." Planta Med (2011).**77**(6): 572-585.

Tempone, A. G., N. N. Taniwaki eJ. Q. Reimao. "Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania* (L.) *chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine." Parasitol Res (2009).**105**(2): 499-505.

Ter Kuile, B. H. eF. R. Opperdoes. "Uptake and turnover of glucose in *Leishmania donovani*." Mol Biochem Parasitol (1993).**60**(2): 313-321.

Tiuman, T. S., A. O. Santos, T. Ueda-Nakamura, B. P. Filho eC. V. Nakamura. "Recent advances in leishmaniasis treatment." Int J Infect Dis (2011).**15**(8): e525-532.

Urbina, J. A. "Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites." Parasitology (1997).**114** **Suppl**: S91-99.

Van Hellemond, J. J. eA. G. Tielens. "Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes." Mol Biochem Parasitol (1997).**85**(1): 135-138.

van Schaftingen, E., F. R. Opperdoes eH. G. Hers. "Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate." Eur J Biochem (1985).**153**(2): 403-406.

Venkatesh, G., M. I. Majid, S. Ramanathan, S. M. Mansor, N. K. Nair, S. L. Croft eV. Navaratnam. "Optimization and validation of RP-HPLC-UV method with solid-phase extraction for determination of buparvaquone in human and rabbit plasma: application to pharmacokinetic study." Biomed Chromatogr (2008).**22**(5): 535-541.

Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, M. E. Hoffmann, F. R. Gadelha eR. Docampo. "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ." J Biol Chem (1991).**266**(22): 14431-14434.

Vercesi, A. E., M. E. Hoffmann, C. F. Bernardes eR. Docampo. "Regulation of intracellular calcium homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Effects of calmidazolium and trifluoperazine." Cell Calcium (1991).**12**(5): 361-369.

Vexenat, J. A., S. L. Croft, J. H. Furtado Campos eM. A. Miles. "Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniosis." Vet Parasitol (1998).**77**(1): 71-73.

Vieites, M., P. Smircich, B. Parajon-Costa, J. Rodriguez, V. Galaz, C. Olea-Azar, L. Otero, G. Aguirre, H. Cerecetto, M. Gonzalez, A. Gomez-Barrio, B. Garat eD. Gambino. "Potent in vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of pyridine-2-thiol N-oxide metal complexes having an inhibitory effect on parasite-specific fumarate reductase." J Biol Inorg Chem (2008).**13**(5): 723-735.

Wassef, M. K., T. B. Fioretti eD. M. Dwyer. "Lipid analyses of isolated surface membranes of *Leishmania donovani* promastigotes." Lipids (1985).**20**(2): 108-115.

Wasunna, M. K., J. R. Rashid, J. Mbui, G. Kirigi, D. Kinoti, H. Lodenyo, J. M. Felton, A. J. Sabin, M. J. Albert eJ. Horton. "A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya." Am J Trop Med Hyg (2005).**73**(5): 871-876.

WHO, W. H. O. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases. (2010): 186.

Yao, C. "Major surface protease of trypanosomatids: one size fits all?" Infect Immun (2010).**78**(1): 22-31.

Yeates, C. "Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). ." Curr Opin Investig Drugs ( 2002).**3** 1446-1452.

Zilberstein, D. eD. M. Dwyer. "Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*." Biochem J (1988).**256**(1): 13-21.

**ANEXO**



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ / INSTITUTO PASTEUR  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Parecer CEUA-IAL/Pasteur nº 05/2011

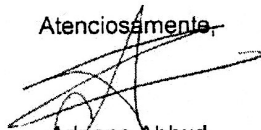
Prezada Senhora,

Vimos pelo presente informar que o projeto de pesquisa "**Estudo do Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e suas combinações terapêuticas em *Leishmania (L.) chagasi***", sob coordenação do Pesquisador Científico André Gustavo Tempone Cardoso, foi considerado **APROVADO SEM RESTRIÇÕES**, podendo ser realizado conforme procedimentos delineados apresentados a esta Comissão.

O projeto supracitado apresenta justificativa para a utilização de animais pautada em metodologia que contribuirá para a formação em pós-graduação, assim como prevê resultados que poderão ser de grande importância à Saúde Pública, apresentando, ainda, análise estatística adequada para o cálculo da quantidade de modelos utilizados.

Informamos que devem ser encaminhados relatórios à CEUA a cada **6 (seis) meses**, no intuito de acompanhar os procedimentos realizados segundo os aspectos éticos e para que esta Comissão remeta as informações pertinentes ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, conforme Lei Federal 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Atenciosamente,



Adriano Abbud  
Coordenador  
CEUA-IAL/Pasteur

Ilma. Sra.  
Dra. Adriana Bugno  
Presidente do Conselho Técnico Científico  
Instituto Adolfo Lutz

C/C  
Dr. André Gustavo Tempone Cardoso  
Pesquisador Científico  
Centro de Parasitologia e Micologia  
Instituto Adolfo Lutz

AA/aa

Endereço: Avenida Doutor Arnaldo, nº 355  
10º Andar – Salas 1019/1020 – Cerqueira César  
São Paulo – SP – CEP: 01246-902  
Tel: (11) 3068-2881 – e-mail: ceua@ial.sp.gov.br