

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

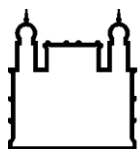
Fundação Oswaldo Cruz

Estudo do efeito *in vitro* e *in vivo* da apigenina em *Leishmania amazonensis*

FERNANDA DA FONSECA E SILVA

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular**

**RIO DE JANEIRO
2014**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Fernanda da Fonseca e Silva

ESTUDO DO EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA APIGENINA EM *Leishmania amazonensis*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

RIO DE JANEIRO
2014

S586 Silva, Fernanda da Fonseca e

Estudo do efeito *in vitro* e *in vivo* da apigenina em *Leishmania amazonensis* / Fernanda da Fonseca e Silva. – Rio de Janeiro, 2014.

xvii, 69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 62-69

1. *In vitro*. 2. *In vivo*. 3. Apigenina. 4. *Leishmania amazonensis*. I.
Título.

CDD 616.9364

FERNANDA DA FONSECA E SILVA

Estudo do efeito *in vitro* e *in vivo* da apigenina em *Leishmania amazonensis*

Orientador:

Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

Aprovada em: ___/___/_____

EXAMINADORES:

Dr.^a. Elvira Maria Saraiva Chequer Bou Habib
UFRJ

Dr.^a. Leda Quercia Vieira
UFMG

Dr.^a. Solange Lisboa de Castro
FIOCRUZ

SUPLENTE:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
FIOCRUZ

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Revisor)
FIOCRUZ

Rio de Janeiro
2014

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

DEDICATÓRIA

A minha amada família, em especial minha
mãe e irmão, por todo apoio e motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral, por toda assistência e direcionamento, pelos ensinamentos, pelo incentivo, pela confiança e amizade durante toda a minha trajetória na Fiocruz. Você é um grande “pai científico”. Obrigada pelas oportunidades, pelos desafios e até pelas broncas que tanto contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

Aos meus incríveis “irmãos científicos”, Job Inácio, Luiza Gervazoni e Sabrina, pela parceria, por toda ajuda, pelo incentivo constante, pela amizade preciosa, pela cumplicidade, pelo companheirismo, pelo carinho fraternal e por todas as risadas que me fizeram dar.

À Dra. Leonor Leon, à Dra. Marilene Cavalheiro e ao Dr. Eduardo Caio, pelo acolhimento no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos e pelo grande apoio na realização deste trabalho.

A todos os membros desse mesmo laboratório, especialmente ao Edézio, Valter, Liliane, Viviane e Gézia, por toda ajuda (direta ou indireta), pela troca de ideias e pela fundamental cooperação.

Ao Dr. Rubem Menna Barreto, pelas oportunidades de aprendizado concedidas, pela colaboração no processamento e análise dos experimentos de microscopia eletrônica e pela revisão desta dissertação. Agradeço, também, a sua aluna Thabata Duque pelas dicas e pela enorme gentileza e paciência ao me ajudar em determinados experimentos.

Às Plataformas de Citometria de Fluxo, de Microscopia Eletrônica e de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fiocruz pela contribuição neste trabalho.

Aos Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, CAPES e FAPERJ, pelo suporte financeiro.

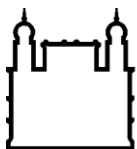
A Deus, por todas as oportunidades na minha vida.

Aos meus pilares, minha mãe Jussara, meu irmão Bruno e meu noivo Rodrigo, por todo amor, carinho, compreensão, apoio e motivação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Charlie Chaplin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

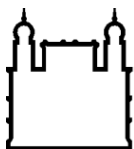
ESTUDO DO EFEITO *IN VITRO* E *IN VIVO* DA APIGENINA EM *Leishmania amazonensis*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda da Fonseca e Silva

A leishmaniose ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo. Ela está presente nos cinco continentes e é endêmica em 98 países, com 350 milhões de pessoas vivendo em zonas de risco e mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Compreende um complexo de doenças causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*. No Brasil, a *Leishmania amazonensis* é uma espécie dermatotrópica importante. Apesar do progresso na compreensão da bioquímica e biologia deste parasito, este conhecimento ainda não tem refletido na descoberta de novos e eficazes agentes quimioterápicos contra a doença. O tratamento atual é insatisfatório, com altas taxas de toxidez e ineficácia, e não há vacina humana licenciada. A pesquisa de novos medicamentos, a partir de fontes naturais, é amplamente utilizada como uma abordagem bem sucedida na detecção de compostos para o tratamento de doenças parasitárias. Compostos puros obtidos de plantas, como certos flavonoides, exibem atividade antiprotzoária. A apigenina é uma flavona bioativa, abundantemente presente em frutas, ervas e legumes, que mostrou atividade leishmanicida. A apigenina inibiu o crescimento celular de ambas as formas evolutivas de *L. amazonensis* de maneira dose-dependente. Este efeito inibitório, em promastigotas, foi igual a 74% após 24 h de tratamento com 96 μM de apigenina e, em amastigotas intracelulares, foi igual a 71% após 72 h de tratamento com 12 μM do composto. O $\text{IC}_{50}/24$ h em promastigotas foi 23,68 μM e o $\text{IC}_{50}/72$ h em amastigotas foi 4,33 μM . Observou-se que a apigenina foi capaz de induzir o aumento nos níveis de ERO nos promastigotas e nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*. A incubação com os antioxidantes NAC e GSH reduziu a morte induzida pela apigenina nesses parasitos. A apigenina também foi capaz de causar a diminuição no potencial de membrana mitocondrial, a parada do ciclo celular, a diminuição do potencial proliferativo e alterações ultraestruturais mitocondriais e golgienses nos promastigotas tratados, também de maneira dose-dependente. Além disso, os macrófagos infectados mostraram que o tratamento com apigenina induziu um aumento no número de autofagossomos próximo das amastigotas, sugerindo também a contribuição da autofagia no mecanismo de ação do composto. Na avaliação *in silico*, a apigenina exibiu propriedades ADMET favoráveis e preencheu a "Regra dos 5" de Lipinski, mostrando ser bem absorvida, permeável e oralmente viável. O tratamento oral com apigenina (1 e 2 mg/Kg/dia) em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* mostrou controlar o desenvolvimento da lesão na orelha destes animais e reduzir a carga parasitária de maneira dose-dependente. Os resultados *in vitro* contribuíram para elucidar a atividade leishmanicida da apigenina e, juntamente com os resultados *in vivo*, entusiasmam em propor essa flavona como um composto suplementar no tratamento da leishmaniose.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* EFFECT OF APIGENIN IN *Leishmania amazonensis*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION

Fernanda da Fonseca e Silva

Leishmaniasis is still one of the most neglected diseases in the world. It is present on five continents and is endemic in 98 countries, with 350 million people living in areas at risk and more than 12 million people infected. Comprises a complex of diseases caused by over 20 species of the genus *Leishmania*. In Brazil, *Leishmania amazonensis* is an important dermatotropic specie. Despite progress in understanding the biochemistry and biology of this parasite, this knowledge has not been reflected in the discovery of new and effective chemotherapeutic agents against the disease. The current treatment is unsatisfactory, with high toxicity and ineffectiveness, and there is no licensed human vaccine. The research of new drugs from natural sources is widely used as a successful approach in detecting compounds for the treatment of parasitic diseases. Pure compounds obtained from plants, such as certain flavonoids, exhibit antiprotozoal activity. Apigenin is a bioactive flavone, abundantly present in fruits, herbs and vegetables, which showed leishmanicidal activity. Apigenin inhibited cell growth of both forms of *L. amazonensis* in dose-dependent manner. This inhibitory effect on promastigotes was equal to 74% after 24 h of treatment with 96 μ M apigenin and on intracellular amastigotes was equal to 71% after 72 h of treatment with 12 μ M of the compound. The IC₅₀/24 h) in promastigotes was 23.68 μ M and the IC₅₀/72 h in amastigotes was 4.33 μ M. It was observed that apigenin was able to induce increased levels of ROS in treated promastigotes and *L. amazonensis*-infected macrophages. Pre-incubation with antioxidants, such as NAC and GSH, reduced apigenin-induced death in these parasites. Apigenin was also able to cause a decrease in mitochondrial membrane potential, the cell cycle arrest, the decrease of proliferative potential, and mitochondrial and golgiense's ultrastructural changes in treated promastigotes, also in dose-dependent manner. In addition, macrophages have shown that apigenin treatment induced an increase in the number of autophagosomes close to the amastigotes, suggesting the involvement of autophagy in the mechanism of action of the compound. When evaluated *in silico*, apigenin exhibited favorable ADMET properties and filled the Lipinski's "Rule of 5", showing to be well absorbed, permeable and orally viable. In murine cutaneous leishmaniasis model, the oral treatment with apigenin (1 and 2 mg/Kg/day) in BALB/c infected mice showed to control the lesion development on ear of these animals and to reduce the parasite burden in dose-dependent manner. *In vitro* studies have contributed to elucidate the leishmanicidal activity of apigenin and, together with the *in vivo* results, enthusiastic in proposing this flavone as an additional compound in the treatment of leishmaniasis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Leishmanioses	01
1.1.1	Agentes etiológicos e vetores	01
1.1.2	Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	03
1.1.3	Manifestações clínicas	05
1.1.4	Aspectos epidemiológicos	07
1.2	Tratamento	09
1.2.1	Antimoniais pentavalentes	10
1.2.2	Anfotericina B	11
1.2.3	Pentamidina	12
1.2.4	Miltefosina	12
1.2.5	Paramomicina	13
1.2.6	Tratamentos alternativos	13
1.3	Produtos naturais com atividade leishmanicida	15
1.3.1	Flavonoides	15
1.3.2	Apigenina	16
1.4	Mitocôndria e produção de espécies reativas de oxigênio em tripanosomatídeos	17
1.5	Morte celular em organismos unicelulares	18
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Reagentes	24
3.2	Parasitas e animais	24
3.3	Ensaio <i>in vitro</i>	24
3.3.1	Verificação da atividade leishmanicida da apigenina	24
3.3.2	Avaliação da produção de ERO	25
3.3.3	Avaliação do efeito de antioxidantes sobre a atividade da apigenina	26
3.3.4	Determinação do $\Delta\Psi_m$	27
3.3.5	Avaliação do ciclo celular	27
3.3.6	Avaliação do potencial proliferativo	28
3.3.7	Verificação da integridade de membrana plasmática	28
3.3.8	Investigação da fragmentação de DNA	29

3.3.9	Análises ultraestruturais.....	29
3.3.10	Citotoxicidade da apigenina em macrófagos peritoneais murinos	30
3.5	Análise da viabilidade oral, propriedades moleculares e ADMET da apigenina.....	30
3.6	Ensaio <i>in vivo</i>	31
3.6.1.	Atividade <i>in vivo</i> da apigenina.....	31
3.6.2	Determinação da carga parasitária.....	31
3.6.3	Avaliação de parâmetros toxicológicos.....	32
3.7	Análises estatísticas	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Ensaio <i>in vitro</i>	33
4.1.1	Verificação da atividade leishmanicida da apigenina.....	33
4.1.2	Avaliação da produção de ERO.....	34
4.1.3	Avaliação do efeito de antioxidantes sobre a atividade da apigenina.....	36
4.1.4	Determinação do $\Delta\Psi_m$	39
4.1.5	Avaliação do ciclo celular	39
4.1.6	Avaliação do potencial proliferativo	40
4.1.7	Verificação da integridade de membrana plasmática.....	42
4.1.8	Investigação da fragmentação de DNA	43
4.1.9	Análises ultraestruturais.....	43
4.1.10	Citotoxicidade da apigenina em macrófagos peritoneais murinos	48
4.2	Análise da viabilidade oral, propriedades moleculares e ADMET da apigenina.....	49
4.3	Ensaio <i>in vivo</i>	51
4.3.1.	Atividade <i>in vivo</i> da apigenina.....	51
4.3.2	Determinação da carga parasitária.....	51
4.3.3	Avaliação de parâmetros toxicológicos.....	51
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÕES.....	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Taxonomia da família Trypanosomatidae	01
Figura 1.2 - Morfologia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	02
Figura 1.3 - Fêmeas de <i>Phlebotomus pappatasi</i> e <i>Lutzomyia longipalpis</i> ingurgitadas	03
Figura 1.4 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	04
Figura 1.5 - Formas clínicas da leishmaniose	06
Figura 1.6 - Endemicidade da leishmaniose tegumentar e visceral no mundo	08
Figura 1.7 - Taxas brutas de incidência da leishmaniose no Brasil	09
Figura 1.8 - Estrutura básica do favonoide	16
Figura 1.9 - Estrutura química da apigenina	16
Figura 1.10 - As principais modalidades de morte celular em eucariotos	22
Figura 4.1 - Atividade da apigenina sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	33
Figura 4.2 - Atividade da apigenina sobre amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	34
Figura 4.3 - Produção de ERO em promastigotas tratados com apigenina	34
Figura 4.4 - Produção de H ₂ O ₂ em promastigotas tratados com apigenina	35
Figura 4.5 - Produção de ERO em macrófagos infectados e tratados com apigenina	36
Figura 4.6 - Correlação linear: % de inibição do índice infecção Vs. produção de ERO.....	36
Figura 4.7 - Efeito de antioxidantes em promastigotas tratados com apigenina	37
Figura 4.8 - Efeito de antioxidantes na infecção sob tratamento com apigenina	38
Figura 4.9 - Avaliação do $\Delta\Psi_m$ de promastigotas tratados com apigenina	39
Figura 4.10 - Análise do ciclo celular de promastigotas tratadas com apigenina	40
Figura 4.11 - Avaliação do potencial proliferativo de promastigotas tratadas com apigenina.....	41
Figura 4.12 - Avaliação da integridade de membrana plasmática de promastigotas tratados com apigenina	42
Figura 4.13 - Análise ultraestrutural de promastigotas tratados com apigenina	44
Figura 4.14 - Análise ultraestrutural de macrófagos peritoneais murinos infectados com <i>L. amazonensis</i> e não tratados (controle)	46
Figura 4.15 - Análise ultraestrutural de macrófagos peritoneais murinos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com 12 μ M apigenina por 72 h.....	47
Figura 4.16 - Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos tratados com apigenina....	48
Figura 4.17 – Atividade <i>in vivo</i> da apigenina.....	52
Figura 4.18 – Avaliação toxicológica.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Principais modalidades de morte celular e suas características	19
Tabela 4.1 - Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular	40
Tabela 4.2 - Valores de mediana da fluorescência do CFSE e porcentagem de células que proliferaram.....	41
Tabela 4.3 - Valores de mediana e porcentagem de promastigotas marcados com PI	42
Tabela 4.4 - Medianas de fluorescência do ensaio de TUNEL em promastigotas tratadas com apigenina	43
Tabela 4.5 - Valores de IC ₅₀ , LD ₅₀ e IS	49
Tabela 4.6 - Viabilidade oral, propriedades moleculares e propriedades ADMET da apigenina	50
Tabela 4.7 - Comparação dos parâmetros toxicológicos com os valores de referência	53

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial
- ADMET - Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
- ALB - Albumina
- ALT - Alanina aminotransferase
- AMPK - Proteína cinase ativada por AMP
- Amplex Red* - 10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina
- AST - Aspartato aminotransferase
- Atg - AuTophagy-related*
- ATP - Adenosina trifosfato
- BUN - Ureia
- CD4+ - Grupamento de diferenciação 4
- CFSE - Carboxifluoresceína N-succinimidil éster
- CK - Creatina quinase
- CK2 - Caseína cinase-2
- clogP - Logaritmo do coeficiente de partição entre n-octanol e água do composto
- CREA - Creatinina
- Cvt - Citoplasma para vacúolo alvo
- CYP450 - Citocromo P450 oxidase
- DL - Dose letal
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DNA - Ácido desoxirribonucleico
- DNDi - Iniciativa Drogas para Doenças Negligenciadas
- ED - Dose efetiva
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGCG - Epigallocatequina-3-galato
- EP - Erro padrão
- EPA - Agência de Proteção Ambiental
- ERO - Espécies reativas de oxigênio
- FCCP - Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona
- GLO - Globulina
- GSH - Glutationa reduzida
- GSSG - Glutationa oxidada
- H₂DCFDA - Diacetato de diclorodiidrofluoresceína

HBSS - Solução salina balanceada de Hanks
HIV - Vírus da imunodeficiência humana
HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência'
HRP - *Horseradish peroxidase*
IC₅₀ - Concentração que inibe 50% das células
IF - Índice de Infecção
IFN- γ - Interferon gama
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível
IP- Intraperitoneal
IS - Índice de seletividade
JC-1 - Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboxianina
LC - Leishmaniose cutânea
LCL - Leishmaniose cutânea localizada
LD₅₀ - Dose letal para 50% das células
LDA - Ensaio de diluição limitante
LDC - Leishmaniose difuso-cutânea
LDPC - Leishmaniose dérmica pós-calazar
LM - Leishmaniose mucocutânea
LV - Leishmaniose visceral
MAP1LC3 - Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
MAPK - Proteína cinase ativada por mitógeno
MET - Microscopia eletrônica de transmissão
mTOR - Alvo da rapamicina em mamíferos
NAC - N-acetil-cisteína
NADP⁺ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
·NO - Óxido nítrico
nROTB - Número de ligações rotativas
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Solução tamponada com fosfato
PI - Iodeto de propídeo
PI3K - Fosfatidilinositol 3-cinase
PKC - Proteína cinase C
PT - Proteínas totais
RNA - Ácido ribonucleico

RPMI - *Roswell Park Memorial Institute*

SFB - Soro fetal bovino

SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida

SQSTM1- Sequestosomo 1

TdT - Transferase deoxinucleotidil terminal

TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética

TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica

Th - *T helper*

TNF α - Fator de necrose tumoral alfa

TUNEL - *Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling*

UIF - Unidades de intensidade de fluorescência

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

1.1.1 Agentes etiológicos e vetores

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (OMS, 2010). Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Esta ordem caracteriza-se pela presença de minicírculos e maxicírculos de DNA compactados em uma estrutura denominada cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria única do parasito (Stuart e cols, 2008). O gênero *Leishmania* apresenta dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que englobam as espécies causadoras das leishmanioses. A sistemática do gênero *Leishmania* apresenta grande complexidade, com a introdução de dois níveis intermediários de subgênero e complexo, conforme ilustrado na Figura 1.1.

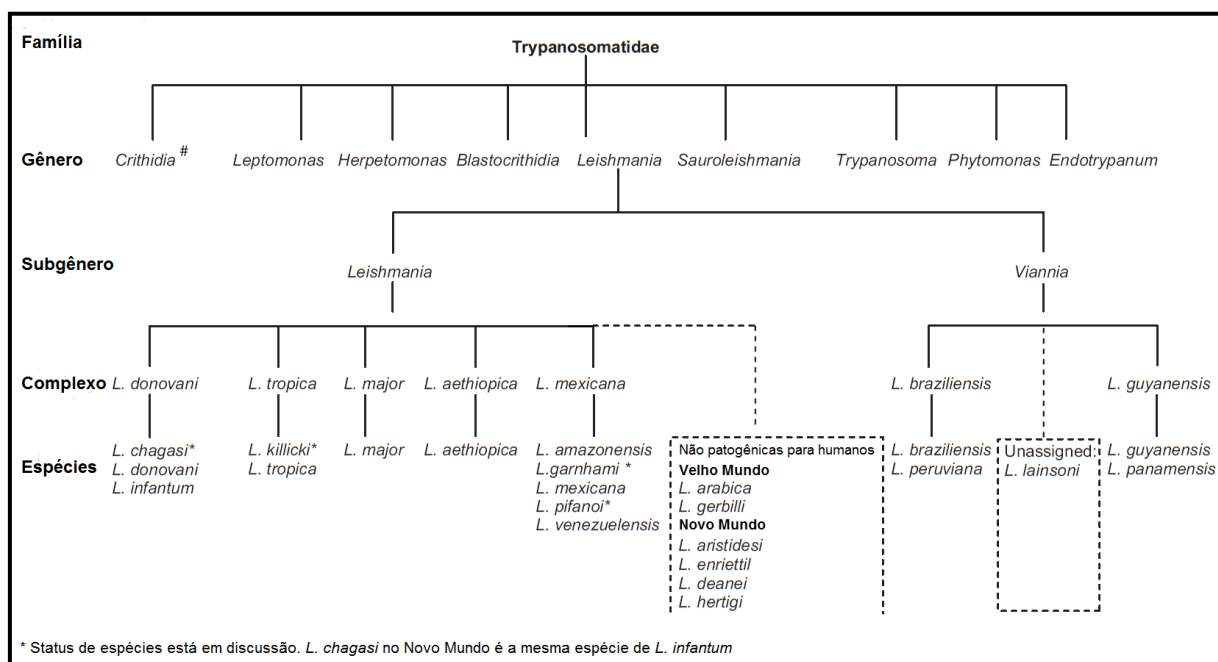


Figura 1.1: Taxonomia da família Trypanosomatidae (OMS, 2010). #A criação de novos gêneros foi sugerida para melhor classificar isolados pertencentes a esses gêneros (*Angomonas* e *Strigomonas*) (Teixeira e cols, 2011)

As espécies *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (equivalente a *Leishmania chagasi* na América do Sul) causam a forma visceral da doença. Mais de 15 espécies de *Leishmania* causam leishmaniose cutânea em humanos como *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo e *Leishmania mexicana*, *Leishmania*

amazonensis, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis* no Novo Mundo (Menna-Barreto e De Castro, 2014). No Brasil, as três principais espécies dermatrópicas são: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007).

Os tripanossomatídeos apresentam uma organização ultraestrutural eucariótica clássica, com organelas comuns de células de mamíferos e também com estruturas especiais que estão ausentes em outros eucariotos. A mitocôndria, por exemplo, é única, ramificada e contém o cinetoplasto. Além disso, os glicosomos são peroxissomas especializados que contêm enzimas da via glicolítica. Outra estrutura peculiar é acidocalcisomo, organela ácida envolvida no metabolismo de polifosfato e pirofosfato, que também funciona como armazenamento de íons. Além disso, uma camada de microtúbulos subpeliculares confere rigidez mecânica à célula (Rodrigues e cols, 2014; Menna-Barreto e De Castro, 2014).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas distintas: a promastigota e a amastigota (Figura 1.2). A forma promastigota, presente no trato digestivo do inseto vetor, caracteriza-se pela forma alongada e mede cerca de 12x2 µm. Apresenta cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre que emerge da região anterior (bolsa flagelar). A forma amastigota é intracelular, sendo encontrada principalmente nos fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado. Caracteriza-se pela forma arredondada e pelo flagelo interiorizado (rudimentar na bolsa flagelar) e mede cerca de 2-4 µm (Vannier-Santos e cols, 2002; Neves, 2005).

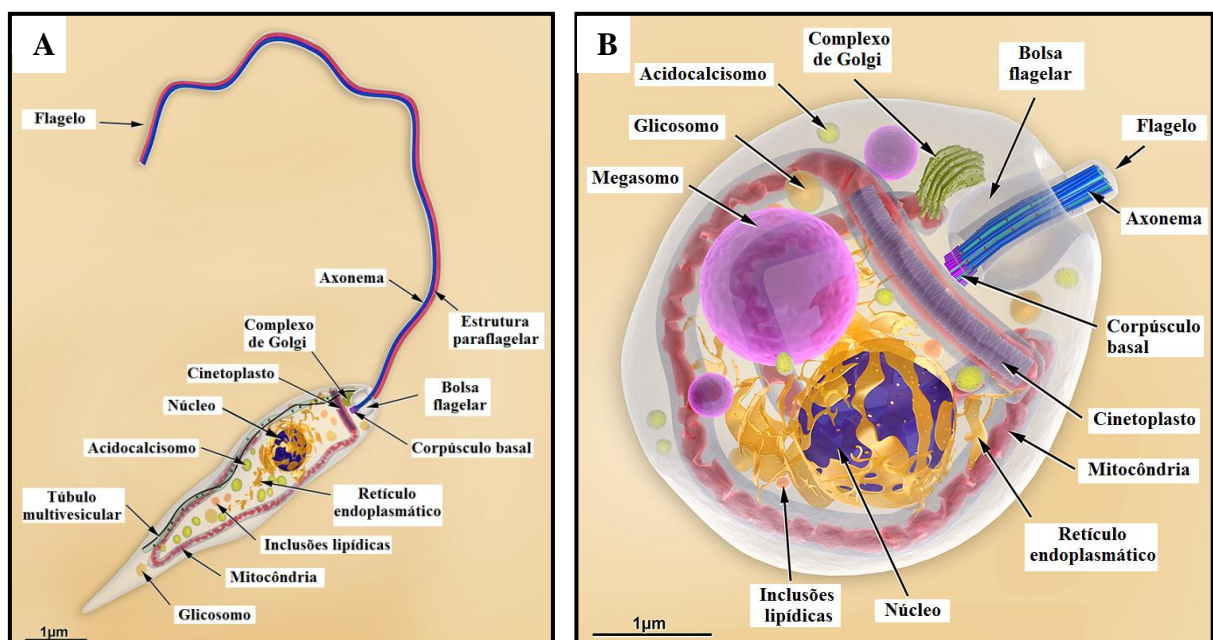


Figura 1.2: Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania*. Figura esquemática mostrando a organização estrutural das formas (A) promastigota e (B) amastigota (Adaptado de Teixeira e cols, 2013).

Os vetores da leishmaniose são insetos denominados flebotomíneos, que medem de 2 a 3 mm e são conhecidos popularmente, dependendo da localização geográfica, como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros. Pertencem à ordem Diptera, família Psychodidae e subfamília Phlebotominae. Dois gêneros de flebotomíneos transmitem *Leishmania* para humanos: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Figura 1.3). No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão da doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome*, *L. migonei*, *L. longipalpis* e *L. cruzi* (Ministério da Saúde, 2007; 2013). Os hospedeiros vertebrados incluem grandes variedades de mamíferos: roedores, endentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem (Grimaldi e cols, 1991; Neuber, 2008).

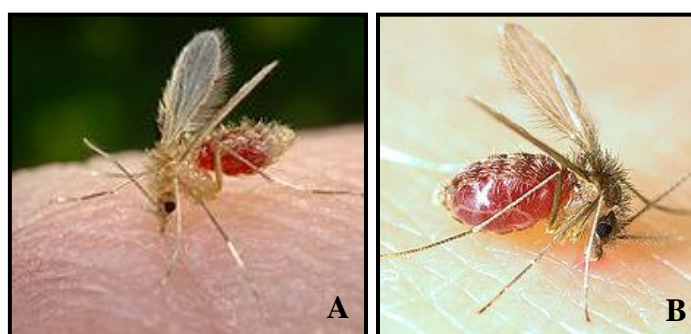


Figura 1.3: Fêmeas de (A) *Phlebotomus pappatasi* e (B) *Lutzomyia longipalpis* ingurgitadas. (Disponível em <http://en.wikipedia.org>)

1.1.2 Ciclo biológico da *Leishmania*

A *Leishmania* apresenta ciclo biológico heteroxênico, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado (Figura 1.4). No hospedeiro mamífero, o protozoário é um patógeno intracelular obrigatório. O ciclo inicia-se quando a fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo sangue contendo células parasitadas. No trato digestivo do vetor, ocorre a lise dessas células e a liberação das formas amastigotas, que se diferenciam inicialmente em promastigotas procíclicas não infectivas e se multiplicam de forma logarítmica, povoando as regiões do proventrículo e do esôfago do inseto. As promastigotas procíclicas sofrem subsequentes modificações morfológicas e bioquímicas – a metaciclogênese, tornando-se infectivas (metacíclicas), e migram para a faringe. Quando o vetor infectado realiza um novo repasto sanguíneo, regurgita as promastigotas metacíclicas, que são fagocitadas por células do sistema fagocítico presentes na derme do novo hospedeiro vertebrado. Nessas células, os parasitos são capazes de resistir à ação microbicida, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por

divisão binária levando as células ao rompimento. As amastigotas liberadas poderão infectar outros macrófagos, estabelecendo e disseminando a infecção (Sacks e Kamhawi, 2001; Vannier-Santos e cols, 2002; Stuart e cols, 2008). Além do repasto sanguíneo, transfusão de sangue, hemodiálise, transplante e a transmissão congênita foram relatados como formas de transmissão da leishmaniose (Vannier-Santos e cols, 2002).

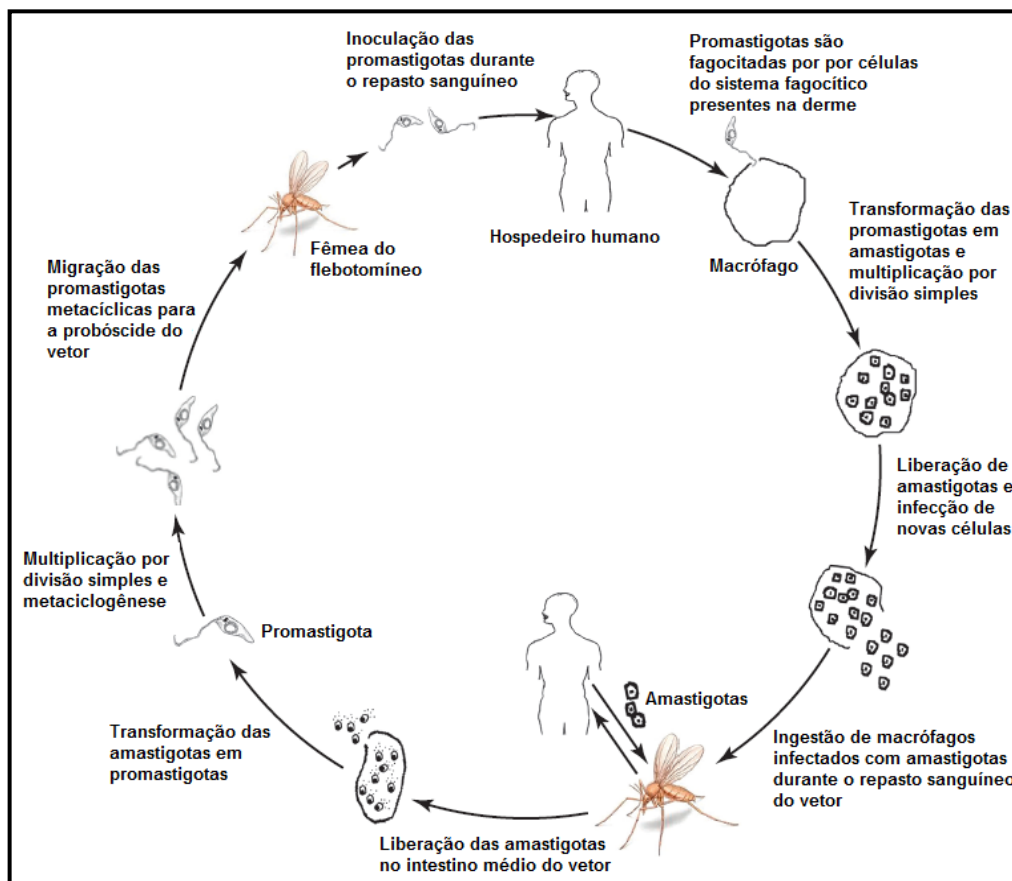


Figura 1.4: Ciclo biológico da *Leishmania* (Adaptado de Jain, 2013).

A localização das amastigotas no interior de macrófagos faz com que o controle da infecção seja dependente da resposta imune mediada por células. A principal célula efetora da eliminação destes amastigotas é o próprio macrófago, através da síntese de intermediários tóxicos de oxigênio e nitrogênio, após sua ativação por linfócitos T auxiliares (*helper*). As células T *helper* CD4+ têm uma função central na imunidade específica contra a leishmaniose (Ministério da Saúde, 2007). O mecanismo mais eficiente de eliminar o parasito envolve a produção de interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) por células T CD4+ do tipo Th1, que estimulam a síntese de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), gerando a produção de óxido nítrico (NO), uma citotoxina potente envolvida na inibição da *Leishmania*. A maioria dos estudos de mecanismos de resposta imune foi realizada em modelos murinos, sendo caracterizados dois padrões de resposta Th1 e Th2. A resistência do

hospedeiro está associada à resposta Th1, enquanto a suscetibilidade à infecção está relacionada com a resposta Th2 (Loría-Cervera e Andrade-Narváez, 2014). Em outras palavras, a resposta Th1 está associada à resolução da leishmaniose e a resposta Th2 à progressão da doença (Piscopo & Mallia, 2006).

1.1.3 Manifestações clínicas

A leishmaniose desencadeia diferentes formas de manifestação clínica, que dependem da espécie do parasito que foi inoculado pelo vetor e da resposta imune do hospedeiro vertebrado acometido (Santos e cols, 2008). Pode acometer a pele e mucosas (leishmaniose tegumentar), ou as vísceras (leishmaniose visceral) (Figura 1.5). A leishmaniose tegumentar pode, ainda, ser dividida em cutânea localizada, mucocutânea, cutânea difusa ou disseminada (Neuber, 2008).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais prevalente da doença, causada principalmente pelas espécies dermatrópicas *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Goto e Lindoso, 2010). A úlcera típica de leishmaniose cutânea é indolor e costuma localizar-se em áreas expostas da pele; possui formato arredondado, base eritematosa, infiltrada e com consistência firme, bordas bem delimitadas e elevadas, fundo avermelhado e com granulações grosseiras. Infecções bacterianas secundárias podem estar associadas, produzindo dor e exsudato seropurulento. Outros tipos de lesões cutâneas menos frequentes podem ser encontrados (Ministério da Saúde, 2007).

A forma disseminada da leishmaniose cutânea é relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos. É caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem duas ou mais áreas não contíguas do corpo, principalmente a face e o tronco. A carga parasitária na forma disseminada é baixa, quando comparado com a forma difusa. As duas espécies reconhecidas como causadora dessa síndrome são a *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Ministério da Saúde, 2007; Goto e Lindoso, 2010).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) constitui uma forma clínica grave e também rara, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se com uma lesão única que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas disseminadas pelo corpo. No Brasil, é causada pela *L. amazonensis* (Bailey e cols, 2007; Ministério da Saúde, 2007).

A forma recidiva cútis caracteriza-se por lesões papulosas e vesiculares que evoluem após cura clínica (cicatrização espontânea ou medicamentosa da úlcera), com reativação

localizada geralmente em torno da cicatriz da ferida curada após um período variável de meses a anos (Ministério da Saúde, 2007; Goto e Lindoso, 2010).

A leishmaniose mucocutânea (LM) é caracterizada por lesões destrutivas e desfigurantes nas mucosas da cavidade oral e das vias aéreas superiores. O agente etiológico causador da LM, em nosso país é a *L. braziliensis*, entretanto já foram citados casos na literatura atribuídos a *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. Na maioria dos casos, a LM resulta da LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática (Ministério da saúde, 2007; Goto e Lindoso, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é a forma mais grave da doença, quase sempre fatal se não tratada (90% dos casos). É causada principalmente pela *L. donovani* e *L. infantum*. A doença acomete linfonodos, baço, fígado e medula óssea, por isso as manifestações mais comuns são febre, emagrecimento, anemia severa, leucopenia e trombocitopenia, levando a complicações, tais como maior susceptibilidade a infecções e tendência a sangramentos, além de esplenomegalia e hepatomegalia (Ministério da Saúde, 2003; Neuber, 2008).

A leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC), causada por *L. donovani*, é uma manifestação dérmica que ocorre normalmente após a cura da LV (Srivastava e cols, 2010). Caracteriza-se por máculas hipopigmentadas ou eritematosas, frequentemente confundidas com vitiligo ou lepra, em qualquer parte do corpo, que podem se tornar papulares ou nodulares e infiltrativas, especialmente na face (OMS, 2010).



Figura 1.5: Formas clínicas da leishmaniose: (A) cutânea localizada, (B) cutânea disseminada, (C) cutânea difusa, (D) recidiva cútis, (E) mucocutânea, (F) visceral e (G) pós-calazar (Ministério da Saúde, 2006; OMS, 2009).

A associação das infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e pelo protozoário *Leishmania* spp. caracteriza a coinfeção *Leishmania*-HIV, um problema emergente, de alta gravidade e presente em 35 países. Um aumento expressivo do número de casos de coinfeção tem sido observado devido à sobreposição geográfica das áreas de transmissão, como consequência da interiorização da infecção pelo HIV e da urbanização das leishmanioses (Souza-Gomes e cols, 2011).

Na coinfeção, a *Leishmania* induz uma produção mais robusta do HIV-1 e o vírus, por sua vez, medeia uma maior replicação do parasita. De fato, tem sido demonstrado que a infecção por HIV-1 aumenta o risco de desenvolvimento da LV em 100 a 2300 vezes em áreas endêmicas, reduz a probabilidade de uma resposta terapêutica e aumenta a probabilidade de recidivas. Além disso, estudos clínicos revelaram que a leishmaniose promove um aumento na carga viral e uma rápida progressão da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), o que reduz a expectativa de vida em pacientes infectados com o HIV-1. Assim, ambos os agentes patogênicos exercem um efeito prejudicial sinérgico na resposta imune celular do indivíduo coinfectado (Ezra e cols, 2010).

1.1.4 Aspectos epidemiológicos

As doenças negligenciadas afetam mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e somam em média 11% da carga global de doenças. Ainda hoje, a leishmaniose é uma das doenças mais negligenciadas, afetando principalmente os países mais pobres (Figura 1.6). A doença está presente em cinco continentes e é endêmica em 98 países, com 350 milhões de pessoas vivendo em zonas de risco e mais de 12 milhões de pessoas infectadas (DNDi, 2013).

Estimam-se cerca de 1 milhão de novos casos por ano para LC e 300 mil para LV. Mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em apenas seis países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Brasil e Etiópia. A LC é mais amplamente distribuída, sendo dez países representantes de 70 a 75% da incidência global estimada da LC: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (Avar e cols, 2012). A co-infecção *Leishmania*-HIV tem sido relatada em 35 países endêmicos e atualmente observa-se um crescente número de casos com impacto epidemiológico significativo (OMS, 2010).

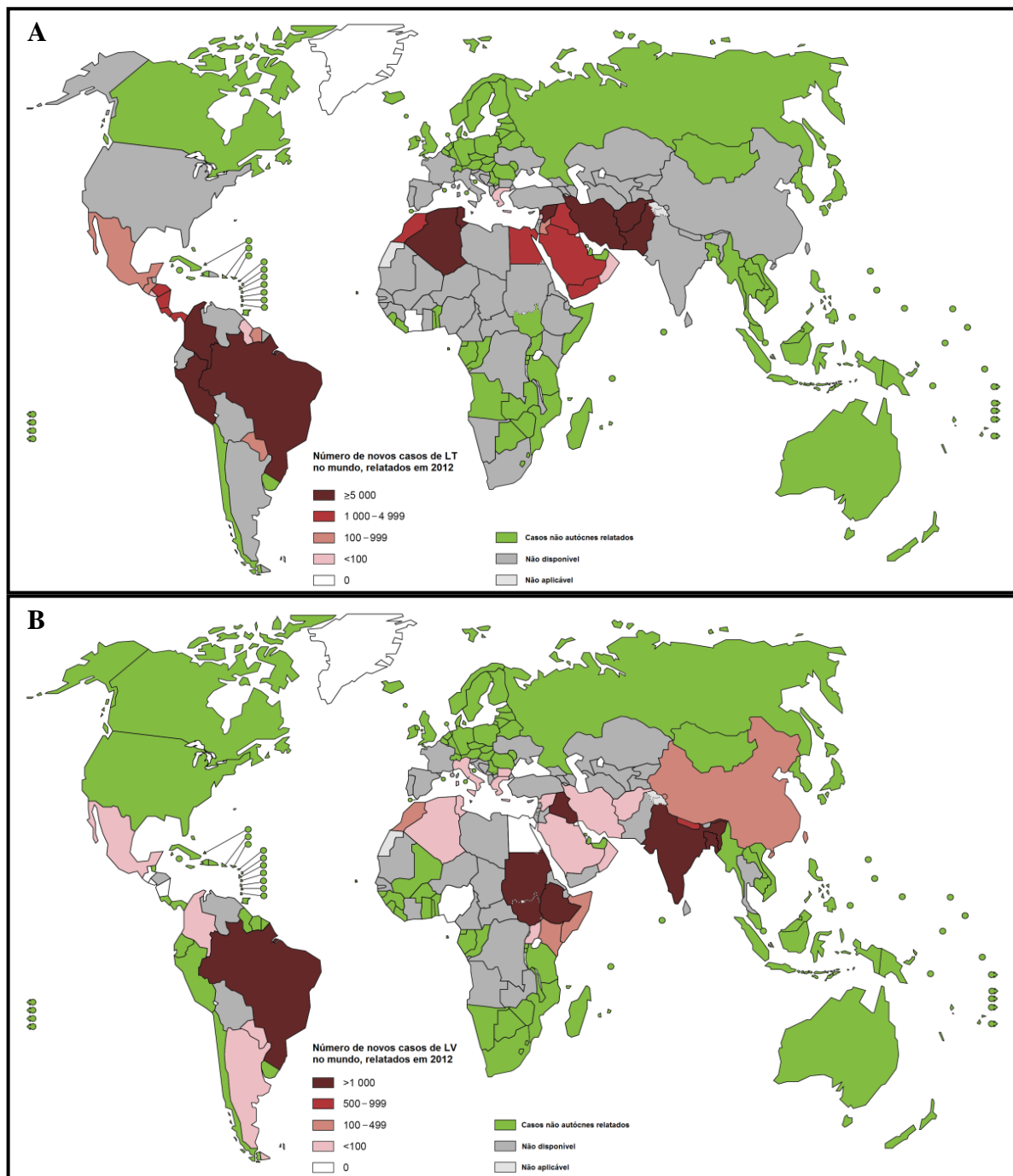


Figura 1.6: Endemicidade da (A) leishmaniose tegumentar e (B) visceral no mundo (OMS, 2012).

A leishmaniose é de grande interesse médico e econômico em diversos países da América Latina, estando inclusive inseridas na Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*Drugs for Neglected Diseases initiative, DNDi*). Em 18 países das Américas, foram registrados mais de 638 mil casos de LT entre 2001 e 2011. Brasil, Colômbia e Peru, juntos, respondem por 75,8% dos casos. No mesmo período, foram registrados mais de 38 mil casos de LV na região, com letalidade de 8,4%. No Brasil estão 96,6% dos casos de LV da

América Latina, sendo o maior número de casos registrado em crianças menores de 5 anos (DNDi, 2013).

Há um crescente corpo de dados destacando que o impacto na saúde mundial das leishmanioses é subestimado devido a múltiplos fatores como o aumento da prevalência da doença, casos não registrados e expansão em áreas de endemicidade (Antinori e cols, 2012). A doença está associada à desnutrição, ao deslocamento populacional, às condições precárias de habitação, à falta de recursos, a um sistema imunológico fraco, a modificações ambientais (como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização) e a mudanças climáticas (OMS, 2014).

Uma modelagem geoestatística bayesiana da incidência da leishmaniose cutânea e visceral no Brasil, no período de 10 anos (2001-2010), sugerem a grande influência de preditores ambientais e sócioeconômicos em nosso país. Para os dois tipos de leishmaniose, as precipitações e os indicadores socioeconômicos foram identificados como importantes fatores de risco (Karagiannis-Voules e cols, 2013) (Figura 1.7).

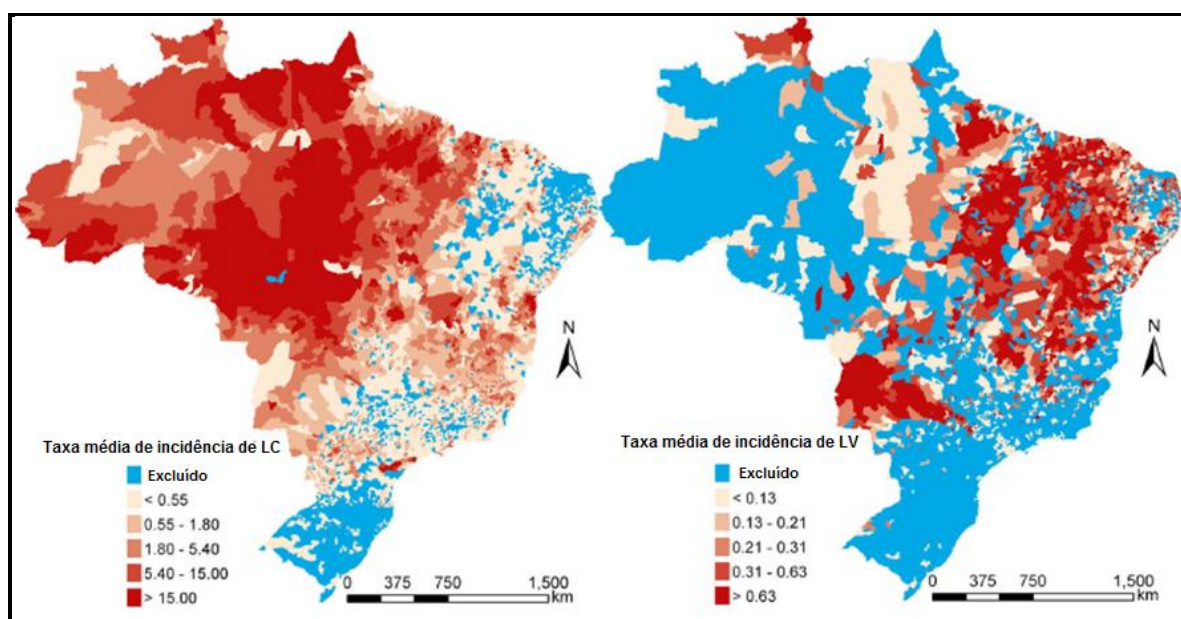


Figura 1.7: Taxas brutas de incidência da leishmaniose no Brasil. Taxas brutas de incidência (por 10.000 pessoas) em média durante um período de 10 anos (2001-2010) para a leishmaniose cutânea (esquerda) e para a leishmaniose visceral (direita). Municípios coloridas em azul, foram excluídos da análise por falta de dados. (Adaptado de Karagiannis-Voules e cols, 2013).

1.2. Tratamento

O tratamento atualmente proposto para as leishmanioses está associado a diversos problemas como longa duração, baixa eficácia, elevada toxicidade, dificuldades de administração, altos custos e crescente resistência clínica ao tratamento em várias partes do

mundo (Singh e cols, 2012; Goto, 2009; Croft, 2003). Por este motivo, torna-se indispensável a busca por novas drogas leishmanicidas e a identificação de novos alvos potenciais para o desenvolvimento de agentes mais eficazes contra o parasito.

A síntese e investigação de novas moléculas (e derivados e análogos), a triagem de compostos a partir de fontes naturais herbais com promissora atividade leishmanicida, o desenvolvimento de sistemas de liberação de droga para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade, e os protocolos de terapias combinadas são algumas das principais estratégias para o desenvolvimento de novas terapias contra a doença (Jain, 2013).

Infelizmente, não há vacinas seguras e eficazes disponíveis para os seres humanos. A única vacina de sucesso é ativa somente na transmissão da leishmaniose canina (Kobets e cols, 2012). A quimioterapia permanece como a única opção para o controle da infecção, embora nenhum fármaco atualmente utilizado seja totalmente efetivo (Cavalli e cols, 2009). O tratamento de primeira escolha inclui o antimonial pentavalente e, a depender da indicação, o isotionato de pentamidina, a anfotericina B desoxicolato e a anfotericina B lipossomal (Ministério da Saúde, 2011).

No Brasil, os medicamentos utilizados para o tratamento da LV são o antimoniato pentavalente e a anfotericina B. A escolha deverá considerar a faixa etária, presença de gravidez e comorbidades (Ministério da Saúde, 2011).

1.2.1 Antimoniais pentavalentes

O tratamento da leishmaniose, baseado no uso de antimoniais trivalentes, foi introduzido em 1912, pelo médico brasileiro Gaspar Vianna (Vianna, 1912). Desde a década de 1940, o tratamento de primeira escolha contra a infecção baseia-se no uso de antimoniais em sua forma pentavalente, mais refinada e com efeitos colaterais menos severos que os antimoniais trivalentes (Goodwin, 1995; Singh e cols, 2004). Os antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) são disponibilizados comercialmente em duas formulações, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogliconato de sódio (Pentostam®, não comercializado no Brasil), cujo modo de administração é por via intramuscular ou endovenosa (Masmoudi e cols, 2013).

Foi proposto que o Sb^{+5} se comporta como uma pró-droga, sendo reduzido por tióis a Sb^{+3} (antimônio trivalente, forma ativa e tóxica) no organismo hospedeiro. A glutatona (principal tiol no citosol de células de mamíferos), as cisteína e cisteína-glicina (tióis predominantes dentro dos lisossomos) e a tripanotona (tiol predominante no parasito) seriam fortes candidatos a redutores de Sb^{+5} a Sb^{+3} (Frézard e cols, 2009).

Seu mecanismo de ação não está totalmente elucidado, mas há indicativos que interferiram na bioenergética das formas amastigotas, inibindo enzimas glicolíticas e da oxidação de ácidos graxos, resultando na diminuição na produção de ATP e GTP. Além disso, os antimoniais parecem comprometer o potencial redox da célula através do efluxo de tios intracelulares e da inibição da tripanotiona redutase, uma enzima antioxidante do parasito. Foi mostrado também que inibem a topoisomerase I e que causam fragmentação de DNA (Ministério da Saúde, 2007; Frézard e cols, 2009; Goto e Lindoso, 2010; Van Assche e cols, 2011; Kobets e cols, 2012).

Os casos de resistência clínica aos antimoniais têm aumentado progressivamente em várias partes do mundo, principalmente na Índia. O longo curso de tratamento e a retenção do antimônio nos tecidos provocam um acúmulo de droga no baço e fígado, causando diversos efeitos colaterais tóxicos que levam ao abandono do tratamento. Os efeitos adversos incluem artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, nervosismo, choque pirogênico e edema, pancreatite, hepato, nefro e cardiotoxicidade. Os antimoniais pentavalentes não devem ser administrados em gestantes, idosos, coinfectados com HIV, portadores de cardiopatias, nefropatias ou hepatopatias e doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2007; Masmoudi, 2013).

1.2.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico (e antifúngico) poliênico, utilizado no tratamento da LV, LC e LM, sendo o medicamento de primeira escolha para a LV na Índia, onde há resistência ao antimonial (Croft e Olliaro, 2011). Duas apresentações de anfotericina B são disponibilizadas pelo Ministério da Saúde: o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal. Devido à toxicidade do desoxicolato de anfotericina B, foi ampliada a indicação da anfotericina B lipossomal como tratamento de primeira escolha para pacientes diagnosticados com leishmaniose visceral e que atendam pelo menos a um dos seguintes critérios: idade menor que 1 ano ou maior que 50 anos; insuficiência renal, hepática ou cardíaca; transplantados cardíacos, renais ou hepáticos; hipersensibilidade ou falha terapêutica ao antimoniato de N-metil glucamina; infecção pelo HIV; comorbidades que comprometam a imunidade; e gestantes (Ministério da Saúde, 2013).

A atividade leishmanicida da anfotericina B é atribuída à sua afinidade pelo ergosterol, um esterol constitutivo da membrana plasmática da *Leishmania*. A droga induz a formação de poros aquosos na membrana do parasito, levando-os à morte (Kobets e cols, 2012). No

entanto, esse composto também se liga em menores proporções ao colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos, induzindo efeitos adversos sobre os pacientes, como: anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, calafrios, febre, flebite, anemia, convulsões, anorexia e nefrotoxicidade (Carvalho e cols, 2000). Outras desvantagens da anfotericina B são a baixa solubilidade em água, baixa biodisponibilidade, a necessidade de administração por infusão lenta (o que requer hospitalização) e as reações à infusão (Kobets e cols, 2012).

Novas formulações lipídicas desse fármaco possibilitaram uma diminuição dos efeitos tóxicos e maior eficácia. Estas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®). Entretanto, apresentam alto custo, dificultando sua utilização em países pobres (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009; Maltezou, 2010).

1.2.3 Pentamidina

A pentamidina é uma diamidina aromática administrada por via parenteral, utilizada como segunda escolha no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral resistentes aos antimoniais (Piscopo e Mallia, 2006) e no tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral em algumas regiões do Novo Mundo (Goto e Lindoso, 2010), podendo também ser utilizada como o medicamento de primeira escolha (David e Craft, 2009). É comercializada em duas formulações: Isotionato (di-β-hidroxietano sulfonato) e Mesilato (di-β-hidroximetilssulfonato) (Ministério da Saúde, 2007).

A pentamidina desencadeia a morte do parasito por interferir na síntese do seu DNA, induzindo modificações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação da membrana mitocondrial (Goto e Lindoso, 2010; Kobets e cols, 2012). O uso deste fármaco tem sido limitado devido à sua toxicidade levando a sintomas como dores locais, dores de cabeça, hipotensão, síncope, hipoglicemia ou hiperglicemia, náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade (Goto e Lindoso, 2010; David e Craft, 2009; Ministério da Saúde, 2007).

1.2.4 Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi inicialmente desenvolvida como droga anti-tumoral, sendo a primeira droga no tratamento da leishmaniose por via oral a entrar no mercado. Seu mecanismo de ação parece incluir alterações significativas no metabolismo e na membrana plasmática (composição, permeabilidade e fluidez) do parasito, inibição da citocromo c oxidase (o que resulta na diminuição significativa dos níveis de ATP intracelular,

redução da taxa de consumo de oxigênio e despolarização mitocondrial), e indução à apoptose (Paris e cols, 2004; Kobets e cols, 2012). Além disso, parece induzir um aumento na quantidade de receptores de IFN- γ , elevando conseqüentemente a resposta de macrófagos infectados para o controle da infecção (Maltezou, 2010).

Os problemas relacionados à utilização da miltefosina incluem efeitos colaterais diversos, como distúrbios gastrointestinais, toxicidade hematológica e renal, seu potencial teratogênico o que a leva ser contra indicada às gestantes, e a ocorrência de resistência. Ressalta-se ainda, o alto custo deste composto como um fator que limita sua utilização (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009; Masmoudi e cols, 2013).

1.2.5 Paramomicina

A paramomicina é um aminoglicosídeo antibiótico com atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo*. Ela tem sido utilizada por aplicação tópica e parenteral no tratamento da LT no Novo e Velho Mundo (Goto e Lindoso, 2010). Os efeitos adversos encontrados nos pacientes tratados com essas formulações foram erupções cutâneas e prurido local (Sundar e Chakravarty, 2008).

Seu mecanismo de ação exato não é claro, mas o composto parece induzir uma queda na atividade de desidrogenases mitocondriais e a perda do potencial de membrana mitocondrial do parasito, inibir a síntese de proteínas e RNA, e aumentar a quantidade de lipídios polares membranosos, levando à diminuição da fluidez da membrana (Kobets e cols, 2012).

1.2.6 Tratamentos alternativos

Vários outros fármacos têm sido utilizados como medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses. Os azóis, por exemplo, inicialmente desenvolvidos para o tratamento de infecções fúngicas, têm sido usados para o tratamento da LC. Alguns estudos demonstraram eficácia do fluconazol, cetoconazol e itraconazol, com taxas de cura que variaram entre 55% e 79% no Velho Mundo. Essas drogas inibem a biossíntese do ergosterol, promovendo a permeabilização da membrana da *Leishmania* (Goto e Lindoso, 2010).

A azitromicina, um antibiótico de amplo espectro utilizado para o tratamento de várias infecções bacterianas, mostrou efeito contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi in vitro*, no entanto seu mecanismo de ação ainda não está claro e mostrou somente 45,5% de taxa de cura durante o tratamento da LC causada por *L. braziliensis* (Kobets e cols, 2012).

O alopurinol, um inibidor da xantina oxidase, utilizado em associação com os antimoniais, também apresentou resultados bastante divergentes. A droga sozinha não foi eficaz, mas em associação com uma dose baixa de antimônio, mostrou resultados semelhantes aos obtidos com doses completas de antimônio (Goto e Lindoso, 2010). A *Leishmania* metabolizaria o alopurinol para um análogo de nucleotídeos de adenosina, o qual é incorporado no RNA. A síntese de proteínas seria então interrompida, resultando no efeito leishmaniostático do alopurinol (Kobets e cols, 2012).

Os antibióticos dapsona e rifampicina também têm sido usados para tratar leishmaniose. A dapsona mostrou-se efetiva no tratamento oral da LC no Velho Mundo, com uma taxa de cura de 82%, mas uma resposta muito fraca foi observada no Novo Mundo. A rifampicina isoladamente ou em combinação com outras drogas apresentou resultados divergentes, com taxas de cura entre 70-80% (Goto e Lindoso, 2010; Kobets e cols, 2012).

A sitamaquina, um análogo da 8-aminoquinolina administrado por via oral, foi testada para o tratamento da LV. O fármaco acumula-se no citosol da *Leishmania* através da interação com moléculas de fosfolípidos presentes na membrana biológica do parasito e seu mecanismo de ação parece envolver a inibição dose-dependente do complexo II (succinato desidrogenase) da cadeia respiratória, a promoção de estresse oxidativo e apoptose na *Leishmania*. Os testes clínicos mostraram taxas de cura bastante variáveis e efeitos nefrotóxicos (Kobets e cols, 2012; Jain, 2013).

A terapia combinada de medicamentos leishmanicidas existentes tem sido uma estratégia atraente. As principais vantagens são melhor eficácia no tratamento, redução do tempo de tratamento ou da dose total das drogas, menos efeitos tóxicos, maior adesão, redução de custos e baixo desenvolvimento de resistência. (Jain, 2013; Monge-Maillo e López-Vélez, 2013). Por outro lado, inovações nos sistemas de liberação de fármacos também têm surgido para melhorar a adesão e eficácia terapêutica. Novas formulações (em lipossomas, nanopartículas, nanotubos ou microesferas, por exemplo) podem trazer diversas vantagens, como: concentrar a droga nos tecidos afetados ou nas células-alvo, evitando toxicidade; proteger o fármaco contra a degradação em fluidos biológicos; permitir a administração por novas vias; resolver problemas de baixa solubilidade em água; e poder ser projetado para transportar mais de uma droga de uma vez, viabilizando ainda mais a terapia combinada (Pham e cols, 2013; Jain, 2013). Nanopartículas de ouro conjugadas ao composto bioativo quercetina, por exemplo, resultaram numa captura rápida (em uma hora) e completa por macrófagos e exibiram atividade leishmanicida contra cepas de *L. donovani* resistentes a estibogluconato de sódio e paramomicina (Jain, 2013).

Algumas modalidades de tratamento físico, como a terapia fotodinâmica, a termoterapia e a crioterapia, têm sido utilizadas para tratar LC (Monge-Maillo e López-Vélez, 2013). O efeito da terapia fotodinâmica ocorre quando moléculas de um fotossensibilizador localizado no tecido alvo absorvem luz do comprimento de onda específico e transferem energia para aceptores biológicos, gerando um excesso de espécies reativas de oxigênio que induzem vias de morte nas células (Bastos e cols, 2012). A termoterapia baseia-se na aplicação local de calor, usando circulação de água quente, almofadas de aquecimento, calor infravermelho e luz ultravioleta. A crioterapia usando CO₂ ou N₂ líquido também tem sido usada em lesões pequenas e não-ulceradas, no entanto a eficácia desta permanece questionável (Goto e Lindoso, 2010; Kobets e cols, 2012; Monge-Maillo e López-Vélez, 2013; Masmoudi, 2013).

1.3 Produtos naturais com atividade leishmanicida

O reino vegetal é sem dúvida uma fonte valiosa de novos agentes medicinais. Várias substâncias, hoje utilizadas em terapias, são originadas de plantas, fundamentais para a triagem de metabolitos secundários bioativos que produzem compostos farmacologicamente úteis. Estas substâncias podem ser fonte de conhecimento para a síntese de derivados com melhor perfil terapêutico (Polonio e Efferth, 2008; Ndjonka e cols, 2013).

A pesquisa de novos medicamentos, a partir de fontes naturais, é amplamente utilizada como abordagem bem sucedida para a detecção de compostos ativos para o tratamento de doenças parasitárias negligenciadas (Fournet e Muñoz, 2002; Kaiser e cols, 2003; Rocha e cols, 2005; Polonio e Efferth, 2008; Schmidt e cols, 2012; Ndjonka e cols, 2013). Compostos puros obtidos de plantas, como certos alcalóides, terpenos, chalconas, quinonas, saponinas, glicosídeos iridóides, flavonoides e lignanas, exibiram atividade antileishmaniana (Rocha e cols, 2005; Gil e cols, 2008; Brito e cols, 2013). Uma série de representantes da classe dos flavonoides, como a quercetina, luteolina, epigallocatequina-3-galato e outros, apresentaram atividade contra *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* sp (Sepulveda-Boza & Cassels, 1996; Muzitano e cols 2006; Tasdemir e cols, 2006; Guida e cols, 2007; Lehane e Saliba, 2008; Fonseca-Silva e cols, 2011; 2013; Inacio e cols, 2012; 2013).

1.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo grande e complexo de polifenóis, consistindo em um núcleo flavan, com dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono (Figura 1.8)

(Hoensech e Oertel, 2012). São metabólitos secundários presentes em frutas, vegetais, vinho, chás e café e podem ser classificados em: flavonas, flavononas, flavanóis (ou catequinas), flavonóis, antocianidinas, isoflavonoides e neoflavonoides, dentre outros (Lehane e Saliba, 2008; Czaplínska e cols, 2012).

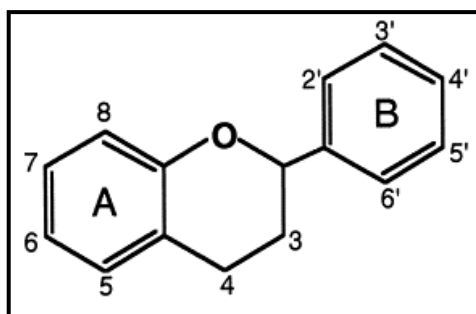


Figura 1.8: Estrutura básica do flavonoide (Sugihara e cols, 1999)

Nas plantas, os flavonoides desempenham papéis importantes nas raízes, no transporte de auxina, no desenvolvimento da parte aérea, na polinização, na modulação de espécies reativas de oxigênio, no crescimento e proteção contra patógenos. Além disso, os flavonoides estão atraindo o interesse médico por suas atividades antiparasitárias, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiinflamatórias e antineoplásicas (Weston e Mathesius, 2013).

1.3.2 Apigenina

A apigenina, quimicamente denominada 4',5,7-trihidroxiflavona (Figura 1.9), é um membro da subclasse flavona dos flavonoides e está abundantemente presente em frutas, ervas e legumes comuns, como laranja, camomila, salsa, tomilho, aipo, cebola e pimentão. Acredita-se que este composto tenha várias atividades biológicas, incluindo efeitos antiinflamatórios, antineoplásicos, antivirais, purgativos e propriedades removedoras de radicais livres. Esta flavona apresenta baixa toxicidade intrínseca e é declaradamente não-mutagênica (Shukla e Gupta, 2010; Zhu e cols, 2013).

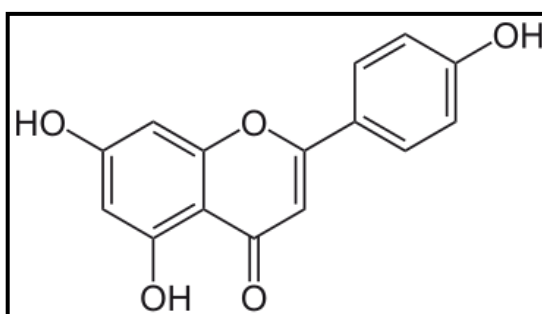


Figura 1.9: Estrutura química da apigenina (Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Apigenina>)

Estudos com linhagens de células cancerosas têm mostrado que a apigenina inibe o crescimento através da indução de apoptose e bloqueio do ciclo celular (Choi e Kim, 2009; Shukla e Gupta, 2010; Zhu e cols, 2013). Além da atividade contra células cancerosas, a apigenina mostrou inibir a replicação *in vitro* de *Encephalitozoon intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*, *L. donovani*, *T. brucei rhodesiense* e *Trypanosoma cruzi* (Mead e McNair, 2006; Tasdemir e cols, 2006).

Vários estudos têm demonstrado que este flavonoide exerce uma vasta gama de efeitos na sinalização molecular, como a inibição da atividade da proteína cinase C (PKC), de proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs), de tirosina-cinases e da caseína cinase-2 (CK2). Em células malignas, a apigenina demonstrou induzir parada reversível das fases G2/M e G0/G1 por inibir a atividade de p34 (cdc2) acompanhada do aumento da estabilidade da proteína p53. Outros alvos da apigenina incluem proteínas de choque térmico, telomerase, ácido graxo sintase e metaloproteinases (Shukla e Gupta, 2010).

1.4 Mitocôndria e produção de espécies reativas de oxigênio em tripanosomatídeos

A mitocôndria é uma organela de dupla membrana responsável pela produção de energia e envolvida no crescimento, diferenciação, homeostase do cálcio, equilíbrio redox, resposta à estresses e morte. A organização compartimentalizada da mitocôndria fornece um microambiente ótimo para muitos processos biossintéticos e catabólicos (Menna-Barreto e De Castro, 2014). Cada mitocôndria é limitada por duas membranas altamente especializadas com funções vitais para a atividade da organela, delimitando o espaço intermembranar e a matriz. A parte mais funcional da mitocôndria é a matriz, onde ocorre a quebra do piruvato, a β -oxidação de ácidos graxos e o ciclo do ácido cítrico, e a membrana interna, cujas cristas situam a cadeia transportadora de elétrons (Alberts e cols, 2010).

A diferença morfológica mais notável entre as mitocôndrias de eucariotos superiores e de tripanosomatídeos é o número e o volume relativo destas organelas. Milhares de mitocôndrias podem ser detectadas em células de mamíferos, o que representa cerca 20% do volume total celular, enquanto apenas uma única e ramificada organela é observada nos parasitos da ordem Kinetoplastida. Outra característica peculiar é a organização do DNA no cinetoplasto. Nestes protozoários, o genoma mitocondrial é composto de uma rede complexa de anéis de DNA entrelaçados subdivididos em duas classes: maxicírculos e minicírculos, representando aproximadamente 30% do genoma celular total (Menna-Barreto e De Castro, 2014).

A manutenção do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é fundamental para o metabolismo energético e para a própria sobrevivência do parasito (Fidalgo e Gille, 2011), sendo variações no $\Delta\Psi_m$ induzidas por fármacos diretamente associadas à inibição da proliferação celular em *T. cruzi*, *L. donovani* e *L. amazonensis* (Menna-Barreto e cols, 2009; Mukherjee e cols, 2009; Mehta e Shaha, 2006; Rodrigues e cols, 2007; Fonseca-Silva e cols, 2011; Inácio e cols, 2012).

Alterações na cadeia transportadora de elétrons podem resultar em libertação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo o desvio de elétrons a partir de complexos mitocondriais sua principal fonte endógena. ERO são moléculas formadas após uma redução incompleta de oxigênio e, dentre as principais, destacam-se: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^{\bullet}). Os radicais livres são espécies que apresentam elétrons desemparelhados, que os tornam altamente instáveis e reativas. Em níveis normais, essas ERO desempenham importantes papéis biológicos, entretanto o seu excesso pode gerar uma variedade de patologias que podem levar à morte (Fidalgo e Gille, 2011; Brieger e cols, 2012).

Em resposta a alterações no ambiente intracelular por diferentes sinais de estresse, tais como uma perda de fatores de crescimento, hipóxia, estresse oxidativo e dano de DNA, as mitocôndrias tornam-se produtoras de ERO em excesso e libertam proteínas pró-morte, resultando na interrupção da síntese de ATP na ativação de vias de morte celular. Durante o estresse, tanto a via autofágica quanto a apoptótica são ativadas, e a mitofagia é uma resposta inicial que promove a sobrevivência pela remoção de mitocôndrias danificadas (Menna-Barreto e De Castro, 2014).

Em parasitos do gênero *Leishmania*, a liberação de ERO possui uma capacidade poderosa de gerar danos celulares, diretamente nas proteínas, DNA e lipídios de membrana, além de estarem diretamente envolvidas no processo de morte celular programada (Fidalgo e Gille, 2011). Foi demonstrado que a apoptose em *T. brucei* está associada com um aumento intracelular de ERO e o pré-tratamento com glutathiona reduzida (GSH) ou N-acetil-L-cisteína (NAC), inibiram a apoptose. A manutenção de um equilíbrio redox intracelular parece ter um papel crucial na indução da apoptose em tripanosomatídeos e sugerem o envolvimento de ERO como mediadores da sinalização de indução de apoptose (Figarella e cols, 2006).

1.5 Morte celular em organismos unicelulares

A morte celular pode ser classificada de acordo com diferentes critérios: aparência morfológica (que pode ser por apoptótica, necrótica ou autofágica), enzimáticos (com e

sem o envolvimento de nucleases ou de classes distintas de proteases), aspectos funcionais (programada ou acidental, fisiológica ou patológica) ou características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica) (Kroemer e cols, 2009). O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular reconhece modalidades distintas de morte celular: autofagia, apoptose intrínseca, apoptose extrínseca, cornificação, entose, catástrofe mitótica, necrose, necroptose (necrose regulada), netose, piroptose, entre outras (Galluzzi e cols, 2012). A tabela 1.1 abaixo mostra as principais modalidades de morte celular e suas características morfológicas e bioquímicas.

Tabela 1.1 – Principais modalidades de morte celular e suas características

Tipo de morte celular	Características morfológicas e bioquímicas
Apoptose	Arredondando da célula Retração de pseudopodes Redução de volume celular e nuclear (picnose) Fragmentação nuclear (cariorrexe) <i>Blebbing</i> membrana plasmática Externalização da fosfatidilserina Formação de corpos apoptóticos Clivagem proteolítica de substratos intracelulares por caspases Perda do $\Delta\Psi_m$ Declínio do nível de ATP celular Liberação do citocromo C e da endonuclease G Aumento dos níveis citosólicos de cálcio Produção de ERO Englobamento pelos fagócitos residentes (<i>in vivo</i>) Ausência de processo inflamatório
Autofagia	Perda de condensação da cromatina Vacuolização maciça do citoplasma Acúmulo de autofagossomos (de dupla membrana) Lipidação da MAP1LC3 Degradação de SQSTM1 Pouca ou nenhuma absorção pelas células fagocíticas (<i>in vivo</i>)
Necrose	Inchaço citoplasmático (oncose) Ruptura da membrana plasmática Inchaço das organelas citoplasmáticas Condensação moderada da cromatina Presença de processo inflamatório

A apoptose é um fenótipo de morte celular programada crucial em muitos processos biológicos, como na embriogênese, na homeostase tecidual e no controle de doenças em metazoários. Ocorre tanto em condições normais quanto em tecidos patologicamente alterados, como um mecanismo de equilíbrio da renovação celular na proliferação e regeneração de tecidos, ou de remoção de células infectadas ou danificadas do organismo. Variações do mecanismo clássico de apoptose são encontradas em uma ampla variedade de organismos e as principais proteínas regulatórias deste processo apresentam tipos homólogos entre as espécies. Assim como qualquer outro processo celular altamente regulado, a apoptose

é caracterizada por marcadores morfológicos específicos e por cascatas bioquímicas (Martinez e cols, 2010). É iniciada pela transdução de sinais de estresse originados de fontes extracelulares (via extrínseca, envolvendo a interação de ligantes e seus receptores de morte - FasL/FasR e o TNF- α /TNFR1) ou intracelulares (via intrínseca, envolvendo alterações mitocondriais) (Proto e cols, 2013).

A ocorrência de morte celular programada com características apoptóticas já foi descrita em vários organismos unicelulares, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia*, *Dictyostelium discoideum*, *Dunaliella tertiolecta*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plasmodium berghei*, *P. falciparum*, *Peridinium gatunense*, *Amphidinium carterae*, *Tetrahymena thermophila*, *Blastocystis hominis*, *Leishmania amazonensis*, *L. donovani*, *L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum*, *T. cruzi*, *T. brucei*, *Toxoplasma gondii*, *Trichomonas vaginalis* e *Trichomonas foetus* (Deponte, 2008; Gannavaram e Debrabant, 2012). Em tripanosomatídeos, a morte celular programada foi relatada em resposta a uma grande variedade de estímulos, tais como o choque térmico, ERO, drogas antiparasitárias, prostaglandinas e os peptídeos antimicrobianos (Gannavaram e Debrabant, 2012). Diversos estudos *in vitro* têm demonstrado a ocorrência de apoptose-like em *Leishmania* em resposta a diferentes compostos antileishmaniais (Shaha, 2006).

A autofagia é um mecanismo catabólico intracelular de degradação e reciclagem de componentes do citosol para a manutenção da homeostase celular em condições adversas como privação de nutrientes, presença de patógenos e toxinas. Tem sido relacionada a muitos processos fisiológicos, como crescimento celular, desenvolvimento e diferenciação. Contudo, apesar dos papéis pró-sobrevivência, em certas circunstâncias, pode também representar um subtipo específico de morte celular regulada - a morte celular autofágica, caracterizada pela formação de uma organela de dupla membrana, o autofagossomo, em torno da carga destinada à degradação lisossomal. Proteínas envolvidas na macroautofagia (autofagia não-seletiva) foram designados proteínas Atg. Por outro lado, a microautofagia caracteriza-se pela absorção de uma parte do citoplasma por invaginação direto da membrana vacuolar e não envolve Atgs. Outras vias autofágicas são a via Cvt (citoplasma para vacúolo alvo) e as vias seletivas de degradação de organelas em excesso ou danificadas, como pexofagia, mitofagia, reticulofagia, ribofagia e microautofagia de núcleo (Kiel, 2010; Brennand e cols, 2012; Proto e cols, 2013).

Embora a autofagia em eucariotos unicelulares tenha sido principalmente estudada em *Saccharomyces cerevisiae*, este processo tem sido observado em muitas outras espécies, como tricomonídeos, tripanosomatídeos e amebas (Kiel, 2010). O banco genômico de tripanosomatídeos e a gama de ATGs identificados em leveduras têm sido utilizados para prever uma via autofágica conservada em parasitos. Para o marcador Atg8, mais de um gene

foi identificado para cada um dos tripanosomatídeos: três para *T. brucei*, dois para *T. cruzi* e, surpreendentemente, quatro famílias que compreendem juntos 25 genes para *L. major*. (Ridgen e cols, 2005; Herman e cols, 2006; Duszenko e cols, 2011; Brennand e cols, 2012)

O termo necrose foi inicialmente utilizado para designar um tipo de morte celular acidental, que ocorre de forma não programada, sem os intrincados mecanismos regulatórios característicos de apoptose e autofagia. Embora tenha sido inicialmente considerada como um tipo de morte celular não programada, estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser regulada por um conjunto de sinais de transdução (como receptores de morte ou receptores *Toll-like*, por exemplo) ou mecanismos catabólicos (Kroemer e cols, 2009).

Proto e cols (2013) sugerem, diante da dificuldade em reconhecer a presença de marcadores morfológicos específicos, que a morte celular em protozoários parasitos pode ser classificada em apenas dois tipos primários: necrose e morte incidental (Figura 1.10). A morte incidental seria o melhor termo para relacionar os protozoários parasitos, pois evita quaisquer conotações antropomórficas e fornece clara distinção do termo necrose acidental. Embora seja clara a morte de parasitos em condições de estresse extremo, os processos que a regulam ainda são desconhecidos (Proto e cols, 2013).

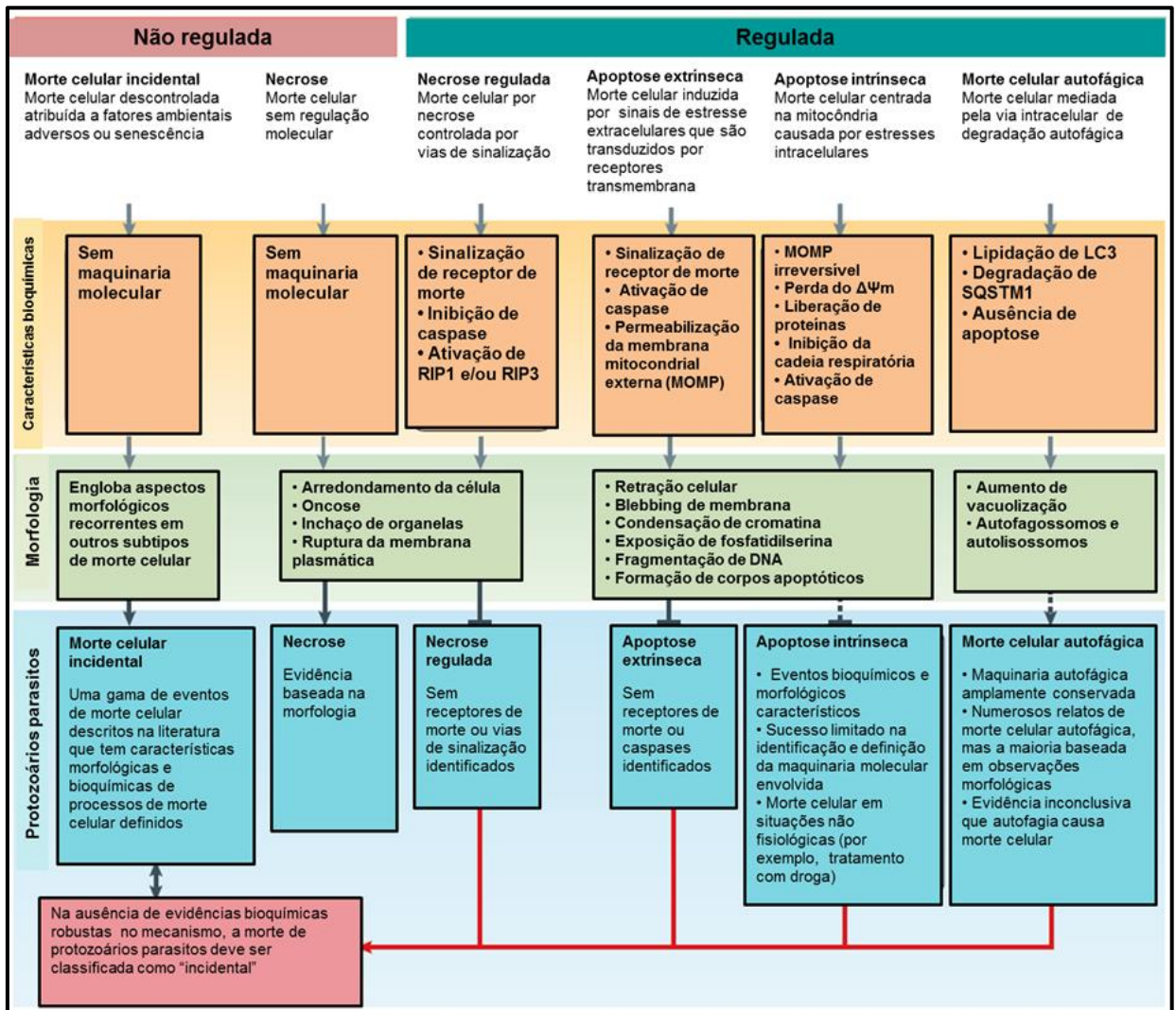


Figura 1.10: As principais modalidades de morte celular em eucariotos. (Adaptado de Proto e cols, 2013)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Estudar o efeito *in vitro* e *in vivo* da apigenina sobre *Leishmania amazonensis*, identificando eventos bioquímicos envolvidos na morte deste parasito.

2.2 Objetivos específicos:

- Elucidar o efeito direto da apigenina nas diferentes formas de *L. amazonensis*;
- Mensurar a formação de ERO em promastigotas e macrófagos infectados com *L. amazonensis* após o tratamento com apigenina, e avaliar o efeito de antioxidantes diante deste tratamento;
- Avaliar o $\Delta\Psi_m$, o ciclo celular, o potencial proliferativo, a permeabilidade da membrana plasmática, a ocorrência de fragmentação de DNA e a ultraestrutura de promastigotas tratados com apigenina;
- Investigar a citotoxicidade da apigenina em macrófagos peritoneais murinos e analisar a ultraestrutura dos macrófagos infectados e tratados com o composto;
- Avaliar o efeito *in vivo* da apigenina em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

A apigenina ($\geq 97\%$ de pureza por HPLC) foi obtida comercialmente da Sigma Aldrich (St Louis, EUA), preparada em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída em meio de cultura para uma concentração final de 0,2% (v/v). O H₂DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína), o *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina), o *AlamarBlue*[®] e o CFSE (carboxifluoresceína N-succinimidil éster) foram obtidos pela Invitrogen Molecular Probes (Eugene, EUA). O FCCP (carbonil cianeto 4-trifluorometoxi fenil hidrazona), o JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina), o PI (iodeto de propídeo), a NAC (N-acetil-cisteína), a GSH (glutathiona reduzida), a GSSG (glutathiona oxidada) e o paclitaxel também foram obtidos a Sigma Aldrich. Todos os outros reagentes foram adquiridos da Merck (SP, Brasil). A água destilada deionizada foi obtida pelo sistema Milli-Q (Millipore Corp) e utilizada na preparação das soluções. O antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil), utilizado como fármaco de referência no experimento *in vivo*, foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ).

3.2 Parasitos e animais

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) foram mantidas a 26°C em meio Schneider suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 100µg/mL estreptomicina, e 100U/mL penicilina (Sigma-Aldrich). Para manutenção dos parasitos foram feitos repiques a cada três dias. Os parasitos foram obtidos de lesão de camundongos BALB/c, e mantidos *in vitro* como promastigotas até, no máximo, a décima passagem. Para a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*, foram utilizados camundongos Suíço webster e BALB/c, respectivamente, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL/FIOCRUZ-RJ). Todos os protocolos usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (LW-07/10).

3.3 Ensaios *in vitro*

3.3.1 Verificação da atividade leishmanicida da apigenina

O efeito *in vitro* da apigenina em promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado pela incubação de 5×10^6 parasitos/mL na ausência (0,2% DMSO v/v) ou na presença de concentrações crescentes do composto (3-96 μ M) por 24 h, a 26°C. Inicialmente, foram preparadas concentrações-estoque (1,5-48 mM), das quais foi retirado o mesmo volume do composto diluído em 100% DMSO (2 μ L), para um volume final de 1 mL. O número de células viáveis foi estimado a partir da contagem direta em câmara de Neubauer. O cálculo do IC₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), conforme adaptado de Fonseca-Silva e cols (2011).

Para avaliar a atividade da apigenina sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, camundongos foram submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI-1640 gelado (Sigma Aldrich) suplementado com 10% SFB, 100U/mL penicilina e 100 μ g/mL estreptomicina. Posteriormente, 400 μ L de 2×10^6 células/mL foram plaqueados em lâminas LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, EUA) e incubadas por 1 h a 37°C / 5% CO₂ para a adesão. Em seguida, as lâminas foram lavadas com meio RPMI a 37°C para a remoção das células não aderentes; e as aderidas foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na proporção de 3:1 (3 promastigotas para 1 macrófago), e incubadas por 3 h a 37°C / 5% CO₂. Após a infecção, as lâminas foram lavadas com meio RPMI a 37°C para a retirada dos parasitos livres e, em seguida, tratadas por 72 h com 0-12 μ M de apigenina, a 37°C / 5% CO₂. Passado o período de tratamento, as lâminas foram submetidas à coloração pelo kit de corantes hematológicos *Instant Prov* (Newprov, Curitiba, Brasil) e a atividade anti-amastigota foi avaliada microscopicamente pela contagem mínima de 200 macrófagos por amostra. O resultado foi expresso pelo cálculo do índice de infecção (IF), obtido pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número de amastigotas por macrófagos totais. O cálculo do IC₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 5.0*. A metodologia deste ensaio foi descrita por Cunha-Júnior e colaboradores (2011).

3.3.2 Avaliação da produção de ERO

A produção de ERO em *L. amazonensis* foi mensurada através do indicador celular permeável H₂DCFDA (Invitrogen, Eugene, EUA). Após a incubação na ausência (0,2% DMSO v/v) ou na presença de concentrações crescentes de apigenina (3-96 μ M), promastigotas de *L. amazonensis* foram centrifugadas, ressuspensas em tampão salino HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*), ajustadas para a concentração de 1×10^7 promastigotas/mL e incubadas com 20 μ M H₂DCFDA no escuro, a 26°C, por 20 min (Fonseca-Silva e cols, 2011). Após a clivagem dos grupos acetato por esterases intracelulares

e sua oxidação, o H₂DCFDA (reduzido e não fluorescente) é convertido para o 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), altamente fluorescente. O controle positivo foi obtido pela reação de 20U/mL glicose oxidase + 60mM glicose por 20 min. A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, EUA), equipado com o programa de computador Cell Quest (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, EUA).

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com apigenina foi mensurada fluorimetricamente, após a incubação com 100µM *Amplex Red*, 1U/mL peroxidase (Invitrogen, Eugene, EUA) e 64µM digitonina por 30 min (Menna-Barreto e cols, 2009). O reagente *Amplex Red* é uma sonda altamente sensível e estável para H₂O₂, e um substrato fluorogênico para peroxidase. Na presença de peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP), ele reage estequiometricamente (1:1) com H₂O₂ e produz resorufina altamente fluorescente. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados na ausência (0,2% DMSO v/v) ou presença de concentrações crescentes de apigenina (3-96µM) por 24 h. Após esse período de tempo, as células foram lavadas com HBSS e ajustadas a 2x10⁷ promastigotas/mL em solução de lise (0,5M fosfato de potássio; 0,25M cloreto de sódio; 25mM ácido fólico, 0,5% Tritton X-100 e 64µM digitonina (Sigma-Aldrich) juntamente com reagente de trabalho (10mM *Amplex Red* e 10U/mL peroxidase em HBSS), por 30 min no escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de excitação de 560nm e emissão 590nm. O controle positivo foi realizado através de curva de H₂O₂ na placa.

A produção de ERO também foi mensurada em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com apigenina. Macrófagos peritoneais murinos, obtidos conforme descrito no item anterior 3.3.1, foram incubados em placa de 96 poços e apenas um grupo foi infectado por 3 h (na proporção 3:1). Em seguida, foram tratados na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 3-12 µM apigenina por 72 h, a 37°C / 5% CO₂. Após o período de tratamento, os macrófagos foram lavados e incubados com 20µM H₂DCFDA em meio RPMI por 30 min, a 37°C. A produção de ERO foi então mensurada em espectrofluorímetro (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA), com comprimento de onda de excitação de 507nm e emissão de 530nm (Fonseca-Silva e cols, 2013).

3.3.3 Avaliação do efeito de antioxidantes sobre a atividade da apigenina

Para avaliar a influência de antioxidante sobre a atividade leishmanicida da apigenina, promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados em meio Schneider a 26°C, na ausência (0,2% DMSO v/v) ou na presença de 300µM NAC, GSH ou GSSG e de 96µM apigenina por

24 h. As células viáveis foram estimadas com contagem direta em câmara de Neubauer e os níveis de ERO foram mensurados fluorimetricamente usando 20 μ M H₂DCFDA, conforme descrito no item 3.3.2. Além dos promastigotas, macrófagos peritoneais murinos, obtidos, plaquados e infectados conforme descrito no item 3.3.1, também foram incubados com os antioxidantes NAC ou GSH (300 μ M) e tratados na ausência ou na presença de 3-12 μ M apigenina por 72 h. O IF foi avaliado por microscopia óptica, após coloração pelo kit hematológico *Instant Prov*, conforme também descrito no item 3.3.1.

3.3.4 Determinação do $\Delta\Psi_m$

A atividade mitocondrial foi avaliada pela utilização do JC-1, um corante catiônico mitocondrial vital, lipofílico e que se acumula na mitocôndria proporcionalmente ao $\Delta\Psi_m$. Dessa forma, em altos $\Delta\Psi_m$, ele forma agregados no interior da mitocôndria, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no estado agregado o corante fluoresce vermelho. Em células com danos mitocondriais ou alterações no $\Delta\Psi_m$, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e acumulando-se no citoplasma emitindo uma fluorescência verde. A despolarização mitocondrial é indicada por uma diminuição na proporção de intensidade de fluorescência vermelho/verde (Mehta e Shana, 2006).

Após a incubação por 24 h das promastigotas com diferentes concentrações de apigenina (0-96 μ M), as células foram lavadas, ressuspensas e ajustadas para 1x10⁷ promastigotas/mL em tampão HBSS e incubadas com 10 μ g/mL JC-1 por 10 min no escuro a 26°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000g por 15 min, ressuspensas em 1mL de HBSS e distribuídas em placa negra de 96 poços. O agente desacoplador do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa FCCP (20 μ M) (Sigma Aldrich) foi utilizado como controle positivo. Os valores de $\Delta\Psi_m$ foram obtidos por espectrofluorimetria nos seguintes comprimentos de onda: excitação 480 nm e emissão 530/590 nm. Os valores foram obtidos pela razão da emissão entre a fluorescência vermelho/verde (590/530) (Fonseca-Silva e cols, 2011).

3.3.5 Avaliação do ciclo celular

A quantidade de DNA em cada uma das fases do ciclo celular pode ser detectada por citometria de fluxo através da marcação com corantes que se intercalam aos ácidos nucleicos, como o iodeto de propídeo (PI). Na fase G₀/G₁ as células ainda não tiveram seus

cromossomos duplicados e apresentam-se com uma quantidade 1x de DNA. Na fase G2/M as células já tiveram seu DNA duplicado e apresentam-se com uma quantidade 2x de DNA. Na fase S o material genético está sendo duplicado e as células apresentam uma quantidade intermediária entre 1x e 2x de DNA. A quantidade de corante incorporado varia de acordo com o conteúdo de DNA das células. Células apoptóticas, nas quais o DNA encontra-se fragmentado, apresentam com intensidades de fluorescência mais baixa do que aquelas detectadas na fase G0/G1 e encontradas na região sub-G0/G1 (Nicoletti e cols, 1991). O aumento da proporção de células em sub-G0/G1 é sugestivo de células submetidas a um processo de apoptose (Ribeiro e cols, 2013).

O ciclo celular das promastigotas foi avaliado pela quantificação de DNA com PI incorporado, em células previamente fixadas, através de citometria de fluxo. Promastigotas tratados ou não com 12-96 μ M apigenina por 24 h foram fixados em etanol 70%, a -20°C por 1 h. Em seguida, as células foram centrifugadas e incubadas com 200 μ g/mL RNase por 1 h, a 37°C. Posteriormente, foram incubadas com 40 μ g/mL PI no escuro por 20 min e os dados foram adquiridos no citômetro (Ribeiro e cols, 2013).

3.3.6 Avaliação do potencial proliferativo

A avaliação do potencial proliferativo das promastigotas se deu pela marcação com o indicador intracelular CFSE (10 μ M) (Messaritakis e cols, 2010), seguida do tratamento com 12-96 μ M apigenina e 50 μ M paclitaxel (Taxol®) como controle leishmanioestático. As análises foram feitas no citômetro após 0 e 24 h de tratamento. A incorporação estável do CFSE nas células proporciona uma poderosa ferramenta para quantificar a divisão celular, em virtude da diminuição sequencial na marcação fluorescente nas células filhas. O CFDA-SE (com duas cadeias laterais de acetato) é o reagente inicial, não-fluorescente e altamente permeável a membrana. Assim, este composto é rapidamente absorvido pelas células e, uma vez no interior das células, esterases intracelulares removem seus grupos acetato. O composto resultante é o CFSE, altamente fluorescente, com reduzida lipofilicidade e que sai em uma taxa muito mais lenta. Além disso, a cadeia lateral succinimidil do CFSE é altamente reativa com grupos amino de moléculas intracelulares, aumentando a estabilidade.

3.3.7 Verificação da integridade de membrana plasmática

A integridade de membrana dos promastigotas tratados foi analisada por citometria de fluxo, através da incorporação de PI pelas células não permeabilizadas. Os promastigotas

tratados ou não com apigenina (3-96 μM) por 24 h foram incubadas com 40 $\mu\text{g/mL}$ PI por 20 min. O controle positivo de lise foi obtido pelo aquecimento (à 90°C) dos promastigotas por 15 min e pelo tratamento das células com 0,01% TritonX-100 por 10 min.

3.3.8 Investigação da fragmentação de DNA

Realizou-se a detecção *in situ* de possível fragmentação de DNA através do ensaio de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*). Esta técnica utiliza a enzima TdT (transferase deoxinucleotidil terminal) para adicionar nucleotídeos d-UTP (2'-desoxiuridina 5' trifosfato) acoplados ao marcador fluorescente FITC à extremidade 3'OH dos fragmentos das fitas de DNA clivadas em células apoptóticas. Dessa forma, a quantidade de fragmentos de DNA é diretamente proporcional à fluorescência obtida. Promastigotas tratados ou não com 12-96 μM apigenina por 24 h foram incubados com solução de fixação/permeabilização por 30 min, lavadas em PBS, ressuspensos em uma solução de etanol 70% por 30 min, lavados novamente com PBS e ressuspensos no meio reacional contendo a enzima TdT e dUTP-FITC (TUNEL kit – Promega, Madison, WI). Como controle positivo da degradação do DNA, foi usado 10 $\mu\text{g/mL}$ DNase. Os resultados foram obtidos no citômetro (Ribeiro e cols, 2013).

3.3.9 Análises ultraestruturais

As alterações ultraestruturais induzidas pela apigenina sobre os promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram processados promastigotas tratados na ausência (0,2% DMSO v/v) ou na presença de 12-96 μM apigenina em meio Schneider, a 26°C, por 24 h. Também foram processados macrófagos murinos infectados, tratados na ausência ou na presença de 12 μM apigenina em meio RPMI, a 37°C, por 72 h. As células foram fixadas em 2,5% glutaraldeído, diluído em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2), a temperatura ambiente por 40 min. Em seguida, foram lavadas três vezes com o mesmo tampão e pós-fixadas em solução de 1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferricianeto de potássio e 2,5 mM CaCl_2 por 20 min, a 25°C. As amostras foram novamente lavadas com o tampão, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina PolyBed 812 (Menna-Barreto e cols, 2005). Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Tóquio, Japão) da Plataforma de Microscopia Eletrônica (IOC, FIOCRUZ).

3.3.10 Citotoxicidade da apigenina em macrófagos peritoneais murinos

A citotoxicidade da apigenina foi avaliada em macrófagos peritoneais murinos de camundongos suíços pelo método colorimétrico de AlamarBlue®. Esse ensaio é baseado na conversão da rezasurina em resorufina pelas células viáveis. A rezasurina é um composto não tóxico que é reduzido no interior de células metabolicamente ativas para um produto que apresenta cor, a resorufina. Essa conversão é proporcional ao número de células viáveis, gerando assim uma medida quantitativa da viabilidade celular. Macrófagos peritoneais (2×10^6 céls/mL) foram plaqueados e incubados com diferentes concentrações de apigenina (0-96 μ M) em placa de 96 poços, durante 72 h, em estufa de 37°C / 5% CO₂. Após o período de tratamento, foi adicionado 20% (v/v) do reagente AlamarBlue® em cada poço da placa e, 12h depois, a viabilidade foi mensurada colorimetricamente em espectrofotômetro com comprimento de onda de 560nm. Utilizou-se 0,1% Triton X-100 como controle positivo. O cálculo do LD₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism* 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) (Inácio e cols, 2013; Fonseca-Silva e cols, 2013).

Adicionalmente, foi avaliado o potencial de membrana mitocondrial por JC-1 e também a produção de NO pela reação de Griess nos macrófagos tratados com apigenina. Após 72 h de tratamento com o composto, os macrófagos foram lavados com tampão HBSS e incubados com 10 μ g/mL JC-1 por 20 min no escuro, a 37°C. O agente desacoplador FCCP (Sigma Aldrich) (200 μ M) também foi utilizado como controle positivo por 10 minutos. Os valores de $\Delta\Psi_m$ foram obtidos por espectrofluorimetria (excitação: 480 nm e emissão: 530/590 nm) e expressos pela razão entre as fluorescências vermelho/verde (590/530). A avaliação da produção de NO pelos macrófagos tratados com apigenina foi realizada pela dosagem de nitrito no sobrenadante dos mesmos. Na reação de Griess, o nitrito reage com a sulfanilamida em meio ácido e o diazo-composto formado reage com o cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina, gerando um composto de coloração rósea. Após 10 min de reação no escuro, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (540 nm).

3.5 Análise da viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET da apigenina

Previamente ao ensaio *in vivo*, foi realizada uma análise da relação estrutura-atividade, utilizando o recurso de modelagem molecular para avaliar as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) *in silico* da apigenina. Utilizou-se o AdmetSAR, uma ferramenta computacional aberta e abrangente, acessível gratuitamente

pelo endereço eletrônico <http://www.admetexp.org>, e que pode ser utilizada na avaliação de propriedades ADMET *in silico* de diversas moléculas. Este recurso também contempla a análise dos critérios clássicos de Lipinski: número de doadores e de receptores ligantes de hidrogênio, peso molecular do composto e clogP (coeficiente de partição octanol/água).

3.6 Ensaios *in vivo*

3.6.1 Atividade *in vivo* da apigenina

O ensaio *in vivo* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Inácio e colaboradores (2013). Camundongos BALB/c (5/grupo) foram infectados via intradérmica com promastigotas de *L. amazonensis* (2×10^6 células/10 μ L) na orelha direita. Após 7 dias de infecção, foi iniciado o tratamento oral (através de sonda orogástrica) com 1 e 2 mg/kg/dia de apigenina ou injeção intraperitoneal (no quadrante inferior direito do abdômen) de 100mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina (fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose). O tratamento foi realizado diariamente por 38 dias seguidos. A progressão da doença foi avaliada pela espessura da orelha infectada, mensurada através de paquímetro (Mitutoyo, São Paulo, Brasil), duas vezes por semana. Este estudo foi realizado em conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ e o protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (Nº de Licença: LW-7/10).

3.6.2 Determinação da carga parasitária

A carga parasitária foi determinada pelo método de diluição limitante quantitativa (LDA). Ao final do experimento, no 45º dia, a orelha lesionada de cada camundongo foi retirada, pesada e macerada em meio Schneider, suplementado com 20% SFB, 200U/mL penicilina e 200 μ g/mL estreptomicina. As células em suspensão foram ajustadas para a concentração de 10mg de tecido/mL e foram diluídas em série de 1:2 em placa de 96 poços, resultando um volume final de 200 μ L por poço. As culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 7 dias em microscópio óptico, para registro da última diluição que continha promastigotas para estimar a carga parasitária proveniente dos 10mg/mL de tecido e expressa em parasitos/mg de tecido, conforme descrito por Inácio e colaboradores (2013).

3.6.3 Avaliação de parâmetros toxicológicos

Para avaliar toxicidade hepática, renal e muscular dos camundongos infectados, tratados por via oral com apigenina e por via intraperitoneal com antimoniato de meglumina, os níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT), da aspartato aminotransferase (AST) e da creatinina foram dosados por kits comerciais de dosagem – TGP e TGO (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil) e Doles (Goiânia, Brasil), respectivamente. Além destes parâmetros, os níveis de ureia, proteínas totais, globulina, albumina e creatina quinase também foram dosados pela Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ).

3.7 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em três ou mais ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste t de *Student* ou análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni em GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os dados são expressos como média \pm erro padrão.

4. RESULTADOS

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Verificação da atividade leishmanicida da apigenina

Para determinar o efeito da apigenina sobre a proliferação da forma promastigota de *L. amazonensis*, os parasitos foram incubados com concentrações crescentes da flavona (3-96 μ M) por 24 h. A apigenina inibiu o crescimento celular da forma promastigota de *L. amazonensis* de maneira dose-dependente (Figura 4.1). Este efeito inibitório foi igual a 74% após 24 h de tratamento com 96 μ M de apigenina. O IC₅₀/24 h foi 23,68 \pm 0,85 μ M.

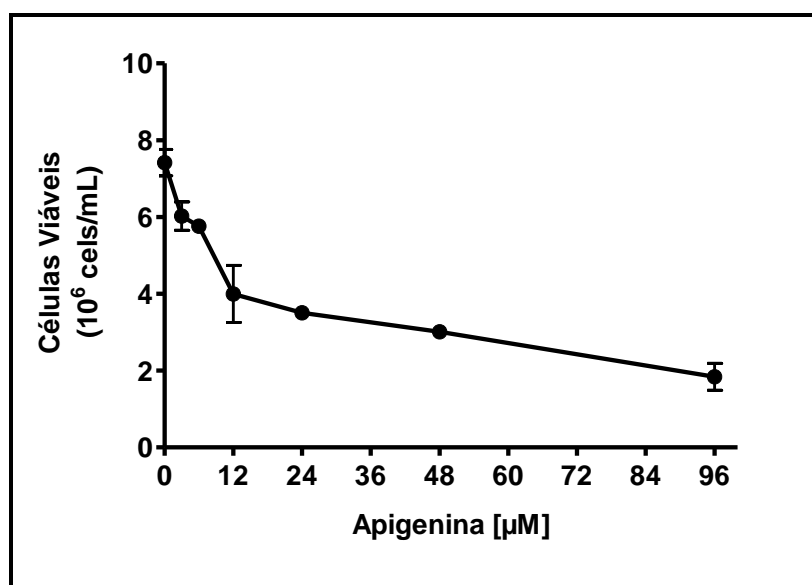


Figura 4.1: Atividade da apigenina sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas foram cultivados em meio Schneider a 26°C, na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 3, 6, 12, 24, 48 e 96 μ M de apigenina por 24 h. O número de parasitas foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.3.1. Os valores mostrados são a média \pm EP de três experimentos diferentes (n=3). P<0,001 (ANOVA).

Avaliamos o efeito da flavona em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, cultivados na ausência e na presença de 3-12 μ M apigenina por 72 h. O efeito inibitório da apigenina nos amastigotas, calculado por meio do IF, também foi dose-dependente e igual a 71% na concentração de 12 μ M (Figura 4.2). O IC₅₀/72 h foi 4,33 \pm 0,45 μ M. Este resultado mostra que a atividade leishmanicida da apigenina contempla, também, a forma do parasito encontrada no hospedeiro vertebrado.

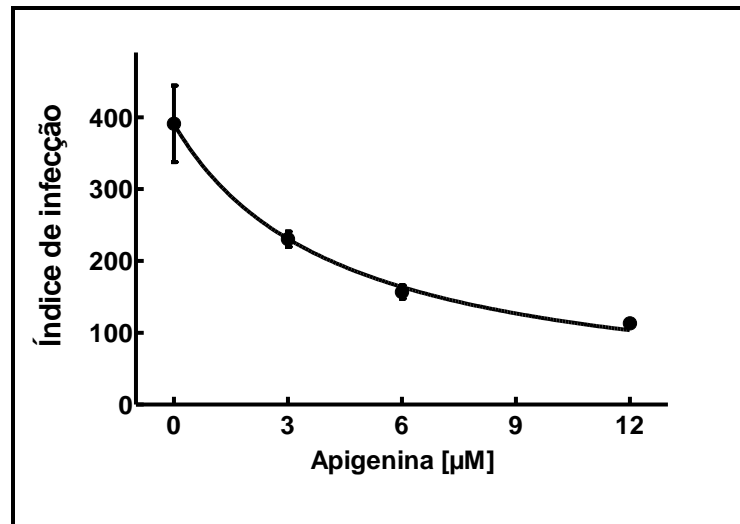


Figura 4.2: Atividade da apigenina sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. amazonensis*, tratados com 3-12 µM de apigenina por 72 h, corados e analisados; e o índice de infecção foi estimado, conforme item 3.3.1. A apigenina inibiu a proliferação de intracelular de *L. amazonensis* de forma dose-dependente. Os valores mostrados são a média ± EP de três experimentos diferentes (n=3). P<0,001 (ANOVA).

4.1.2 Avaliação da produção de ERO

Tendo em vista a capacidade pró-oxidante da apigenina, foi investigado se esta flavona induz a produção de ERO em *L. amazonensis* através do indicador celular permeável H₂DCFDA. Foi observado um aumento dose-dependente nos níveis de ERO após o tratamento com 3-96µM de apigenina, sendo 2,9 vezes maior que os níveis do controle na maior concentração testada (96 µM) (Figura 4.3).

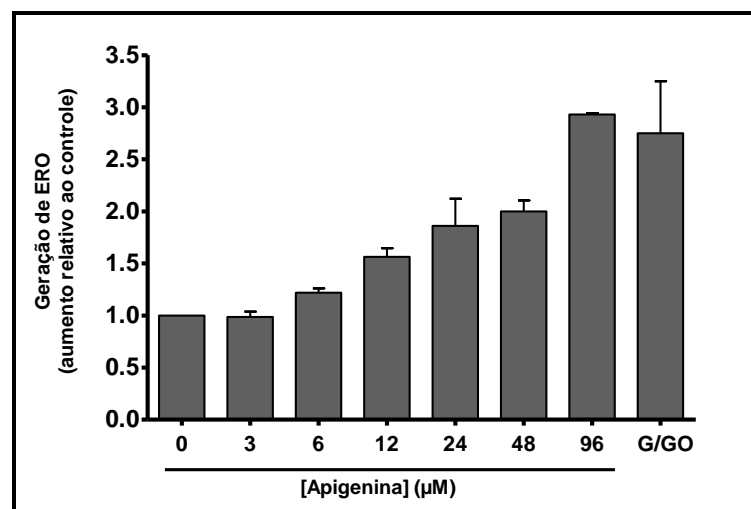


Figura 4.3: Produção de ERO em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com apigenina. Promastigotas foram cultivados em meio Schneider em 26°C por 24 h, na ausência (DMSO 0,2 % v/v) ou na presença de 3-96µM de apigenina. A formação de ERO foi mensurada usando o indicador fluorescente H₂DCFDA, conforme descrito no item 3.3.2. Controle positivo (G/GO): 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose, por 20 min. Os dados são expressos pelo aumento relativo ao controle. Os valores mostrados são a média ± EP de três experimentos diferentes (n=3). P<0,001 (ANOVA).

Adicionalmente, verificou-se um aumento significativo nos níveis de H_2O_2 nos promastigotas tratados, chegando a cinco vezes mais nas maiores concentrações utilizadas (48 e 96 μM) (Figura 4.4). O reagente *Amplex Red* é uma sonda altamente sensível e estável para H_2O_2 , o que provavelmente está maximizando a diferença de fluorescência em relação ao controle, quando comparamos com o outro método de detecção (H_2DCFDA).

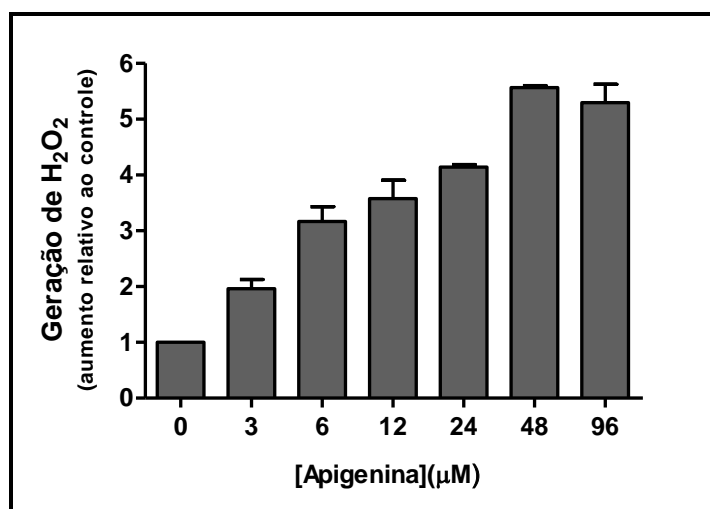


Figura 4.4: Produção de H_2O_2 em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com apigenina. Promastigotas foram cultivados em meio Schneider em 26°C por 24 h, na ausência (DMSO 0,2 % v/v) ou na presença de 3-96 μM de apigenina. A formação de H_2O_2 foi mensurada com 100 μM *Amplex Red*, 1U/ml HRP e 64 μM digitonina por 30 min, conforme descrito no item 3.3.2. Os dados são expressos pelo aumento relativo ao controle. Os valores mostrados são a média \pm EP de três experimentos diferentes (n=3). $P < 0,001$ (ANOVA).

A apigenina também induziu maior produção de ERO em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Foi observado um aumento dose-dependente nos níveis de ERO nos macrófagos infectados e tratados com 3-12 μM apigenina. Na concentração 12 μM , a produção de ERO foi 1,45 (45%) vezes maior do que no controle (Figura 4.5A). Foram mensurados, também, os níveis de ERO em macrófagos tratados, mas não infectados. Na ausência de infecção, o tratamento não induziu aumento dos níveis de ERO (Figura 4.5B). Um dado interessante foi a correlação linear entre a porcentagem de inibição do índice infecção e a produção de ERO após o tratamento com a apigenina ($R^2 = 0,9306$) (Figura 4.6).

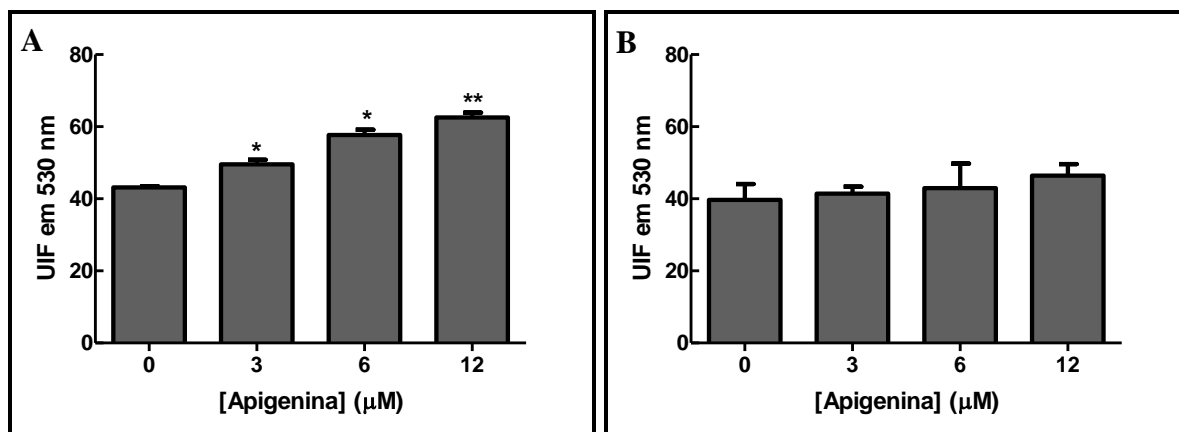


Figura 4.5: Produção de ERO em macrófagos infectados e tratados com apigenina. (A) Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e (B) não infectados foram incubadas na ausência e na presença de apigenina (3-12 μM) durante 72 h. A geração de ERO foi mensurada utilizando o indicador fluorescente H₂DCFDA, conforme descrito no item 3.3.2. Controle positivo: 20 U/mL de glicose oxidase + glicose 60 mM por 30 min. Os dados são expressos em unidades de intensidade de fluorescência (UIF). Os valores mostrados são a média ± EP de três experimentos diferentes (n=3). * Indica diferenças significativas em relação ao grupo de controle (p < 0,05). ** Indica diferenças significativas em relação ao grupo de controle (p < 0,01).

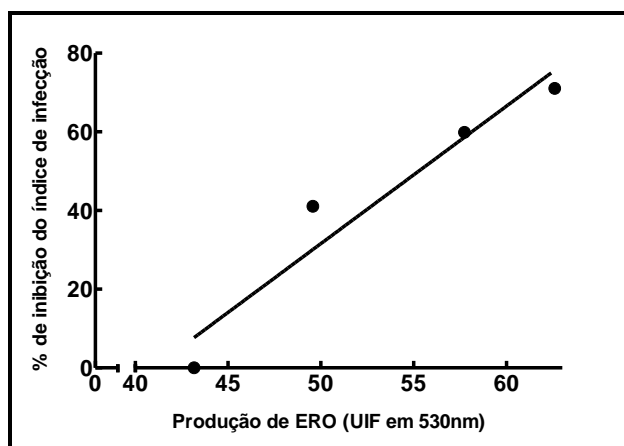


Figura 4.6: Correlação linear: % de inibição do índice infecção Vs. produção de ERO. A análise de regressão linear foi realizada usando *GraphPad Prism 5* ($R^2 = 0,9306$).

4.1.3 Avaliação do efeito de antioxidantes sobre a atividade da apigenina

Foi investigado se a incubação com NAC e GSH (300 μM) poderia evitar o efeito inibitório promovido pela apigenina. A incubação com estes antioxidantes foi capaz de proteger promastigotas de *L. amazonensis* da ação inibitória promovida pela apigenina (Figura 4.7A), devido à redução dos níveis de ERO nas células tratadas (Figura 4.7B). Contrariamente, a glutatona oxidada (GSSG) não reduziu os níveis de ERO e, por consequência, não protegeu a *L. amazonensis* da inibição promovida pela apigenina. Em conjunto, estes resultados indicam que a inibição do crescimento promovida pela apigenina em *L. amazonensis* é consequência da produção de ERO, alterando o estado redox da célula.

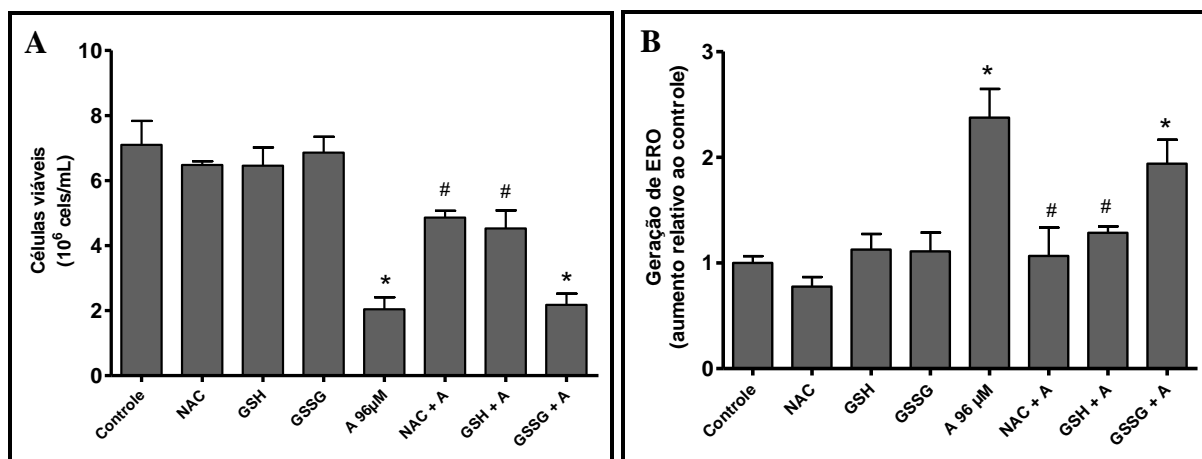


Figura 4.7: Efeito de antioxidantes em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com apigenina. (A) Viabilidade e (B) produção de ERO. Promastigotas foram cultivados em meio Schneider a 26°C, na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de NAC, GSH, GSSG (300 μ M) e/ou apigenina (96 μ M) por 24 h. O número de parasitas foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer e os níveis de ERO foram mensurados fluorimetricamente com 20 μ M H₂DCFDA, conforme descrito no item 3.3.3. Os valores mostrados são a média \pm EP de três experimentos diferentes (n=3). A: apigenina; * indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); # indica uma diferença significativa em relação ao grupo tratado ($p < 0,05$).

Conforme descrito anteriormente, o tratamento com apigenina de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* levou a uma diminuição do índice de infecção. Este efeito foi também revertido pela presença dos antioxidantes NAC e GSH, como podemos observar através do cálculo do IF (Figura 4.8A). Fotomicrografias mostram que o controle apresenta um elevado número de macrófagos infectados e de amastigotas por macrófago, enquanto que no grupo tratado com 12 μ M apigenina houve uma redução significativa dessas características. Já nos grupos que receberam os antioxidantes NAC e GSH no tratamento, constatamos uma inibição do efeito leishmanicida promovido pela apigenina (Figura 4.8B).

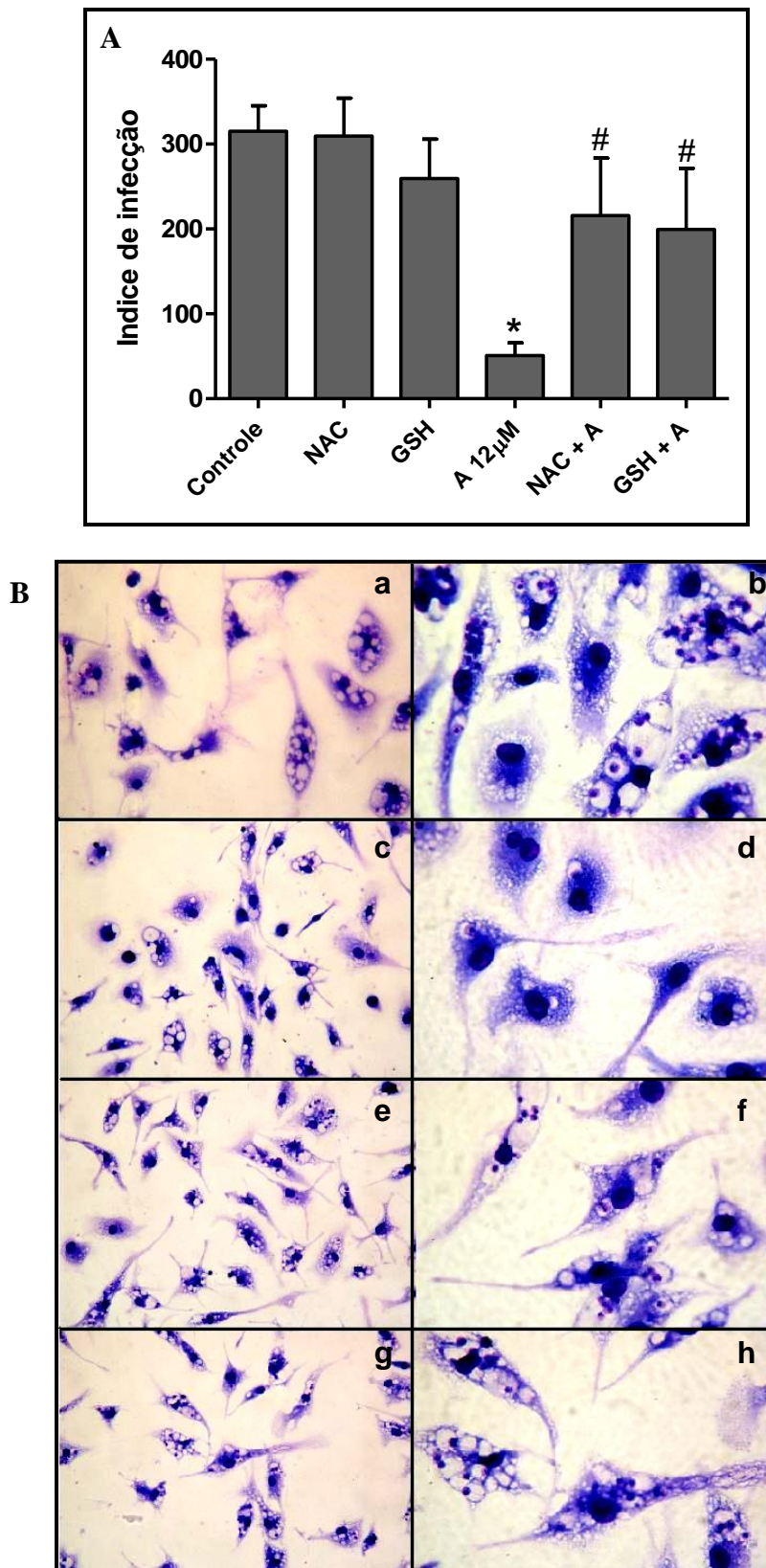


Figura 4.8: Efeito de antioxidantes na infecção sob tratamento com apigenina. Macrófagos murinos, infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, foram incubados com NAC e GSH (300 μ M) e tratados com apigenina (12 μ M) por 72h. (A) Gráfico do índice de infecção e (B) fotomicrografias exibindo os efeitos do tratamento. A: apigenina; * indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); # indica uma diferença significativa em relação ao grupo tratado ($p < 0,05$); (a, c, e, g) em aumento de 400X; (b, d, f, h) em aumento de 1000X; (a, b) Macrófagos do controle; (c, d) Macrófagos tratados com 12 μ M de apigenina; (e, f) Macrófagos pré-incubados com NAC (300 μ M) e tratados com apigenina (12 μ M); (g, h) Macrófagos pré-incubados com GSH (300 μ M) e tratados com apigenina (12 μ M).

4.1.4 Determinação do $\Delta\Psi_m$

A atividade mitocondrial foi avaliada pela utilização do JC-1, cuja fluorescência pode ser considerada como um indicador do estado de energia mitocondrial relativo. A apigenina gerou disfunção mitocondrial nos promastigotas de *L.amazonensis* tratados, visto que houve uma acentuada diminuição dos valores de $\Delta\Psi_m$ (razão de fluorescência 590/530 nm) de forma dose-dependente (Figura 4.9) Houve uma redução de 78,3% do $\Delta\Psi_m$ nas células tratadas com 96 μM apigenina. As células incubadas com 20 μM FCCP (agente desacoplador usado como controle positivo) tiveram uma redução similar nos valores da intensidade relativa de fluorescência.

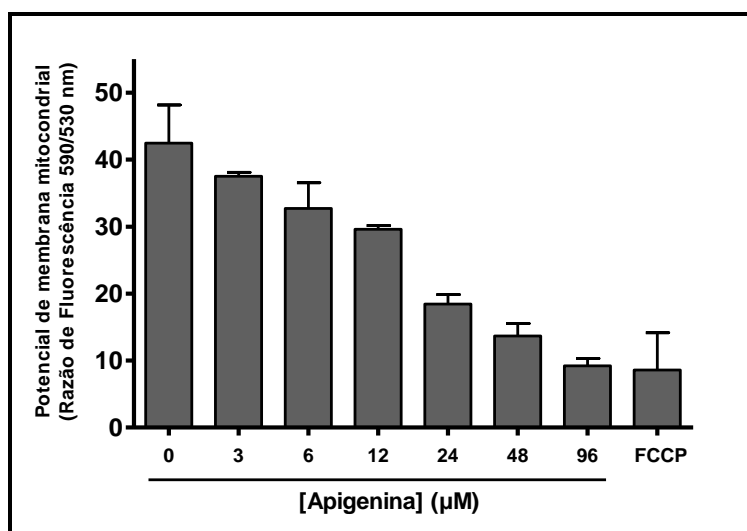


Figura 4.9: Avaliação do $\Delta\Psi_m$ de promastigotas tratados com apigenina. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 3- 96 μM de apigenina por 24 h e incubadas com o JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$), conforme o item 3.3.4. O controle positivo foi obtido por adição de FCCP (20 μM) por 20 minutos. Alterações nos valores relativos do $\Delta\Psi_m$ estão expressos como a razão da fluorescência em 590 nm (agregado) e em 530 nm (monomérico). Os valores mostrados são a média \pm EP de três experimentos diferentes (n=3). $P < 0,001$ (ANOVA).

4.1.5 Avaliação do ciclo celular

A porcentagem de promastigotas com menor conteúdo de DNA, após o tratamento com 12-96 μM apigenina, foi avaliada por citometria de fluxo. Após 24 h de tratamento, 33%, 44,7% e 63% das células apresentaram-se na região Sub-G0/G1, enquanto 25% das células controle apresentaram-se dessa maneira. Além disso, 20,3% das promastigotas do grupo controle apresentaram-se na fase G2/M, enquanto que nas promastigotas tratadas com 12, 24 e 96 μM de apigenina, esses valores foram reduzidos para 19,7%, 15,6%, 9,6%, respectivamente (Tabela 4.1). O aumento da porcentagem de células na fase Sub-G0/G1 foi acompanhado por

uma diminuição na porcentagem de células da fase G2/M de maneira dose dependente (Figura 4.10), indicando que a apigenina promoveu parada do ciclo celular nos promastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 4.1 - Porcentagem de células em cada fase do ciclo celular

	Sub-G0/G1	G1	S	G2/M
Controle	25±3,8%	31,5±1,8%	15,1±0,7%	20,3±2,8%
Apigenina 12µM	33±3,3%	27,4±1,5%	12,6±0,8%	19,7±3,6%
Apigenina 24µM	44,7±2,9%	22,8±0,8%	10,8±1,0%	15,6±3,4%
Apigenina 96µM	63±3,8%	16,6±1,1%	6,6±0,7%	9,6±2,6%

Porcentagem de promastigotas em cada fase do ciclo celular, após 24h de incubação na ausência ou presença de apigenina e da marcação com PI. Os valores mostrados são a média ± EP de três experimentos diferentes (n=3).

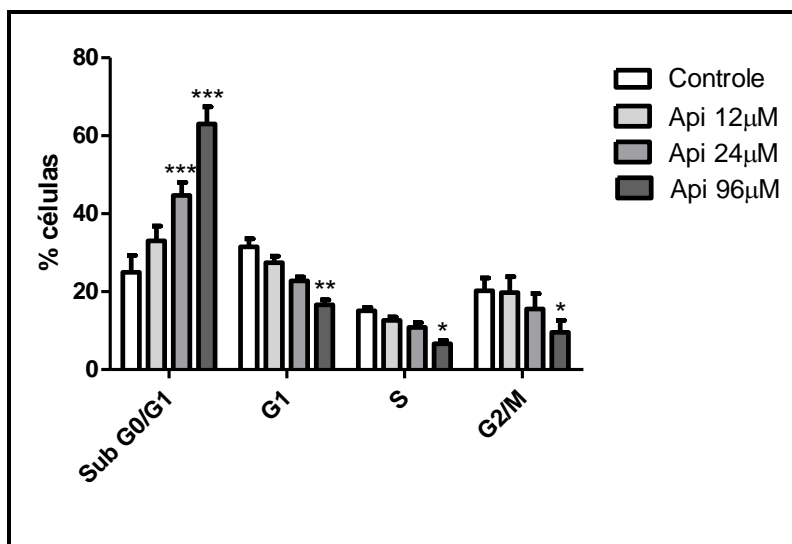


Figura 4.10: Análise do ciclo celular dos promastigotas tratados com apigenina. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 12, 24 e 96µM de apigenina por 24 h, fixados e permeabilizados, marcados com PI e analisados por citometria de fluxo, conforme o item 3.3.5. Um fenótipo sub-G0/G1 foi observado em 33% - 63% dos promastigotas tratadas. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001. Os valores mostrados são a média ± EP de três experimentos diferentes (n=3). Histogramas foram analisados utilizando o programa de computador *Summit v4.3*.

4.1.6 Avaliação do potencial proliferativo

A avaliação do potencial proliferativo dos promastigotas se deu pela marcação com o CFSE (10 µM) e análise em citômetro de fluxo. A figura 4.11 mostra fluorescências semelhantes (valores de mediana muito próximos) em todos os grupos no tempo zero (t=0), mas após 24 h de tratamento com 12-96µM de apigenina e 50µM de paclitaxel (Taxol®) o perfil dos histogramas foi alterado. O grupo controle teve fluorescência reduzida em consequência da maior proliferação dos parasitos, enquanto os grupos tratados tiveram

fluorescências maiores quanto maior a concentração de apigenina. Esses valores de fluorescência indicam que a apigenina reduziu o potencial proliferativo das promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose dependente (Tabela 4.2).

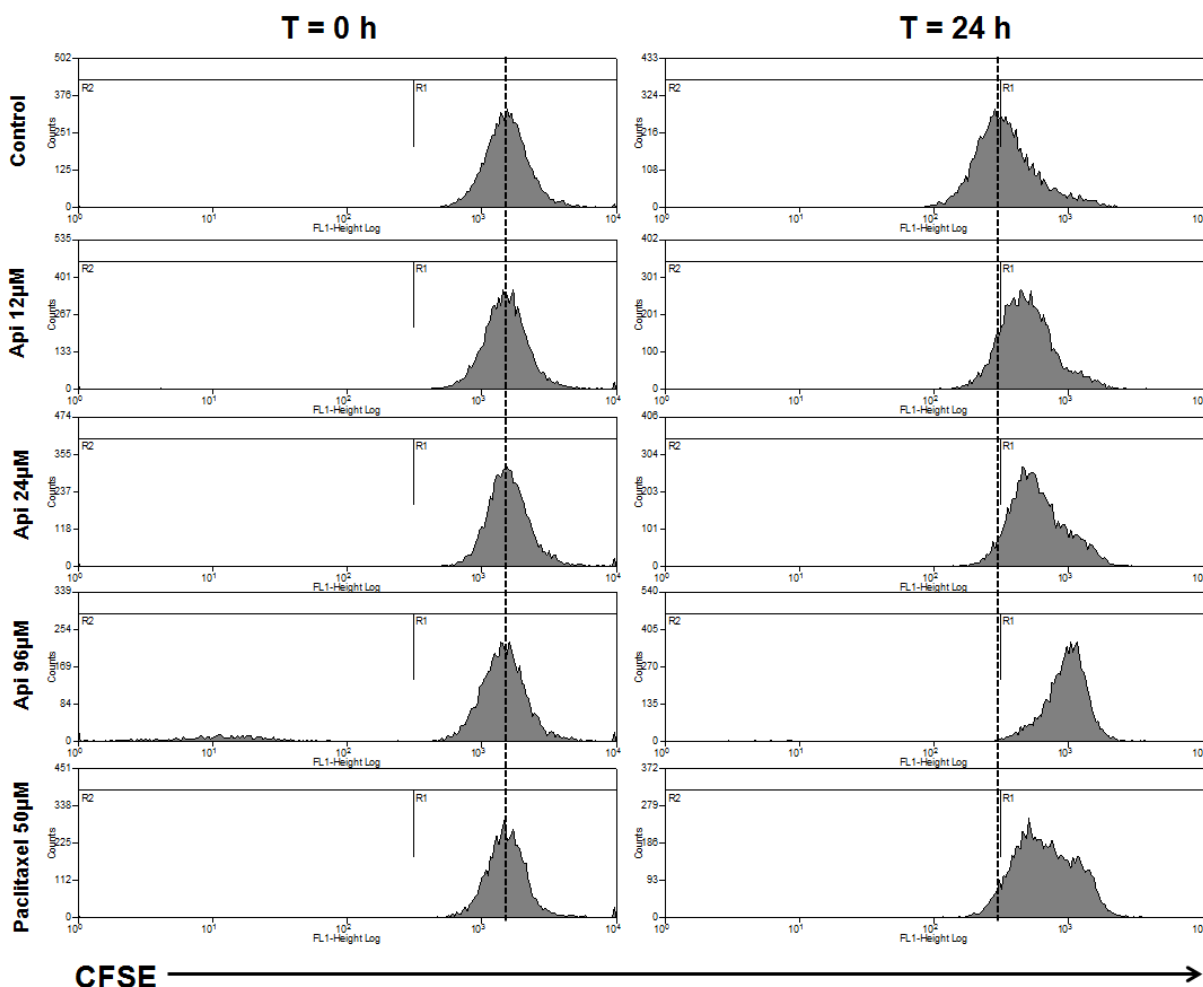


Figura 4.11: Avaliação do potencial proliferativo de promastigotas tratadas com apigenina. Promastigotas de *L. amazonensis* marcados com CFSE foram cultivados na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 12-96µM apigenina por 24 h e sua proliferação foi analisada por citometria de fluxo, conforme o item 3.3.6. O paclitaxel foi utilizado como controle positivo leishmaniostático. A figura exibe um experimento representativo.

Tabela 4.2 - Valores de mediana da fluorescência do CFSE e porcentagem de células que proliferaram

	T = 0h			T = 24h		
	Mediana	% de céls que proliferaram	% de céls que não proliferaram	Mediana	% de céls que proliferaram	% de céls que não proliferaram
Controle	1584,89	0,68	99,32	335,34	46,23	56,85
Apigenina 12µM	1528,67	0,85	99,15	481,23	15,06	86,83
Apigenina 24µM	1584,89	0,85	99,15	576,48	6,87	94,19
Apigenina 96µM	1422,14	1,30	98,70	1027,46	1,59	98,52
Paclitaxel 50µM	1528,67	1,11	98,89	666,08	6,68	94,49

Valores de mediana da fluorescência do CFSE e porcentagem de proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*, antes e após 24 h de incubação na ausência ou na presença de apigenina. Os valores mostrados referem-se ao experimento representativo.

4.1.7 Verificação da integridade de membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 3-96 μ M apigenina por 24 h não foi alterada, visto que os parasitos não apresentaram marcação significativa para PI. Os valores de mediana da fluorescência e a porcentagem dessas células na região definida como PI positiva não foram diferentes significativamente do grupo controle (Tabela 4.3). Somente as células tratadas com 96 μ M apigenina tiveram uma porcentagem de células PI positivas mais considerável, porém sem diferença significativa quando comparada ao controle (Figura 4.12). Células aquecidas à 90°C por 15 minutos e células com 0,01% de Triton X-100 foram utilizadas como controles positivos.

Tabela 4.3 - Valores de mediana e porcentagem de promastigotas marcados com PI

	Mediana	% PI+
Controle negativo	2,43 \pm 0,09	0,16 \pm 0,06
Controle	3,81 \pm 0	4,88 \pm 2,44
Apigenina 3 μ M	3,68 \pm 0,09	4,39 \pm 2,63
Apigenina 6 μ M	3,88 \pm 0,05	4,46 \pm 2,33
Apigenina 12 μ M	4,09 \pm 0,10	5,93 \pm 2,67
Apigenina 24 μ M	4,18 \pm 0,16	6,08 \pm 2,97
Apigenina 48 μ M	4,07 \pm 0,47	6,65 \pm 3,08
Apigenina 96 μ M	4,58 \pm 0,35	13,85 \pm 3,96
C+ 90°C por 15 min	203,24 \pm 69,06	93,16 \pm 4,62

Valores das medianas de fluorescência do PI e das porcentagens de promastigotas de *L. amazonensis* PI positivas, após 24 h de incubação na ausência ou na presença de apigenina. Os valores mostrados são a média \pm EP de dois experimentos diferentes (n=2).

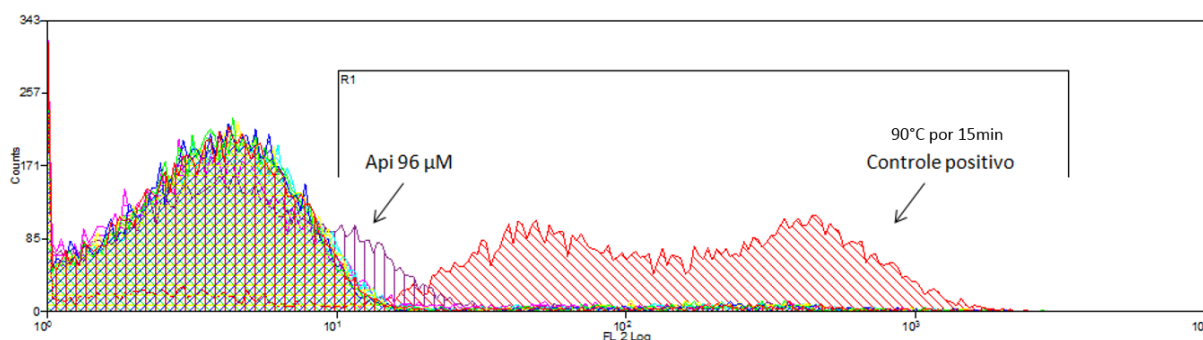


Figura 4.12: Avaliação da integridade de membrana plasmática de promastigotas tratados com apigenina. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de 3-96 μ M de apigenina por 24 h, marcados com PI e analisados por citometria de fluxo, conforme o item 3.3.7. O histograma exibe um experimento representativo.

4.1.8 Investigação da fragmentação do DNA

A ocorrência de fragmentação do DNA de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 12-96 μ M apigenina foi avaliada a partir do ensaio de TUNEL, no qual a enzima TdT identifica pontos de fragmentação no DNA da amostra e catalisa a adição de nucleotídeos dUTP marcados previamente, para a detecção subsequente. Após 24 h de tratamento com a apigenina, não foi observada fragmentação de DNA significativa em nenhuma das concentrações utilizadas (Tabela 4.4). A porcentagem de células TUNEL positivas e as medianas de fluorescência foram similares em todos os grupos, exceto no controle positivo (10 μ g/mL DNase).

Tabela 4.4 – Valores de medianas de fluorescência do ensaio de TUNEL em promastigotas tratadas com apigenina

	Mediana
Controle	5,55 \pm 1,19
Apigenina 12 μ M	4,34 \pm 0,61
Apigenina 24 μ M	3,87 \pm 0,50
Apigenina 96 μ M	4,55 \pm 1,15
DNase (10 μ g/mL)	59,85 \pm 6,07

Valores de mediana da fluorescência do ensaio de TUNEL em promastigotas de *L. amazonensis* antes e após 24 h de incubação na ausência (DMSO 0,2% v/v) ou na presença de apigenina. Os valores mostrados são a média \pm EP de três experimentos diferentes (n=3).

4.1.9 Análises ultraestruturais

Na análise ultraestrutural por MET, os parasitos não tratados apresentaram uma morfologia típica de núcleo, mitocôndria, cinetoplasto e retículo endoplasmático. Já o tratamento das formas promastigotas com 12-96 μ M de apigenina induziu um notável intumescimento mitocondrial, sendo observada perda das cristas e da elétron-densidade na matriz, além do aparecimento de estruturas membranosas concêntricas dentro desta organela, e a ruptura da rede no trans-Golgi. A concentração de 12 μ M, também conduziu ao aparecimento de perfis de retículo endoplasmático circundando estruturas celulares e vacuolização citosólica (Figura 4.13).

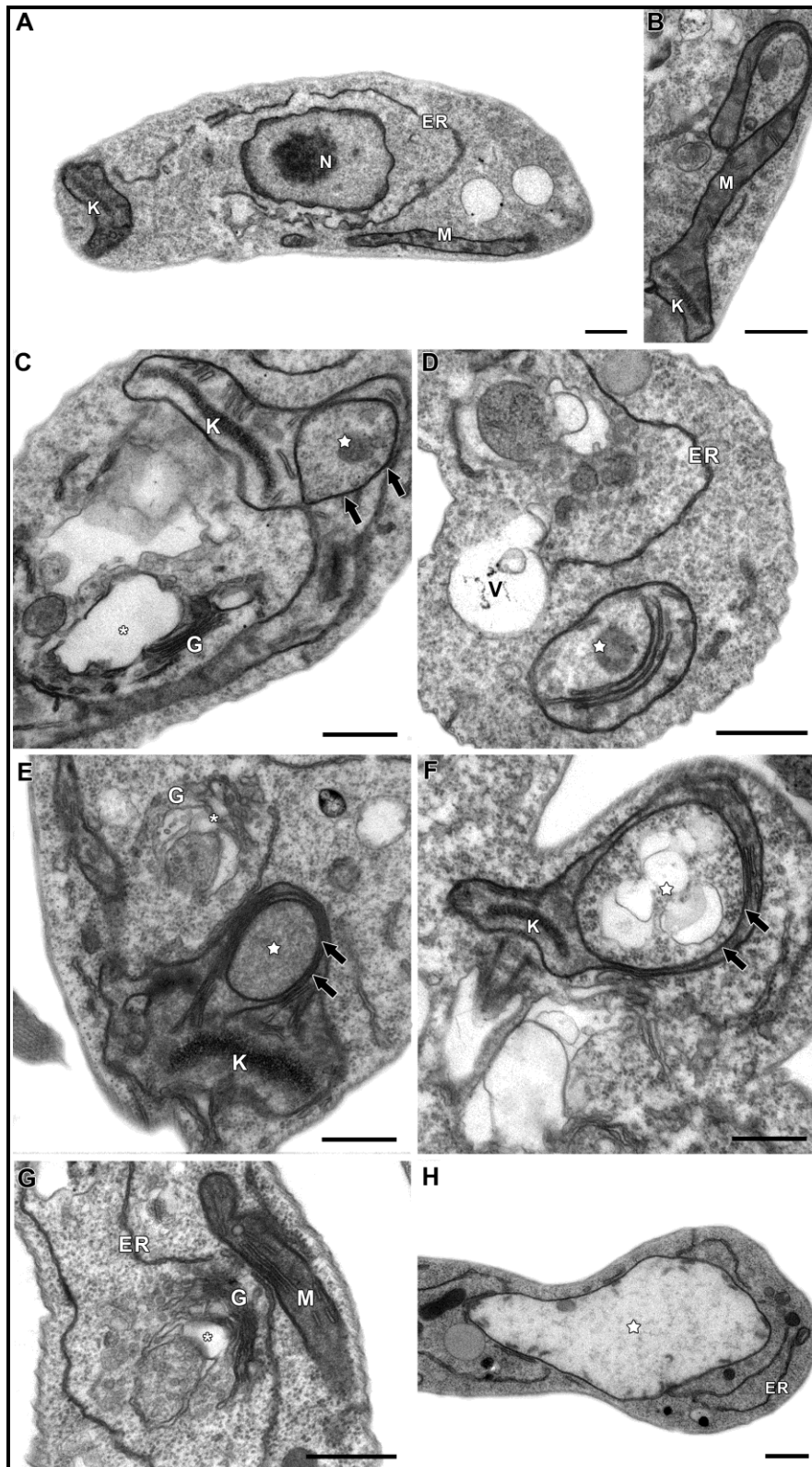


Figura 4.13: Análise ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com apigenina. (A, B), os parasitos do controle apresentaram uma morfologia típica de núcleo (N), mitocôndria (M), cinetoplasto (K) e do retículo endoplasmático (ER). (B) Em detalhe, o aspecto alongado da mitocôndria (M). (C-H) O tratamento das formas promastigotas com 12 μ M (C, D), 24 μ M (G-E) e 96 μ M (H) de apigenina induziu notável inchaço mitocondrial (estrelas brancas), apresentando estruturas membranosas concêntricas dentro da organela (setas grossas pretas) como bem como a interrupção da rede no trans-Golgi (G) (asteriscos brancos). (D) A concentração de 12 μ M, também conduziu ao aparecimento de perfis de retículo endoplasmático (ER) das estruturas celulares circundantes e a vacuolização citosólica (V). (H) A maior concentração utilizada (96 μ M) induziu um forte efeito sobre a ultraestrutura mitocondrial (estrela branca), mostrando um aspecto lavado desta matriz organela e perda das cristas. Barras: 0,5 μ m.

A avaliação ultraestrutural dos macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e não tratados comprovou uma morfologia típica de núcleo e de retículo endoplasmático. Amastigotas foram observadas no citosol ou no vacúolo parasitóforo apresentando aspectos morfológicos normais, com organelas típicas. Alguns macrófagos infectados apresentaram vacuolização citosólica e estruturas membranosas concêntricas. Foi também possível detectar a proximidade do retículo endoplasmático e autofagossomos da célula hospedeira e o parasito (Figura 4.14).

Por outro lado, os macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 12 μ M apigenina por 72 h, apresentaram morfologia normal do núcleo, mitocôndrias e retículo endoplasmático. Algumas amastigotas também mostraram aspectos ultraestruturais típicos como mitocôndria alongada, DNA do cinetoplasto em forma de barra e distribuição da cromatina normal. Contudo, o tratamento com 12 μ M apigenina induziu um aumento no número de autofagossomos próximo aos vacúolos parasitóforos, sugerindo a participação da autofagia no mecanismo de ação do composto. Foram observados autofagossomos em torno do vacúolo parasitóforo em diferentes etapas de degradação, inclusive em processo de fusão. Parasitos degradados foram detectados, apresentando uma estrutura axonema-like (Figura 4.15).

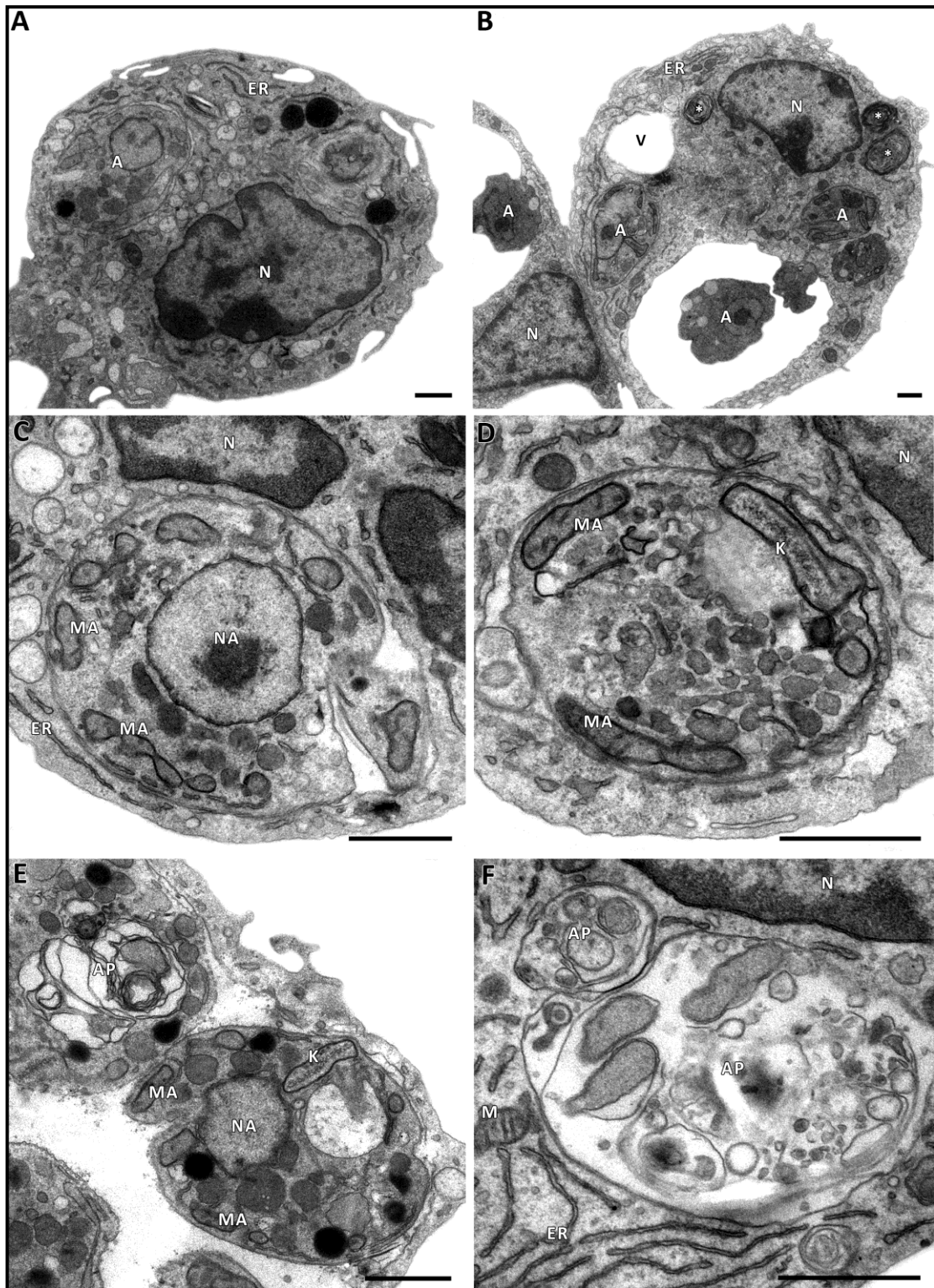
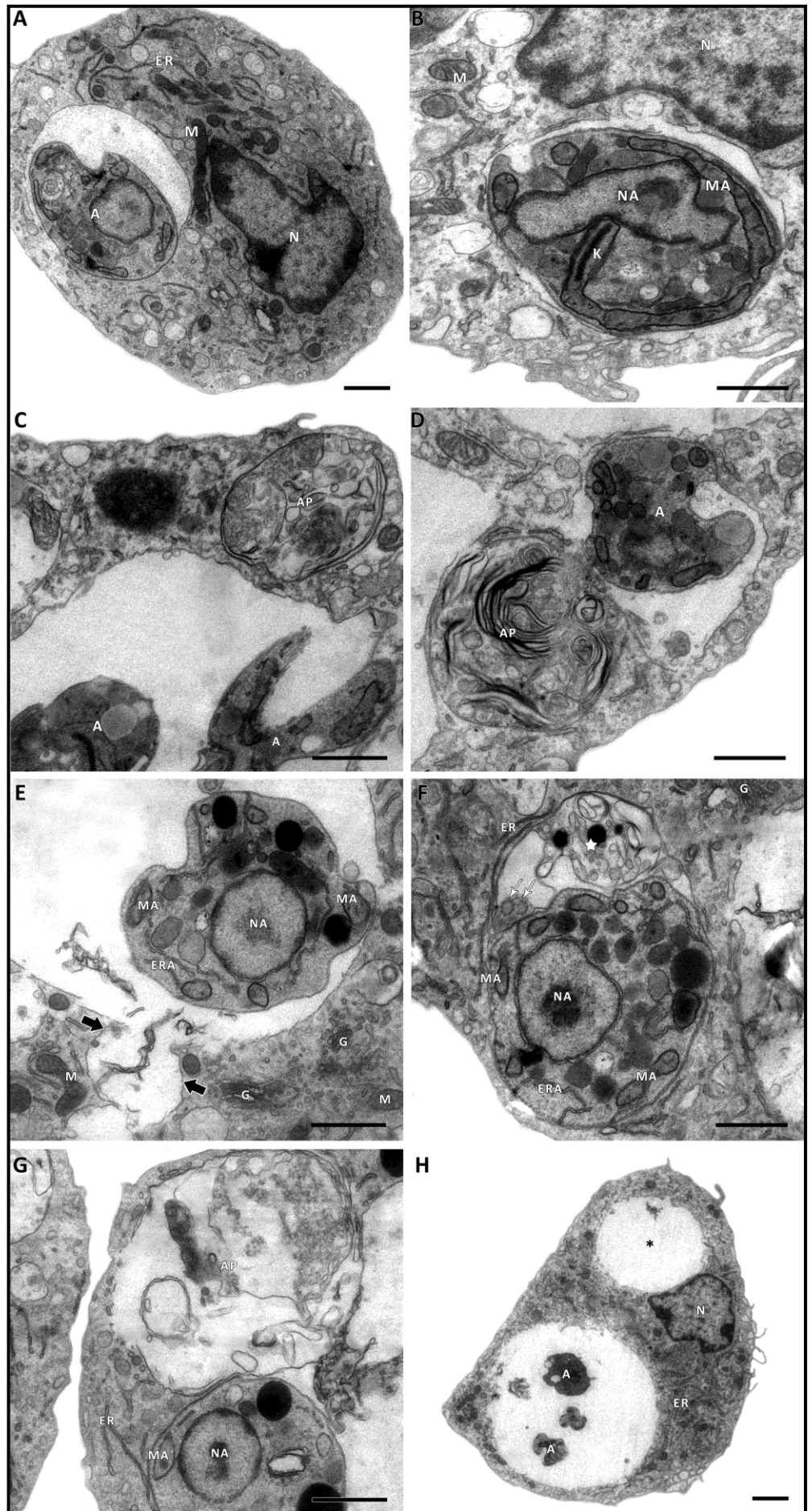


Figura 4.14: Análise ultraestrutural de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e não tratados (controle). (A, B) Baixa ampliação das células infectadas que mostram a morfologia típica de núcleo (N) e do retículo endoplasmático (ER). Amastigotas (A) foram observadas no citosol ou no vacúolo parasitóforo apresentando aspectos morfológicos normais. Alguns macrófagos infectados apresentam vacuolização citosólica (V) e estruturas membranosas concêntricas (asteriscos brancos). (C, D) Em detalhe, os aspectos ultraestruturais das amastigotas intracelulares mostrando núcleo (NA), mitocôndria (MA) e cinetoplasto (K) normais. Foi também possível detectar a proximidade do retículo endoplasmático da célula hospedeira (ER) e o parasito. (E) Amastigota com organelas típicas, como mitocôndria (MA) e núcleo (NA) próxima ao autofagossomo (AP). (F) Alta ampliação de autofagossomos típicos (AP) perto das mitocôndrias do hospedeiro (M), retículo endoplasmático (ER) e núcleo (N). Barras: 1 μ m.

Figura 4.15: Análise ultraestrutural de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 12 μ M apigenina por 72h.

(A, B) macrófagos tratados apresentaram morfologia normal do núcleo (N), mitocôndrias (M) e retículo endoplasmático (ER). Algumas amastigotas (A) também mostraram aspectos ultraestruturais típicos como mitocôndria alongada (MA), DNA do cinetoplasto em forma de barra (K) e distribuição da cromatina normal (NA). (C-H) O tratamento com 12 μ M apigenina induziu um aumento no número de autofagossomos (AP) perto das amastigotas (A), sugerindo a participação da autofagia no mecanismo de ação do composto. (C, D) Autofagossomos (AP), em diferentes etapas de degradação, foram detectados em torno do vacúolo parasitóforo. (E) A fusão do vacúolo autofagossomo-like no vacúolo parasitóforo (setas pretas grossas). (F) Parasito degradado (estrela branca), apresentando uma estrutura axonema-like (setas brancas). (G) Grande autofagossomo (AP) próximo a amastigota. (H) Baixa ampliação que mostra a presença do vacúolo parasitóforo com amastigotas (A) e um vacúolo vazio (asterisco preto) em um macrófago normal. Golgi: G; Núcleo de amastigota: NA; Mitocôndria da amastigota: MA; Retículo endoplasmático da amastigota (ERA). Barras: 1 μ m.



4.1.10 Citotoxicidade da apigenina em macrófagos peritoneais murinos

É imprescindível a verificação de citotoxicidade do composto em questão nas células de mamíferos. Os resultados exibidos na figura 4.16 mostram que, nas concentrações de 3-12 μ M, a apigenina não gerou efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais murinos. Estas células mostraram-se viáveis pelo ensaio com Alamar Blue (Figura 4.16A), o potencial de membrana mitocondrial (Figura 4.16B) e a produção de óxido nítrico (Figura 4.16C) também não foram afetados após o tratamento com as concentrações de apigenina até 12 μ M. O LD₅₀, em 72 h, foi de 78,72 μ M e o índice de seletividade (IS) foi 18,18. (Tabela 4.5).

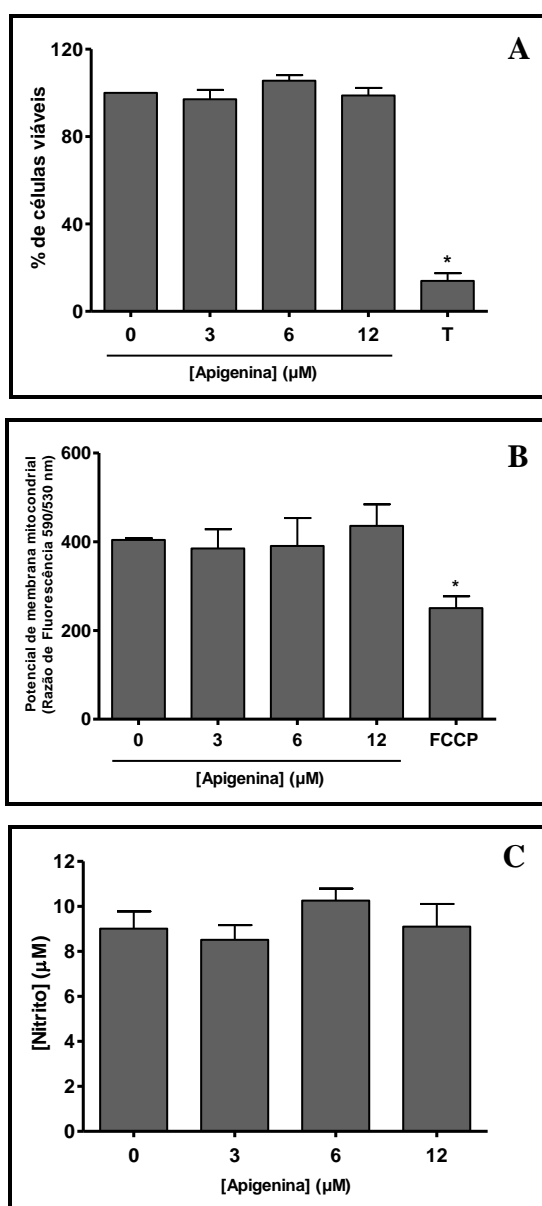


Figura 4.16: Citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos tratados com apigenina. A toxicidade em macrófagos peritoneais murinos tratados com 3-12 μ M de apigenina foi avaliada conforme item 3.3.10. (A) Viabilidade dos macrófagos por *Alamar Blue*. Controle positivo: 0.1% Triton X-100 (T). (B) Determinação do $\Delta\Psi_m$ por JC-1. Controle positivo: 200 μ M FCCP for 10 min. (C) Produção de nítrito. * indica uma diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0.05$).

Tabela 4.5: Valores de IC₅₀, LD₅₀ e IS

IC ₅₀ / 72h	LD ₅₀ / 72h	IS
4,33 µM	78,72 µM	18,18

IC₅₀: concentração de apigenina que inibe 50% das amastigotas intracelulares; LD₅₀: dose letal a 50% dos macrófagos peritoneais murinos. IS: índice de seletividade, isto é, razão entre o LD₅₀ em macrófagos e o IC₅₀ em amastigotas.

4.2 Análise da viabilidade oral e das propriedades moleculares e ADMET da apigenina

Na análise *in silico*, a apigenina exibiu propriedades ADMET favoráveis e enquadrou-se positivamente em todos os critérios de Lipinski, mostrando ser bem absorvida, permeável, biodisponível e oralmente viável. Em relação à absorção, há elevada probabilidade da apigenina ser permeável a barreira hemato-encefálica, ao intestino humano e à linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal (Caco-2). Em relação ao metabolismo, há elevada probabilidade da apigenina não ser inibidora promíscua de enzimas do citocromo P450. Em relação à toxicidade, também há elevada probabilidade da flavona não ser mutagênica, carcinogênica e não ter toxicidade oral aguda elevada (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 – Viabilidade oral, propriedades moleculares e propriedades ADMET da apigenina

	Apigenina	
	Resultado	Probabilidade (%)
	<u>Absorção</u>	
Barreira hemato-encefálica	+	63,6
Absorção intestinal humana	+	98,9
Permeabilidade de Caco-2	+	85,4
	<u>Metabolismo</u>	
Substrato de CYP450 2C9	Não substrato	78,13
Substrato de CYP450 2D6	Não substrato	91,26
Substrato de CYP450 3A4	Não substrato	69,07
Inibidor de CYP450 1A2	Inibidor	92,22
Inibidor de CYP450 2C9	Inibidor	77,46
Inibidor de CYP450 2D6	Não inibidor	92,31
Inibidor de CYP450 2C19	Inibidor	70,43
Inibidor de CYP450 3A4	Inibidor	95,80
	<u>Toxicidade</u>	
Toxicidade de AMES	Não tóxica	89,06
Carcinogênese	Não carcinogênica	91,81
Toxicidade oral aguda	III	70,12
<i>n</i> -ROTB (≤ 10)		1
	<u>Descritores moleculares de Lipinski</u>	
Número de aceptores ligantes de hidrogênio ($HBA \leq 10$)		5
Número de doadores ligantes de hidrogênio ($HBD \leq 5$)		3
clogP (≤ 5)		2,58
Peso molecular (≤ 500)		270,24

n-ROTB, número de ligações rotativas; clogP, logaritmo do coeficiente de partição entre *n*-octanol e água do composto. A toxicidade oral aguda de compostos foi classificada em quatro categorias com base no critério da EPA dos EUA. A categoria III inclui compostos com valores de DL_{50} superiores a 500mg/kg, porém menores do que 5000mg/kg.

4.3 Ensaio *in vivo*

4.3.1 Atividade *in vivo* da apigenina

O tratamento oral com apigenina foi capaz de controlar, de maneira dose-dependente, a progressão da leishmaniose cutânea localizada em modelo murino. A flavona mostrou-se eficiente a partir do 32º dia de infecção, controlando a progressão da lesão até o final do experimento (45º dia), mostrando diferenças significativas no tamanho da lesão em relação ao grupo controle (Figura 4.17A). Os valores de ED₅₀ e ED₉₀ foram 1,84±0,11 e 3,18±0,34 mg/Kg/dia, respectivamente. A dose 2 mg/Kg/dia de apigenina exibiu, inclusive, maior eficácia no controle do desenvolvimento da lesão do que o antimoniato de meglumina nesse ensaio *in vivo*. Na figura 4.17B, observa-se o aspecto clínico das lesões dos camundongos ao final do 45º dia, apontando diferenças em seus estágios e maior cicatrização nos grupos tratados.

4.3.2 Determinação da carga parasitária

Nos camundongos tratados com apigenina, observamos uma redução dose-dependente da carga parasitária em relação ao grupo controle e uma diferença significativa da carga parasitária no grupo tratado com antimoniato de meglumina quando comparada a do grupo tratado com 2 mg/Kg/dia de apigenina (P<0,01) (Figura 4.17C).

4.3.3 Avaliação de parâmetros toxicológicos

A apigenina foi capaz de controlar o desenvolvimento da lesão leishmaniótica, sem alterar marcadores sorológicos de toxicidade. Os testes bioquímicos realizados mostraram que o tratamento via oral com apigenina não causou alterações hepáticas, renais ou musculares nos animais, visto que os níveis séricos de ALT, AST, creatinina, ureia e creatina quinase não apresentaram diferença significativa em relação ao controle (Figura 4.18). Os parâmetros avaliados estavam dentro da faixa de valores referenciais, com exceção dos níveis séricos de ureia, que estavam ligeiramente aumentados, e dos níveis séricos da albumina, que estavam diminuídos, em todos os grupos experimentais (Tabela 4.7).

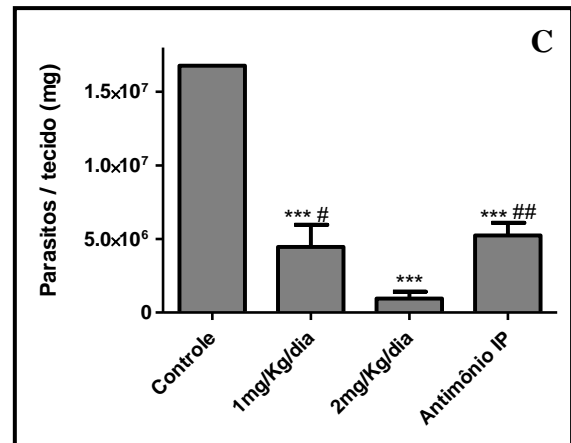
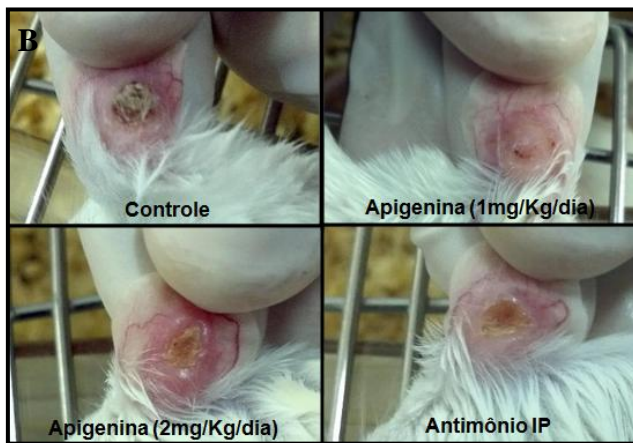
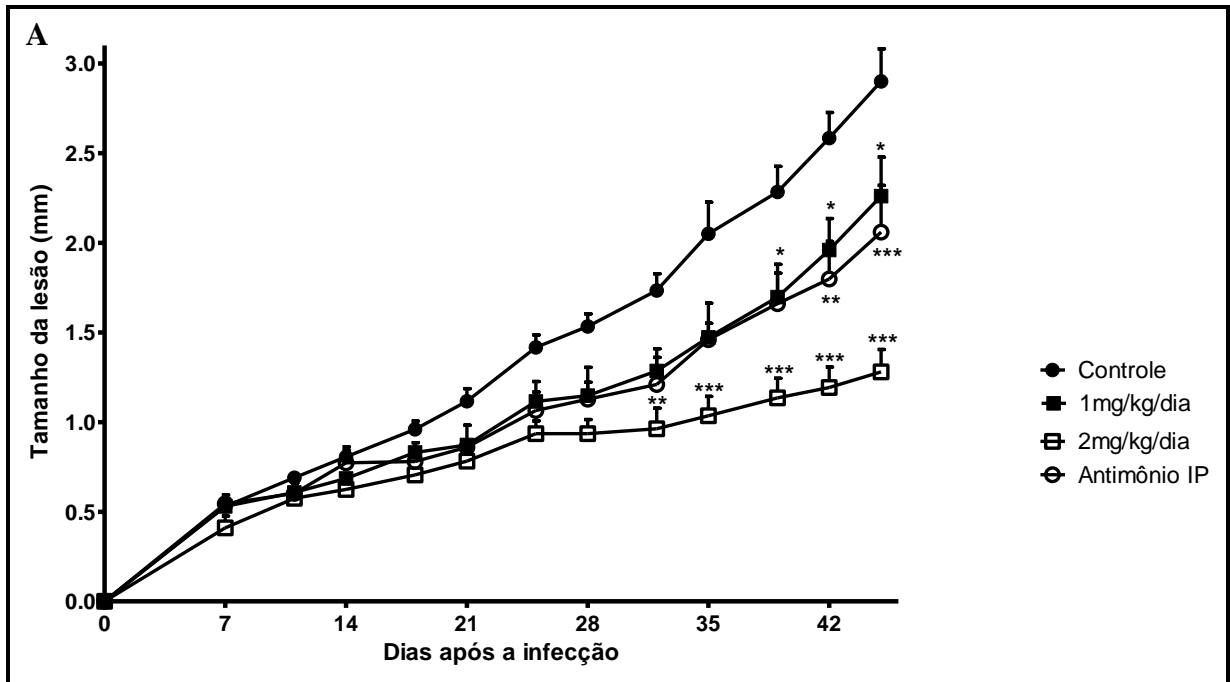


Figura 4.17: Atividade *in vivo* da apigenina. Camundongos BALB/c (5/grupo) foram infectados com *L. amazonensis* e tratados diariamente com 1 e 2 mg/kg/dia de apigenina por via oral ou 100 mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina via intraperitoneal, conforme descrito no item 3.5.1. (A) Tamanho das lesões, acompanhado durante 38 dias após a infecção. (B) Aspecto clínico das lesões ao final do ensaio. (C) Carga parasitária obtida por LDA, conforme descrito no item 3.5.2. Antimônio IP = antimoniato de meglumina via intraperitoneal; * diferença significativa em relação ao controle (P<0,05); ** (P<0,01); *** (P<0,001); # diferença significativa em relação ao grupo tratado com 2 mg/kg/dia (P<0,05);

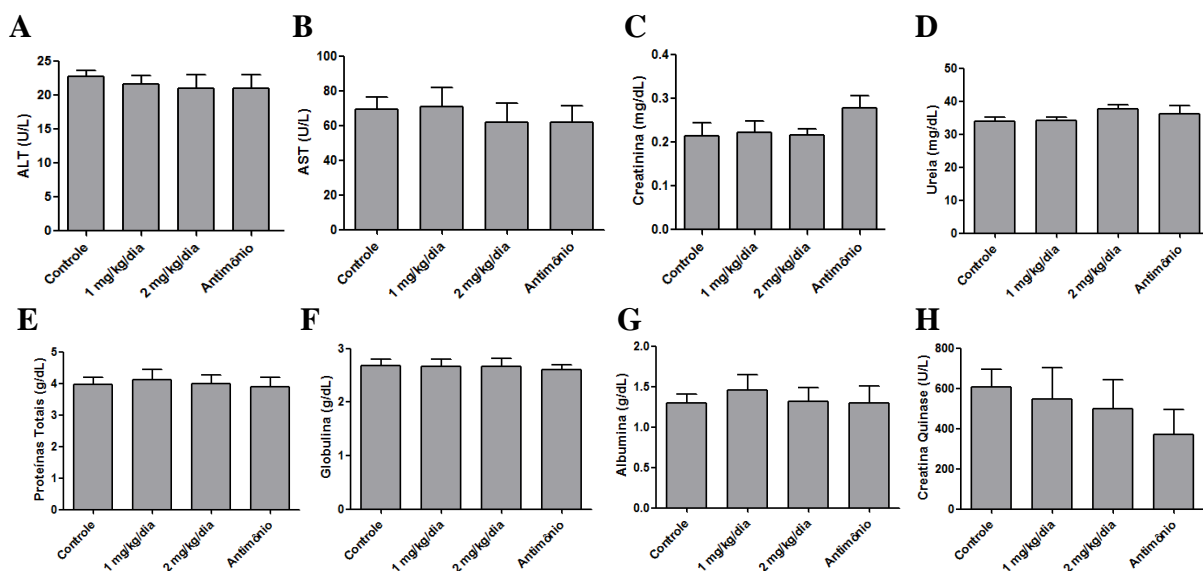


Figura 4.18: Avaliação toxicológica. O soro obtido através da centrifugação do sangue coletado dos animais foi submetido à análise de padrões toxicológicos. Os níveis séricos de (A) alanina aminotransferase, (B) aspartato aminotransferase, (C) creatinina, (D) ureia, (E) proteínas totais, (F) globulina, (G) albumina e (H) creatina quinase de camundongos BALB/c infectados, tratados por via oral com apigenina e por via intraperitoneal com antimônio, foram dosados conforme descrito no item 3.5.3. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=5).

Tabela 4.7 - Comparação dos parâmetros toxicológicos com os valores de referência

	ALT	AST	CREA	BUN	PT	GLO	ALB	CK
Valor referencial	28-132 U/L	59-247 U/L	0,20-0,80 mg/dL	18-29 mg/dL	3,60-6,60 g/dL	0-6,00 g/dL	2,50-4,80 g/dL	68-1070 U/L
Controle	22,8 \pm 0,8	69,5 \pm 5,8	0,215 \pm 0,03	33,9 \pm 1,0	4,0 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1	608 \pm 74,18
Apigenina 1mg/Kg/dia	21,6 \pm 1,1	71 \pm 9,8	0,222 \pm 0,02	34,1 \pm 1,0	4,1 \pm 0,3	2,7 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	546,6 \pm 139,8
Apigenina 2mg/Kg/dia	21,0 \pm 1,8	61,8 \pm 10,0	0,217 \pm 0,01	37,8 \pm 1,1	4,0 \pm 0,3	2,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	498,8 \pm 127,8
Antimônio	21,1 \pm 1,7	62 \pm 7,8	0,278 \pm 0,02	36,3 \pm 2,0	3,9 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,2	369 \pm 102,9

Os níveis séricos da ALT, AST e CREA foram dosados por kits comerciais e os níveis de BUN, PT, GLO, ALB e CK foram dosados pela Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ), conforme descrito no item 3.5.3. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=5). Valores referenciais fornecidos pela própria Plataforma.

5. DISCUSSÃO

As plantas são fontes valiosas para a triagem de metabolitos secundários bioativos, que produzem compostos farmacologicamente úteis. Vários compostos naturais derivados de plantas têm mostrado eficácia contra diversas doenças parasitárias negligenciadas e representam uma grande oportunidade para o descobrimento de novos medicamentos (Fournet e Muñoz, 2002; Kaiser e cols, 2003; Rocha e cols, 2005; Polonio e Efferth, 2008; Schmidt e cols, 2012; Ndjonka e cols, 2013). Dentre eles, os flavonoides vêm recebendo grande destaque, inclusive por apresentarem atividade contra *Toxoplasma gondii* (Halonen e cols 1999), *Plasmodium falciparum* (Lehane e Saliba, 2008), *T. brucei rhodesiense* (Mamani-Matsuda e cols, 2004; Tadesmir e cols, 2006), *T. cruzi* (Tadesmir e cols, 2006; Guida e cols, 2007), *L. donovani* (Tadesmir e cols, 2006) e *L. amazonensis* (Fonseca-Silva e cols, 2011; 2013; Inácio e cols, 2012; 2013).

A apigenina, membro da subclasse flavona dos flavonoides, está presente abundantemente em frutas e verduras e apresenta variadas atividades biológicas, como efeitos anti-inflamatórios, antineoplásicos, antivirais, purgativos e propriedades removedoras de radicais livres. A apigenina inibe o crescimento de células cancerosas através da indução de apoptose e promoção da parada do ciclo celular (Shukla & Gupta, 2010). Além da atividade contra células cancerosas, a apigenina mostrou inibir a replicação *in vitro* de *Encephalitozoon intestinalis* e *Cryptosporidium parvum* (Mead e McNair, 2006), *L. donovani*, *T. brucei rhodesiense* e *T. cruzi* (Tasdemir e cols, 2006). Dímeros sintéticos de apigenina foram sinergicamente capazes de aumentar a susceptibilidade do protozoário *Leishmania* à pentamidina, revertendo essa resistência, presumivelmente por inibir um tipo transportador ABC (Wong e cols, 2009).

No presente estudo, avaliamos o efeito da apigenina sob as diferentes formas evolutivas do parasito *L. amazonensis*. Observamos que a apigenina inibiu o crescimento de promastigotas de uma forma dose-dependente com 24 h de tratamento, atingindo 74% de inibição das promastigotas na concentração de 96µM e IC₅₀ de 23,68 µM. Ao compararmos com outros flavonoides, ela apresentou considerável inibição em menor tempo. A quercetina inibiu 66% dos promastigotas após 48 horas de tratamento na concentração de 96µM, com IC₅₀ de 31,4µM (Fonseca-Silva e cols, 2011). A epigalocatequina-3-galato (EGCG) apresentou uma inibição de 80,7% em 72 horas com a concentração de 500µM, com IC₅₀ de 278,5µM (Inácio e cols, 2013). Cabe ressaltar que, além do efeito leishmanicida verificado na contagem direta, a apigenina mostrou, através da marcação com o CFSE, reduzir de maneira dose-dependente a proliferação dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados. O CFSE é

amplamente utilizado para estudos de proliferação celular, visto que atravessa facilmente as membranas celulares intactas e sua intensidade de fluorescência reduz sucessivamente à metade a cada divisão celular.

A apigenina também inibiu o crescimento de amastigotas intracelulares de forma dose-dependente com 72 h de tratamento, atingindo 71% de redução do índice de infecção na concentração de 12 μ M (IC₅₀ = 4,33 μ M). A concentração máxima de apigenina usada para amastigotas não resultou em efeitos citotóxicos nos macrófagos. A LD₅₀, em macrófagos murinos, após 72 h de tratamento com a flavona, foi de 78,72 μ M e o IS foi 18,18. Segundo Weniger (Weniger e cols, 2001), considera-se que a eficácia biológica não é devida à citotoxicidade *in vitro* quando este índice é ≥ 10 . A potência leishmanicida da apigenina foi próxima a da miltefosina (IC₅₀ / 72 h = 3,2 μ M), já usada com sucesso para o tratamento de leishmaniose no Novo Mundo, e da flavona quercetina (IC₅₀ / 72 h = 3,4 μ M), que inibiu 74,8% do índice de infecção de *L. amazonensis* na concentração de 12 μ M (Fonseca-Silva e cols, 2013). Tasdemir e colaboradores (2006) também verificaram a atividade antiprotozoária da apigenina contra amastigotas axênicos de *L. donovani* (IC₅₀/72h = 1,9 μ g/mL = 7,03 μ M), formas sanguíneas de *T. brucei rhodesiense* (IC₅₀/72h = 5,1 μ g/mL = 18,88 μ M) e tripomastigotas de *T. cruzi* (IC₅₀/96h = 21,8 μ g/mL = 80,67 μ M).

Embora os flavonoides sabidamente apresentem propriedades antioxidantes, alguns estudos têm demonstrado sua atividade pró-oxidante *in vitro*, que é dependente da concentração, da reação com outros componentes do meio de cultura como íons metal de transição, do número total de grupos hidroxila na estrutura molecular e da natureza do estresse oxidativo (Cao e cols, 1997; Miura e cols, 1998; Lapidot e cols, 2002; Behling e cols, 2004; Halliwell, 2008). Flavonas como luteolina, apigenina e crisina exibiram atividade antioxidante em baixas concentrações de ferro, mas foram pró-oxidantes em altas concentrações deste metal (Sugihara e cols, 1999). A apigenina foi capaz de induzir o aumento na produção de ERO de maneira dose-dependente em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas, como observado com quercetina (Fonseca-Silva e cols, 2011). A apigenina também foi capaz de gerar um aumento significativo na produção seletiva de H₂O₂ nos promastigotas tratados. Experimentos *in vitro* demonstraram um efeito leishmanicida dose-dependente do H₂O₂ contra promastigotas de *L. donovani*, *L. tropica* e *L. chagasi*. A susceptibilidade do parasita ao H₂O₂ é estágio-específico (Van Assche e cols, 2011).

Tal como ocorreu com a quercetina (Fonseca-Silva e cols, 2013), um aumento dose-dependente na geração de ERO também foi constatado em macrófagos infectados e tratados com 3-12 μ M de apigenina. Verificou-se uma correlação linear entre a porcentagem de inibição do índice infecção e a produção de ERO após o tratamento com a apigenina ($R^2 =$

0,9306). As ERO, gerados por agentes antiparasitários ou por macrófagos, podem matar parasitos intracelulares (Das e cols, 2001). Foi mostrado que as ERO e o desequilíbrio da homeostase do cálcio contribuem para a morte celular programada induzida pela curcumina em *L. donovani* (Das e cols, 2008). Em células de mamíferos, o aumento da produção celular de ERO tem sido sugerido como um responsável pela despolarização do $\Delta\Psi_m$, causando conseqüentemente a morte celular (Bank e cols, 1999; Johnson e cols, 1996).

A GSH é uma molécula importante na proteção das células contra a ação de ERO ou compostos tóxicos e seus níveis intracelulares podem ser aumentados utilizando o antioxidante NAC (Sudhandiran & Shaha, 2003; Leite e cols, 2009). Em *L. amazonensis*, a glutathiona é um dos componentes de tripanotiona, uma importante molécula antioxidante do parasito (Castro-Pinto e cols, 2007). A molécula contém o grupamento tiol e existe sob duas formas: a reduzida (GSH) e a oxidada (GSSG). Na forma reduzida, o resíduo de cisteína apresenta o grupamento tiol que está envolvido nas reações de redução de alguns compostos. Na forma oxidada, duas moléculas de glutathiona estão ligadas através de seus grupamentos sulfidríla formando uma ponte dissulfeto. No estresse oxidativo, a GSH reduz as ERO, gerando grandes quantidades de GSSG (Lu, 1999). Se a elevação nos níveis de ERO estaria causando a morte do parasito, a incubação com os antioxidantes GSH e NAC poderia evitar o efeito inibitório promovido pela apigenina. Observou-se que a atividade leishmanicida da flavona foi suprimida em virtude da diminuição na produção de ERO com a utilização destes antioxidantes.

É descrito que o aumento nos níveis de ERO pode desencadear uma diminuição do $\Delta\Psi_m$ (Fidalgo e Gille, 2011; Galluzzi e cols, 2012). Uma característica geral dos tripanosomatídeos é a presença de uma mitocôndria única, sendo esta um bom indicador de disfunção celular (Luque-Ortega e cols, 2001) e um alvo terapêutico atrativo (Fidalgo e Gille, 2011). Nos metazoários, mitocôndrias viáveis podem compensar o mau funcionamento daquelas que foram danificadas. Entretanto, em *Leishmania*, o processo de sobrevivência está relacionado diretamente com o funcionamento dessa organela única e, em última instância, de sua cadeia respiratória (Shaha, 2006). Para verificar se a apigenina causava disfunção mitocondrial no parasito, utilizou-se o corante fluorescente JC-1, que se concentra de forma agregada na mitocôndria viável quanto maior o $\Delta\Psi_m$. Observou-se uma acentuada diminuição do $\Delta\Psi_m$, de forma dose-dependente, nos promastigotas tratados por 24h com a flavona. Alterações ultraestruturais na mitocôndria, como notável inchaço, perdas das cristas, aspecto “lavado” e perda de elétron-densidade na matriz, também foram visualizadas pela MET, corroborando a constatação de perda do $\Delta\Psi_m$ no ensaio bioquímico com JC-1. Efeitos

similares foram observados por Inacio e cols (2012) após o tratamento de *L. amazonensis* com a EGCG.

Vários estudos têm demonstrado que variações no $\Delta\Psi_m$, induzidas por drogas, estão associadas com a inibição da proliferação celular em células de *Trypanosoma cruzi* (Santa-Rita e cols, 2006; Mukherjee e cols, 2009; Menna-Barreto e cols, 2007, 2009), *L. donovani* (Mehta & Shaha, 2006; Roy e cols, 2008) e *L. amazonensis* (Rodrigues e cols, 2007; Khouri e cols, 2010; Fernanda-Silva e cols, 2011; Inácio e cols, 2012). A perda do $\Delta\Psi_m$ é uma característica de apoptose em metazoários e tem sido observada durante a morte induzida por fármacos em *Leshmania* (Dutta e cols, 2007; Sen e cols, 2007; Roy e cols, 2008; Das e cols, 2001; Ribeiro e cols, 2013). O colapso do $\Delta\Psi_m$ do parasito, mediado pelo aumento da formação de ROS (evento detectado em experimentos realizados paralelamente) é um mecanismo de ação plausível da morte dos parasitos. Contudo, outros eventos bioquímicos foram observados, ampliando as possibilidades de mecanismo de ação.

A apigenina mostrou ainda promover parada do ciclo celular nos promastigotas tratados, visto que houve um aumento da proporção de células na fase Sub-G0/G1 e a diminuição do número de células na fase G2/M, de maneira dose dependente. O aumento da proporção de células no sub-G0/G1 é sugestivo de células submetidas a um processo de apoptose (Ribeiro e cols, 2013). Estudos com linhagens de células cancerosas têm mostrado que a apigenina inibe o crescimento destas através da indução de apoptose e promoção da parada do ciclo celular (Choi e Kim, 2009; Shukla e Gupta, 2010; Zhu e cols, 2013). A flavona modula certas vias de transdução de sinal que têm relevância no câncer, e seus efeitos anticancerígenos parecem estar relacionados com a sua ação no bloqueio da progressão do ciclo celular (nas fases de transição $G1 \rightarrow S$ ou $G2 \rightarrow M$) e com sua capacidade de induzir a apoptose. Os sítios potenciais da ação da apigenina incluem a fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K), a proteína cinase B/Akt, MAPK/ERK1/2 clássica, cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e a caseína cinase (CK2) (Shukla e Gupta, 2007). Análises cinéticas apontam a apigenina como inibidor competitivo dos sítios do ATP na CK2 (Lolli e cols, 2012).

O rompimento das membranas plasmáticas com extravasamento do conteúdo celular é um evento característico da necrose (Galluzzi e cols, 2007). Uma das características típicas da morte celular apoptótica é a manutenção da integridade das membranas celulares. Então, avaliou-se a integridade de membrana dos promastigotas tratados por citometria de fluxo, utilizando o PI, um agente intercalante de DNA que não atravessa membranas celulares íntegras. Sua marcação, portanto, infere alterações na integridade das membranas celulares e auxilia na identificação do tipo de morte celular que foi desencadeado nas células (Silva e cols, 2001; Elmore, 2007). O tratamento com 3-96 μM apigenina por 24 h não alterou a

integridade de membrana dos promastigotas de *L. amazonensis*, visto que estes parasitos não apresentaram marcação significativa para o PI, excluindo então a morte do tipo necrótica.

Várias alterações no núcleo têm sido descritas durante a fase efetora da apoptose. A degradação do DNA é provavelmente o marcador mais frequente de morte apoptótica em metazoários. Em protozoários como *Leishmania*, a ocorrência deste evento tem sido relatada após privação de soro, choque térmico, tratamento com óxido nítrico ou peróxido de hidrogênio, e com diferentes drogas, incluindo antimoniais, novobiocina, miltefosina, edelfosina ou inibidores da cadeia respiratória (Jiménez-Ruiz e cols, 2010). Na tentativa de elucidar a possível ocorrência de morte apoptótica nos promastigotas tratados com apigenina, realizou-se o ensaio de TUNEL. Entretanto, a apigenina não mostrou induzir fragmentação de DNA significativa nos promastigotas após 24 h de tratamento.

Dados recentes indicam que a fosfatidilserina (PS) está ausente (ou pelo menos abaixo do nível de detecção) em promastigotas de *Leishmania* sp, levantando dúvidas sobre a especificidade da ligação da anexina V nestes protozoários. Além disso, anexina V é conhecida por se ligar a outros fosfolípidos do parasito que não estão relacionados a apoptose. Assim, um aumento na marcação para anexina V pode não ser necessariamente indicativo de morte celular (Proto e cols, 2013). Visto os dados controversos na literatura, este ensaio não foi realizado. Diante da dificuldade em reconhecer a presença de marcadores bioquímicos e morfológicos específicos de um único tipo de morte, sugerimos sua classificação como morte incidental, termo já defendido por Proto e cols (2013) nestas circunstâncias de incerteza.

O processo autofágico ocorre em níveis basais em todas as células para a realização de homeostase e pode ser induzida em situações de estresse nutricional, retirada de fatores de crescimento, demandas bioenergéticas elevadas, remodelamento estrutural, estresse oxidativo, infecções, acúmulo de agregados proteicos, entre outras. Além da importância na reciclagem de macromoléculas para a homeostase, a autofagia pode ser recorrida como um mecanismo de defesa inata contra microrganismos, eliminando patógenos intracelulares de maneira semelhante ao processo de captura e degradação de moléculas e organelas. Esse mecanismo envolve a entrega seletiva dos microrganismos aos lisossomos (processo chamado de xenofagia) e a entrega de ácidos nucleicos e antígenos microbianos aos compartimentos endo/lisossomais, para a ativação da imunidade inata e adaptativa (Deretic, 2006; Levine & Deretic, 2007; Schmid & Munz, 2007).

O papel da autofagia na infecção causada pela *Leishmania* ainda não é muito bem compreendido e os dados encontrados na literatura apresentam algumas discordâncias. Pinheiro e colaboradores (2009) demonstraram que a indução de autofagia aumenta a carga

parasitária de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, mas não altera a carga parasitária de macrófagos de camundongos C57BL/6. Já Lima e colaboradores (2011) correlacionaram a indução de autofagia em macrófagos murinos de diferentes origens e linhagens à redução da capacidade fagocítica destes macrófagos, diminuindo o número de *L. amazonensis* por célula. Um estudo sugere que um dos mecanismos através dos quais a apigenina exerce a sua ação quimiopreventiva pode ser por meio de ativação de proteína cinase ativada por AMP (AMPK), inibição da sinalização de mTOR e indução de autofagia em queratinócitos humanos (Tong e cols, 2012). No presente estudo, a análise por MET mostrou que alguns macrófagos infectados e não tratados já exibiam estruturas membranosas concêntricas típicas de autofagia e que o tratamento com apigenina induziu ao aumento no número de autofagossomos próximos aos vacúolos parasitóforos, sugerindo a participação da autofagia no mecanismo de ação do composto. Parece existir uma sequência de eventos envolvendo autofagossomos, que resultam na redução da infecção, sugeridos o aumento do aparecimento de vacúolos vazios juntamente com a presença de parasitos em estágios distintos de degradação.

Além dos efeitos *in vitro*, a apigenina mostrou controlar o desenvolvimento da lesão *in vivo* de forma eficiente, sem alteração dos marcadores sorológicos de toxicidade. O grupo que recebeu o tratamento via oral com o composto apresentou, a partir do 32º dia de infecção, uma diferença significativa na espessura da orelha lesionada, quando comparada a do grupo controle. A atividade da flavona se manteve até o final do experimento, além de resultar na redução dose-dependente da carga parasitária. O tratamento via oral com apigenina não culminou em alterações nos marcadores sorológicos para função hepática, renal ou muscular. Os valores séricos estavam dentro da faixa dos valores de referência e também não foram observadas alterações comportamentais ou perda de peso nos camundongos. Outro dado bastante interessante foi que a apigenina exibiu propriedades ADMET favoráveis e preencheu a "regra dos 5" de Lipinski.

A análise das propriedades ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção, e toxicidade) desempenha um papel fundamental na descoberta de candidatos a fármacos, pesticidas e produtos químicos industriais, e na avaliação de seus perigos ambientais. O banco de dados de relação estrutura-atividade AdmetSAR fornece gratuitamente os mais recentes e abrangentes dados de diversos produtos químicos relacionados à estas propriedades, sendo muito útil para triagem *in silico* de candidatos a medicamentos e produtos químicos ambientais (Cheng e cols, 2012).

Por questões de conveniência e segurança, a via de administração oral de fármacos é preferencial. Após a administração, o fármaco deve se dissolver e ser solubilizado no trato

gastrointestinal para poder ser absorvido através da membrana intestinal. Entre as propriedades moleculares que influenciam a absorção destacam-se a solubilidade e a lipofilia (associada ao coeficiente de partição octanol/água - clogP). Em relação à absorção, há elevada probabilidade da apigenina ser permeável a barreira hemato-encefálica, ao intestino humano e à linhagem de adenocarcinoma de cólon humano que mimetiza o epitélio gastrointestinal (Caco-2).

A "regra dos 5" de Lipinski afirma que a má absorção ou penetração é mais provável quando: há mais de 5 doadores ligantes de hidrogênio (HBD) (a apigenina tem 3); o peso molecular do composto é superior a 500 (o da apigenina é 270,24); o clogP é superior a 5 (o da apigenina é 2,58); e há mais de 10 receptores ligantes de hidrogênio (HBA) (a apigenina tem 5). Classes de compostos que são substratos para transportadores biológicos são exceções à regra (Lipinski e cols, 2001). A apigenina enquadrou-se positivamente em todos os critérios de Lipinski, mostrando ser bem absorvida, permeável, biodisponível e oralmente viável.

As enzimas do citocromo P450 são amplamente distribuídas e estão envolvidas no metabolismo de uma variedade de compostos, endógenos e exógenos, incluindo fármacos, substâncias ambientais e outros xenobióticos. O metabolismo de fármacos engloba reações catalisadas por numerosas isoformas da CYP450, como a CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 e 3A4/5 (Goodman & Gilman, 2005), e sua inibição pode resultar na não metabolização de outros fármacos. Em relação ao metabolismo, há elevada probabilidade da apigenina não ser inibidora promíscua das principais isoformas da CYP450. A apigenina não é substrato da CYP450 2C9, 2D6 e 3A4, e é inibidor da CYP450 1A2, 2C9, 2C19 e 3A4. Isto pode resultar em sua metabolização mais demorada, tornando-a ativa por mais tempo, como pode também interferir na metabolização de outros fármacos.

Além disso, na avaliação *in silico*, a apigenina não mostrou ser mutagênica, carcinogênica e ter toxicidade oral aguda elevada. Estes dados, juntos aos resultados de atividade dose-dependente *in vitro* e *in vivo*, nos entusiasma em propor a apigenina como um composto suplementar no tratamento da leishmaniose.

6. CONCLUSÕES

- O tratamento com apigenina inibiu de maneira dose-dependente a proliferação celular de promastigotas de *L. amazonensis*, conforme observado pela contagem direta em câmara de Neubauer e pela marcação com o CFSE;
- A apigenina foi capaz de diminuir o índice de infecção de maneira dose-dependente em macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*, sendo seletivamente citotóxico para os parasitos intracelulares;
- Observou-se que a apigenina foi capaz de induzir um aumento dos níveis de ERO nos promastigotas e nos macrófagos infectados tratados, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela morte dos parasitos, visto o efeito protetor da incubação com os antioxidantes NAC e GSH;
- A apigenina também foi capaz de causar disfunção mitocondrial, observada tanto estruturalmente por MET quanto pela diminuição no $\Delta\Psi_m$, nos promastigotas tratados;
- A apigenina também promoveu parada do ciclo celular nos promastigotas tratados, visto que houve um aumento da proporção de células na fase Sub-G0/G1 e a diminuição do número de células na fase G2/M de maneira dose dependente;
- Apesar do composto ter induzido alguns eventos clássicos associados à apoptose, não foi observada a fragmentação de DNA nuclear típica;
- A análise por MET mostrou que o tratamento com apigenina induziu o aparecimento de estruturas membranosas concêntricas em promastigotas e um aumento no número de autofagossomos próximos das amastigotas nos macrófagos infectados, sugerindo a participação da autofagia no mecanismo de ação do composto;
- Na avaliação *in silico*, a apigenina exibiu propriedades ADMET desejáveis e preencheu a "regra dos 5" de Lipinski, mostrando ser bem absorvida, permeável, biodisponível e oralmente viável;
- O tratamento oral com apigenina foi capaz de controlar, de maneira dose-dependente, a progressão da leishmaniose cutânea localizada em modelo murino, sem apresentar toxicidade aos camundongos. Essas características a tornam um possível protótipo para o tratamento suplementar da leishmaniose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology* 2010; 137(5): 785-91.
- Alberts B, Jonhson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula*. 5ª ed. Porto Alegre: Artemed, 2010.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J e cols. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 2012; 7(5): e35671.
- Antinori S, Schifanella L, Corbellino M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012; 31:109–118.
- Bailey, M.S. & Lockwood, D.N. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol*. 2007; 25 (2): 203-211.
- Bank K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *J Immunol*. 1999; 162(3): 1466-79.
- Bastos MM, Boechat N, Gomes ATPC, Neves MGPMS, Cavaleiro JAS. O Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Rev. Virtual Quim*. 2012; 4 (3): 257-267.
- Behling EB, Sendão MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi, MLP. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alim. Nutr., Araraquara*, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- Brennand A, Rico E, Michels PAM. Autophagy in Trypanosomatids. *Cells* 2012; 1; 346-371.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142, w13659.
- Brito AM, Dos Santos D, Rodrigues SA, Brito RG, Xavier-Filho L. Plants with anti-*Leishmania* activity: Integrative review from 2000 to 2011. *Pharmacogn Rev*. 2013; 7(13): 34–41.
- Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radic Biol Med*. 1997; 22(5): 749-60.
- Castro-Pinto DB, Lima EL, Cunha AS, Genestra M, De Léo RM, Monteiro F, Leon LL. *Leishmania amazonensis* trypanothione reductase: evaluation of the effect of glutathione analogs on parasite growth, infectivity and enzyme activity. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2007; 22(1): 71-5.
- Cavalli A. & Bolognesi ML. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Med Chem*. 2009; 52 (23), 7339-7359.
- Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, Liu G e cols. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties. *J. Chem. Inf. Model*. 2012; 52; 3099–3105.
- Croft SL. & Coombs GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003; 19(11): 502-508.
- Czaplińska M, Czepas J, Gwoździński K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. *Postepy Biochem*. 2012; 58(3): 235-44.

- Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, do Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ e cols. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 1555–1559.
- Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis*, 2008; 13 (7): 867-882.
- Deponte, M. Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1783 (7): 1396-1405.
- Deretic, V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Current Opinion in Immunology*, 2006; 18: 375-382.
- DNDi. Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas. Relatório anual. 2012-2013.
- Dodson HC, Lyda TA, Chambers JW, Morris MT, Christensen KA, Morris JC. Quercetin, a fluorescent bioflavonoid, inhibits *Trypanosoma brucei* hexokinase 1. *Exp Parasitol*. 2011; 127(2): 423-8.
- Duszenko M, Ginger ML, Brennand A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH e cols. Autophagy in protists. *Autophagy*. 2011; 7(2): 127-58.
- Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. *Aloe vera* leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 2007; 56 (Pt 5): 629-636.
- Dutta A, Ghoshal A, Mandal D, Mondal NB, Banerjee S, Sahu NP, Mandal C. Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. *J Med Microbiol* 2007; 56:1196–204.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35 (4): 495-516.
- Ezra N, Ochoa MT, Craft N. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010; 2(3): 248-57.
- Fidalgo LM & Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* 2011; 28(11): 2758-2770.
- Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*, 2011; 6(2): e14666.
- Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive Oxygen Species Production by Quercetin Causes the Death of *Leishmania amazonensis* Intracellular Amastigotes. *J Nat Prod*. 2013; 76(8): 1505-8.
- Fournet A. & Muñoz V. Natural Products as Trypanocidal, Antileishmanial and Antimalarial Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 1215-1237.
- Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* 2009; 14: 2317-2336.
- Gannavaram S. & Debrabant A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2012; 2; 95.
- Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ* 2007; 14 (7): 1237-1243.

- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012; 13(12): 780-8.
- Gil ES, Paula JR, Nascimento FRF, Bezerra JCB. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Rev. Ciênc. Farm. Básica.* 2008; 29 (3): 223-230.
- Goto H & Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009; 8 (4): 419-433.
- Grimaldi GJr, Momen H, Naiff RD, McMahan-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 44(6): 645-61.
- Guida MC, Esteva MI, Camino A, Flawiá MM, Torres HN, Paveto C. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). *Exp Parasitol*, 2007; 117: 188–194.
- Gupta S, Afaq F, Mukhtar H. Selective growth-inhibitory, cell-cycle deregulatory and apoptotic response of apigenin in normal versus human prostate carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 287(4): 914-20.
- Haliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008; 476(2): 107-12.
- Halonen SK, Chiu FC, Weiss LM. Effect of cytokines and quercetin on *Toxoplasma gondii* cyst induction in murine astrocytes. *J Eukaryot Microbiol.* 1999; 46(5): 83S-84S.
- Herman M, Gillies S, Michels PA, Rigden DJ. Autophagy and related processes in trypanosomatids: insights from genomic and bioinformatic analyses. *Autophagy.* 2006; 2(2):107-18.
- Hoensch H. & Oertel R. Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids. *DtschMed Wochenschr.* 2012; 137(51-52): 2738-40.
- Inácio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2012; 132(2): 151-5.
- Inácio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. *In vitro* and *in vivo* effects of (-)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. *J Nat Prod.* 2013; 25; 76(10): 1993-6.
- Jain K. Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis, *Drug Discov Today*, 2013; 18(23-24): 1272-81.
- Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Lüder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010; 3: 104.
- Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T. Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93(21): 11848-52.
- Karagiannis-Voules DA, Scholte RG, Guimarães LH, Utzinger J, Vounatsou P. Bayesian Geostatistical Modeling of Leishmaniasis Incidence in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(5): e2213.
- Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res.* 2003; 90; Suppl 2: S55-62.
- Khouri R, Novais F, Santana G, de Oliveira CI, Vannier dos Santos MA, Barral A e cols. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human *in vitro* and murine *in vivo* models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. *PLoS One* 2010; 5(12): e14394.

- Kiel JA. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 2010; 365(1541): 819–30.
- Kobets T, Grekov I, Lipoldova M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, 2012; 19(10): 1443-1474.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH e cols. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3–11.
- Lapidot T, Walker MD, Kanner J. Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic beta-cells *in vitro*. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(25): 7220-5.
- Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ* 2002; 9(1): 53–64.
- Lehane AM & Saliba KJ. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res Notes.* 2008; 18, 1:26.
- Leite MS, Thomaz R, Oliveira JH, Oliveira PL, Meyer-Fernandes JR. *Trypanosoma brucei brucei*: effects of ferrous iron and heme on ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity. *Exp Parasitol.* 2009; 121(2): 137-43.
- Levine B & Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(10): 767-77.
- Lima, JGB, Vinhas, CF, Gomes, IN, Azevedo, CM, Santos, RR, Vannier-Santos, MA, Veras, PST. Phagocytosis is inhibited by autophagic induction in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011; 25; 405(4): 604-9.
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 46(1-3): 3-26.
- Lolli G, Cozza G, Mazzorana M, Tibaldi E, Cesaro L, Donella-Deana A e cols. Inhibition of Protein Kinase CK2 by Flavonoids and Tyrphostins. A Structural Insight. *Biochemistry* 2012; 7; 51(31): 6097-107.
- Loría-Cervera EN & Andrade-Narváez FJ. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2014; 56(1): 1-11.
- Lu SC. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 1999; 13(10): 1169-83.
- Luque-Ortega JR, Rivero-Lezcano OM, Croft SL, Rivas L. *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): 1121-5.
- Mamani-Matsuda M, Rambert J, Malvy D, Lejoly-Boisseau H, Daulouède S, Thiolat D e cols. Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(3): 924-9.
- Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods*, 2010; 2; 996–1004.
- Masmoudi A, Hariz W, Marrekchi S, Amouri M, Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. *J Dermatol Case Rep.* 2013; 7(2): 31-41.
- McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G. Determinants for the Development of Visceral Leishmaniasis Disease. *PLoS Pathog.* 2013; 9(1): e1003053.

- Mead JR. & McNair N. Antiparasitic activity of flavonoids and isoflavones against *Cryptosporidium parvum* and *Encephalitozoon intestinalis*. FEMS Microbiol Lett. 2006; 259 (1): 153–7.
- Mehta A. & Shaha C. Mechanism of metalloinduced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione. Free Radic Biol Med. 2006; 40(10): 1857-68.
- Mehta A. & Shaha C. Apoptotic Death in *Leishmania donovani* Promastigotes in Response to Respiratory Chain Inhibition. J Bio Chem. 2004; 279(12): 11798-813.
- Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, de Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. Parasitol Res. 2007; 101(4): 895-905.
- Menna-Barreto RF, Goncalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med. 2009; 47(5): 644-53.
- Menna-Barreto RF & de Castro SL. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. Biomed Res Int. 2014; 2014: 614014.
- Messaritakis I, Mazeris A, Koutala E, Antoniou M. *Leishmania donovani* s.l.: evaluation of the proliferation potential of promastigotes using CFSE staining and flow cytometry. Exp Parasitol. 2010; 125(4): 384-8.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica - 1 ed., 5 reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. ed. Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- Ministério da Saúde. Leishmaniose visceral: recomendações clínicas para redução da letalidade / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2011.
- Ministério da Saúde. Nota técnica nº52/2011-/CGDT/DEVIT/SVS/MS. Orientações sobre a utilização da Anfotericina B para o tratamento de pacientes com as leishmanioses.
- Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- Mishra BB, Kale RR, Singh RK, Tiwari VK. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. Fitoterapia 2009; 80(2): 81-90.
- Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. Mini Rev Med Chem 2009; 9 (1): 107-23.
- Miura YH, Tomita I, Watanabe T, Hirayama T, Fukui S. Active oxygens generation by flavonoids. Biol Pharm Bull. 1998; 21(2): 93–6.
- Monge-Maillo B & López-Vélez R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Drugs 2013; 73(17): 1889–920.
- Monge-Maillo B & López-Vélez R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. Drugs 2013; 73(17):1863–88.

- Mukherjee P, Majee SB, Ghosh S, Hazra B. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. *Int J Antimicrob Agents*. 2009; 34(6): 596-601.
- Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* 2006; 67(18): 2071–7.
- Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. *Int J Mol Sci*. 2013; 14(2): 3395-439.
- Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008; 6 (9): 754-765.
- Neves DP, de Melo AL, Linardi PM, Vitor, RWA. *Parasitologia Humana*. 11.ed, Editora Atheneu, 2005.
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 1991; 139 (2): 271-9.
- OMS. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, Mar 2010.
- Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review). *Int J Oncol*. 2007; 30(1): 233-45.
- Pham TT, Loiseau PM, Barratt G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *Int J Pharm*. 2013; 454(1): 539-52.
- Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM e cols. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009; 11(2): 181-90.
- Polonio T & Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med*. 2008; 22(3): 277-86.
- Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nat Rev Microbiol*. 2013; 11(1): 58-66.
- Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ e cols. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(4):789-99.
- Rocha LG, Almeida JR, Macêdo RO, Barbosa-Filho JM. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 2005; 12(6-7): 514-35.
- Rodrigues JC, Bernardes CF, Visbal G, Urbina JA, Vercesi AE, de Souza W. Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. *Protist*. 2007; 158(4): 447-56.
- Rodrigues JC, Godinho JL, de Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Subcell Biochem*. 2014; 74: 1-42.
- Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria dependent ROS-mediated programmed cell death (PCD) induced by 3,3'-Diindolylmethane (DIM) through Inhibition of FoF1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol*. 2008; 74(5): 1292-307.

- Rigden DJ, Herman M, Gillies S, Michels PA. Implications of a genomic search for autophagy-related genes in trypanosomatids. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33(Pt 5): 972-4.
- Sacks D. & Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol.* 2001; 55: 453-83.
- Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(5): 780-4.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB e cols. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.* 2008; 103 (1): 1-10.
- Schimid D & Munz C. Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 2007; 27(1): 11-21.
- Schmidt TJ, Khalid SA, Romanha AJ, Alves TM, Biavatti MW, Brun R e cols. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases – Part I e II. *Curr Med Chem.* 2012; 19(14): 2128-228.
- Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S e cols. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ.* 2004; 11(8): 924-36.
- Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004; 279(50): 52366-75.
- Sen N, Banerjee B, Das BB, Ganguly A, Sen T, Pramanik S e cols. Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. *Cell Death Differ.* 2007; 14(2): 358-67.
- Sen R, Bandyopadhyay S, Dutta A, Mandal G, Ganguly S, Saha P, Chatterjee M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol.* 2007; 56 (Pt 9): 1213-18.
- Sepulveda-Boza S. & Cassels BK. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.* 1996; 62(2): 98-105.
- Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* 2006; 123(3): 233-244.
- Shukla AK, Singh BK, Patra S, Dubey VK. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010; 160(8): 2208-18.
- Shukla S & Gupta S. Apigenin-induced cell cycle arrest is mediated by modulation of MAPK, PI3K-Akt, and loss of cyclin D1 associated retinoblastoma dephosphorylation in human prostate cancer cells. *Cell Cycle* 2007; 6(9): 1102-14.
- Shukla S & Gupta S. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res.* 2010; 27(6): 962–978.
- Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med.* 2012; 5(6): 485-97.
- Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105(1): 1–6.

- Souza-Gomes ML e cols. Coinfecção Leishmania-HIV no Brasil: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. *Epidemiol. Serv. Saúde. Brasília*, 2011; 20(4): 519-526.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J e cols. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008; 118(4), 1301-1310.
- Sugihara N, Arakawa T, Ohnishi M, Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects:of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(11-12): 1313-23.
- Tasdemir D, Kaiser M, Brun R, Yardley V, Schmidt TJ, Tosun F, Rüedi P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(4): 1352-64.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008; 9(3): 231-241.
- Teixeira DE, Benchimol M, Rodrigues JCF, Crepaldi PH e cols. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. *PLoS Pathog*. 2013; 9(10): e1003594.
- Teixeira MM, Borghesan TC, Ferreira RC, Santos MA, Takata CS, Campaner M e cols. Phylogenetic Validation of the Genera *Angomonas* and *Strigomonas* of Trypanosomatids Harboring Bacterial Endosymbionts with the Description of New Species of Trypanosomatids and of Proteobacterial Symbionts. *Protist*. 2011; 162(3): 503-24.
- Tong X, Smith KA, Pelling JC. Apigenin, a chemopreventive bioflavonoid, induces AMP-activated protein kinase activation in human keratinocytes. *Mol Carcinog*. 2012; 51(3): 268-79.
- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*. 2011; 51(2): 337-51.
- Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol*. 2004; 173(11): 6521-5.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. *Curr Pharm Des*. 2002; 8(4): 297-318.
- Verma NK & Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48(8): 3010–5.
- Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Bol. Soc. Brasil. Dermat* 1912; 1: 436-438.
- Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V e cols. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol*. 2001; 78(2-3): 193-200.
- Weston LA & Mathesius U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol*. 2013; 39(2): 283-97.
- Wong IL, Chan KF, Zhao Y, Chan TH, Chow LM. Quinacrine and a novel apigenin dimer can synergistically increase the pentamidine susceptibility of the protozoan parasite *Leishmania*. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63(6): 1179-90.