

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**Avaliação das alterações celulares induzidas pela  
naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis***

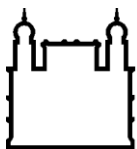
**GRAZIELLE ALVES RIBEIRO**

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**RIO DE JANEIRO**

**2011**

**i**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Grazielle Alves Ribeiro*

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES celulares INDUZIDAS PELA  
NAFTOPTEROCARPANOQUINONA LQB-118 EM *Leishmania (L.) amazonensis***

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

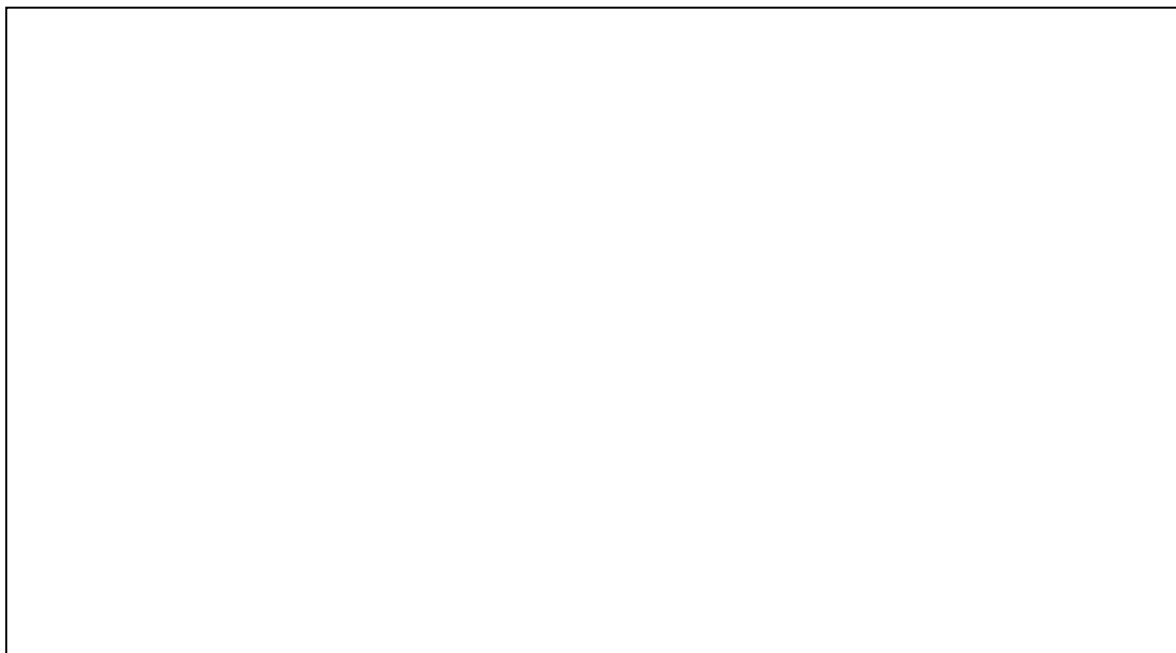
**Orientadores:** Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC-FIOCRUZ)  
Prof<sup>ª</sup> Dr.<sup>a</sup> Rossana Correa Netto de Melo (UFJF)

**RIO DE JANEIRO**

2011

ii

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT/ FIOCRUZ - RJ



# GRAZIELLE ALVES RIBEIRO

## Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis*

### Orientadores:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Rossana Correa Netto de Melo

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### EXAMINADORES:

---

Dra. Solange Lisboa de Castro  
IOC - FIOCRUZ

---

Prof<sup>ª</sup>. Elaine Coimbra  
UFJF

---

Prof<sup>ª</sup>. Bartira Rossi Bergmann  
UFRJ

### SUPLENTE:

Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral (IOC-FIOCRUZ)

Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (UFRJ)

Rio de Janeiro

2011

iv

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos e no Laboratório de Biologia Celular da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Rossana Correa Netto de Melo.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, que sempre foram meu alicerce e minha fonte de inspiração na busca de novos desafios.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força para suportar os momentos mais difíceis e fé para acreditar que eles seriam temporários.

Ao meu orientador e amigo, Eduardo Caio Torres dos Santos, pelo aprendizado e pelo direcionamento durante o desenvolvimento desta dissertação. Obrigada pelo apoio, pela atenção e pela amizade ao longo deste período.

A minha orientadora, Rossana Correa Netto de Melo, pelo aprendizado proporcionado desde a iniciação científica e pela orientação ao longo deste trabalho.

Ao Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral, pelo convívio e pela ajuda em grande parte dos experimentos dessa pesquisa. Obrigada pela disponibilidade constante em auxiliar, ensinar e sugerir idéias no desenvolvimento desse projeto.

À Dr<sup>a</sup>. Roberta Olmo Pinheiro pelo suporte dado durante a realização dos primeiros experimentos de citometria de fluxo, pela sua disponibilidade e boa vontade em ajudar sempre que foi necessário.

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini, da Universidade Federal de Minas Gerais, pela colaboração nos experimentos de microscopia eletrônica.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Amaral, da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, pela doação do kit para os experimentos de fragmentação de DNA.

Ao Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes pelas valiosas contribuições dadas durante a revisão desta dissertação.

À Plataforma de citometria de fluxo do Intituo Oswaldo Cruz, em especial ao técnico Alessandro Marins pela ajuda em grande parte dos experimentos de citometria de fluxo.

Ao amigo Edézio, pela troca de idéias e pela parceria durante a realização de vários experimentos dessa dissertação.

Ao amigo Valter, pelo apoio e ajuda ao longo desse processo.

À minha grande amiga Mariela, pela amizade e pelos momentos felizes no laboratório. Obrigada por ter tornado a vida no Rio mais alegre. Obrigada pela força e incentivo de sempre, pelas risadas, pelas conversas e pela companhia constante.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Daniela Fabrino, pela oportunidade de conhecer o Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, possibilitando meu ingresso nessa instituição, e pelo incentivo dado ao longo deste período.

A Lívia, pela amizade e pela ajuda nas análises das micrografias eletrônicas, realizadas no início deste projeto.

Aos colegas de laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, por manterem um ambiente harmonioso e divertido, onde trabalhar se torna mais prazeroso.

À Dra. Leonor Leon e à Dra. Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro, por terem me recebido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos e apoiado a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Tânia e Jesus, por todo amor e carinho. O apoio de vocês, mesmo diante de tantas preocupações, foi essencial para que eu nunca desistisse. Não tenho palavras para explicar o quanto vocês são importantes em minha vida.

Ao meu irmão, Robson, pela amizade e pelo incentivo constante, sempre me impulsionando na busca pelos meus ideais.

Ao meu namorado, Eduardo, pela paciência, compreensão e espera. Obrigada meu amor, pelo seu apoio e carinho. Obrigada por me dar força para seguir em frente.

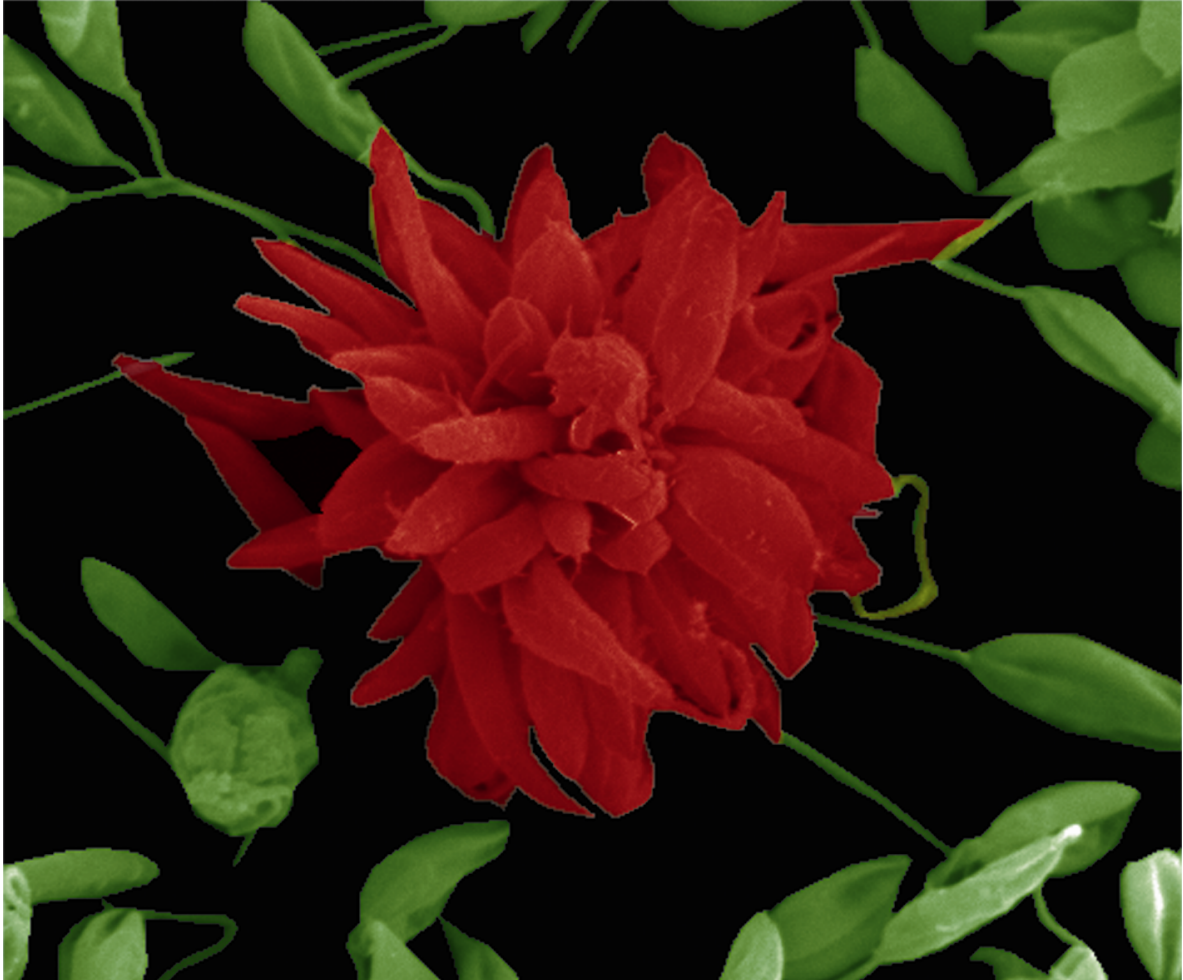
À minha tia Anadir, por ter me recebido com todo carinho em sua casa no Rio de Janeiro. Muito obrigada por tudo!

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

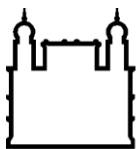


Life is pleasant.  
Death is peaceful.  
It's the transition that's troublesome".  
(Issac Asimov, 1920-1992)

## *Blooming Dahlia\**



\*A micrografia eletrônica de promastigotas de *Leishmania amazonensis*, intitulada “*Blooming Dahlia*” recebeu o prêmio IMC17 Outstanding Micrograph no 17º Congresso Internacional de Micrografia, que ocorreu no Rio de Janeiro entre os dias 19 e 24 de setembro de 2010.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

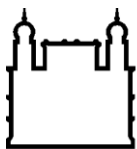
### AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS PELA NAFTOPTEROCARPANOQUINONA LQB-118 EM *Leishmania amazonensis*

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Grazielle Alves Ribeiro**

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças negligenciadas que afetam cerca de 12 milhões de indivíduos em mais de 80 países. Os medicamentos utilizados no controle da infecção estão associados à baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e crescente resistência. Na busca por agentes mais eficazes, uma série de naftopterocarpanoquinonas foram projetadas e sintetizadas, das quais a LQB-118 mostrou-se a mais ativa. Esse trabalho teve como objetivo avaliar os possíveis mecanismos de ação da LQB-118 sobre *Leishmania amazonensis*, identificando as organelas alvo e o tipo de morte desencadeado no parasito. Alterações morfológicas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados de MEV mostraram que a LQB-118 induziu retração celular e arredondamento nas promastigotas tratadas, que tornaram-se significativamente menores. Os resultados de MET mostraram que promastigotas tratadas com 2,5 $\mu$ M de LQB-118 apresentaram desestruturação no complexo de Golgi e número aumentado de vacúolos no citoplasma. Promastigotas incubadas com 10 $\mu$ M de LQB-118 apresentaram-se com citoplasma rarefeito, compactação da cromatina, mitocôndria com matriz elétron-densa e cristas dilatadas, e protuberâncias na membrana plasmática (blebs). Ensaios realizados por citometria de fluxo mostraram que o tratamento com 5 $\mu$ M de LQB-118 induziu exposição de fosfatidilserina indicativa de apoptose em 30% dos parasitos. A LQB-118 induziu a perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) em 70% dos parasitos avaliados por marcação com rodamina em citometria. Essa perda do  $\Delta\Psi_m$  foi confirmada por fluorimetria e mostrou ser concentração-dependente quando as promastigotas foram tratadas com 2,5, 5 e 10 $\mu$ M de LQB-118. O tratamento das promastigotas com 2,5, 5 e 10 $\mu$ M de LQB-118 por 48 horas induziu fragmentação no DNA de 37%, 67% e 81% das células, respectivamente, conforme avaliado pela técnica de TUNEL. Macrófagos tratados com LQB-118 não apresentaram exposição de fosfatidilserina, perda do  $\Delta\Psi_m$ , e fragmentação de DNA, mostrando que o composto age de maneira seletiva sobre os parasitos. Análises realizadas por microscopia de fluorescência indicaram que esse agente também induziu fragmentação do DNA de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sem provocar fragmentação do DNA da célula hospedeira. Dessa forma, a LQB-118 parece provocar de maneira seletiva em *L. amazonensis* muitas das alterações associadas ao processo de apoptose clássica. O colapso do potencial mitocondrial do parasita pode ser um mecanismo plausível para a atividade leishmanicida da LQB-118, a partir do qual o processo de morte celular programada seria disparado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CELULARES INDUZIDAS PELA NAFTOPTEROCARPANOQUINONA LQB-118 EM *Leishmania amazonensis*

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Grazielle Alves Ribeiro

Leishmaniasis is a complex of neglected diseases that affect approximately 12 million people in over 80 countries. The drugs used in the treatment of the infection are associated with low efficacy, high toxicity, difficult administration, high costs and increasing resistance. In the search for more effective agents, a series of naphthopterocarpanquinones were designed and synthesized, of which LQB-118 was the most active. This study aimed to evaluate the possible mechanisms of action of LQB-118 on *Leishmania amazonensis*, identifying the target organelles and the type of death triggered on the parasite. Morphological changes were evaluated by both scanning (SEM) and transmission (TEM) electron microscopy. SEM showed a clear parasite retraction and rounding, with a significant reduction in size. TEM revealed Golgi complex disruption and increased number of vacuoles in the cytoplasm of promastigotes treated with 2.5 $\mu$ M LQB118. Promastigotes incubated with 10 $\mu$ M LQB-118 had scarce cytoplasm, chromatin condensation, mitochondria with electron dense matrix and disrupted cristae, and blebs on the plasm membrane. Assays by flow cytometry showed that the treatment with 5 $\mu$ M LQB-118 induced phosphatidylserine exposure indicative of apoptosis in about 30% of parasites. The LQB-118 induced loss of  $\Delta\Psi_m$  in 70% of the parasites stained with rhodamine as evaluated using cytometry. This loss of  $\Delta\Psi_m$  was confirmed by fluorimetry and showed to be dose dependent when the promastigotes were treated with 2,5, 5 and 10  $\mu$ M LQB-118. Treatment of promastigotes with 2,5, 5 and 10 $\mu$ M LQB-118 for 48 hours induced DNA fragmentation in 37%, 67% and 81% of cells, respectively, as evaluated by TUNEL assay. Macrophages treated with LQB-118 did not present phosphatidylserine exposure, loss in the  $\Delta\Psi_m$  and DNA fragmentation, indicating that this compound acts selectively on the parasite. Analyses performed by fluorescence microscopy indicated that this compound also induced DNA fragmentation in intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, but failed to induce DNA fragmentation in the host cells. Thus, LQB-118 is able to trigger in *L. amazonensis* promastigotes several changes associated with classical apoptosis. The collapse of mitochondrial potential of the parasite may be a plausible mechanism for the leishmanicidal activity of LQB-118, triggering the process of programmed cell death.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1	LQB-118 não interfere na viabilidade de macrófagos na faixa de eficácia	41
Figura 4.2	Fotomicrografia demonstrando a seletividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares	42
Figura 4.3	LQB-118 induziu alterações morfológicas na superfície de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	44
Figura 4.4	A LQB-118 induziu redução concentração-dependente no comprimento das promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Figura 4.5	A LQB-118 induz retração celular nas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
Figura 4.6	Aspectos ultraestruturais típicos de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 4.7	Alterações ultraestruturais induzidas por 2,5 $\mu$ M de LQB-118 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	51
Figura 4.8	Mitocôndrias de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> são dramaticamente afetadas pelo tratamento com 10 $\mu$ M de LQB-118	52
Figura 4.9	LQB-118 induz condensação da cromatina nuclear de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	53
Figura 4.10	LQB-118 induz formação de blebs na membrana de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 4.11	Análise quantitativa das alterações ultraestruturais induzidas pela LQB-118 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	54
Figura 4.12	A LQB-118 não altera a integridade de membrana das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 48 horas de tratamento	56
Figura 4.13	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118 apresentam externalização de fosfatidilserina (PS) em suas membranas	57
Figura 4.14	A LQB-118 não induz externalização de fosfatidilserina (PS) em macrófagos tratados com LQB-118.	58
Figura 4.15	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118 apresentam diminuição do $\Delta\Psi_m$	60
Figura 4.16	LQB-118 induz alterações no $\Delta\Psi_m$ de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	62
Figura 4.17	Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> apresentam colapso do $\Delta\Psi_m$ após o tratamento com LQB-118	63
Figura 4.18	LQB-118 não altera o $\Delta\Psi_m$ de macrófagos tratados. Macrófagos	

	peritoneais murinos foram	64
Figura 4.19	Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118	66
Figura 4.20	Análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118	67
Figura 4.21	LQB-118 induz fragmentação seletiva do DNA de amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	69
Figura 4.22	Maior aumento das imagens DIC e DAPI/FITC da Figura 4.21.	72
Figura 5.1	Mecanismo de ação proposto para LQB-118 sobre <i>L. amazonensis</i>	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Resumo dos marcadores utilizados para analisar o fenótipo apoptótico em protozoários <i>Leishmania</i> sob diferentes estímulos	29
Tabela 4.1	Análise por citometria de fluxo do tamanho <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118	47
Tabela 4.2	Alterações morfológicas desencadeadas pela LQB-118 em promastigotas	55
Tabela 4.3	Análise $\Delta\Psi_m$ e Índice de variação (IV) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118	61
Tabela 5.1	Análise comparativa dos métodos utilizados para o estudo da apoptose	79

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
AIF	Fator indutor de apoptose
AMP	Pepitídeos antimicrobianos
Apaf-1	Fator ativador de protease apoptótica
ATP	Adenosina trifosfato
BLN	Baicaleína
$Ca^{2++}$	Cálcio
c-FLIP	Proteína inibitória FLICE
CNMC	Comitê de Nomenclatura de Morte Celular
DHPM	Diidropirimidona
DIM	3,3'-diindolilmetano
DISC	Complexo indutor e sinalizador de morte
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
Endo G	Endonuclease G
FasL	Ligante de Fas
FASS	Domínio de morte associado ao Fas
FSC	<i>Forward light scatter</i>
GDA	Análogo da glicosil dihidropiridina
GTP	Guanosina trifosfato
$H_2O_2$	Peróxido de Hidrogênio
IAPs	Proteínas inibitórias da apoptose
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IV	Índice de variação
$IP_3$	Inositol-1,4,5-trifosfato
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LM	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura



OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Iodeto de Propídeo
PS	Fosfatidilserina
PTA	Tartarato de antimônio e potássio
PTP	Poros de transição da permeabilidade mitocondrial
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Espécies reativas de oxigênio
Smac	Segundo ativador de caspase mitocondrial
SSC	<i>Side light scatter</i>
tBid	Ligado a Bid
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR	Receptor do fator de necrose tumoral
TRADD	Domínio de morte associado ao TNF
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling
μL	Microlitro
μM	Micromolar

# SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	01
Leishmanioses	01
Tratamento	09
Naftopterocarpanoquinonas antileishmaniais	13
Morte celular programada em organismos multicelulares	16
Apoptose em organismos unicelulares	23
2 - OBJETIVOS	32
3- METODOLOGIA	33
Fármacos	33
Manutenção e cultivo dos parasitos	33
Atividade anti-amastigota e ensaio de citotoxicidade	33
Microscopia eletrônica de varredura	34
Análises morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo	35
Microscopia eletrônica de transmissão	35
Análises quantitativas por microscopia eletrônica de transmissão	36
Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com LQB-118	36
Análise da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos	36
Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e macrófagos tratados com LQB-118	37
Avaliação do ciclo celular de promastigotas tratadas com LQB-118	39
Avaliação da ocorrência de fragmentação do DNA em promastigotas tratadas com LQB-118	39
Avaliação da ocorrência de fragmentação do DNA em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com LQB-118	40

4 – RESULTADOS	41
LQB-118 não interfere com a viabilidade de macrófagos nas contrações eficazes contra <i>Leishmania amazonensis</i>	41
LQB-118 é seletivamente citotóxica para amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	41
Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> apresentam alterações morfológicas características de apoptose após o tratamento com LQB-118	43
– Alterações observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	43
– O tamanho celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> é reduzido de maneira concentração-dependente após o tratamento com LQB-118	45
– Alterações observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)	48
LQB-118 não interfere com a integridade de membrana dos parasitos tratados	55
LQB-118 induz seletivamente a externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	56
LQB-118 induz perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de maneira seletiva nos parasitos	59
O tratamento com LQB-118 interfere com o ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	64
LQB-118 induz fragmentação no DNA de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	66
LQB-118 induz fragmentação no DNA de amastigotas intracelulares sem afetar a célula hospedeira	67
5 – DISCUSSÃO	73
6 – CONCLUSÃO	82
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

# 1. INTRODUÇÃO

## Leishmanioses

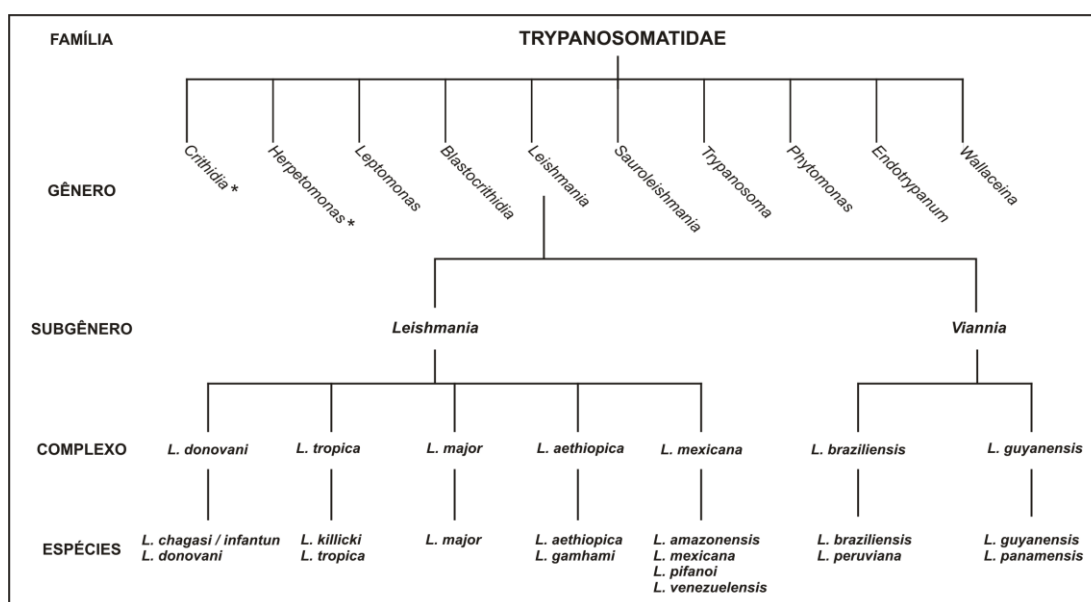
As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) estão intrinsecamente relacionadas à pobreza, sendo prevalentes nos países menos desenvolvidos do mundo, onde vivem as pessoas com menor poder aquisitivo. Os países que apresentam os mais baixos índices de desenvolvimento humano (IDH) possuem a maior incidência de DTNs e estão localizados nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, as DTNs são mais prevalentes nas regiões norte e nordeste, que apresentam os mais baixos IDHs do país. As populações mais afetadas pelas DTNs vivem em áreas rurais e nos subúrbios das grandes cidades, onde existe uma alta prevalência de situações de pobreza .

As DTNs não afetam consideravelmente os países desenvolvidos e são consideradas negligenciadas pelo fato de não existirem políticas efetivas para seu controle e por existirem poucos investimentos em projetos que visam o desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas (Beyrer e cols, 2007; Lindoso e cols, 2009). No que se refere à disponibilidade de medicamentos e ao desenvolvimento de novos fármacos para as DTNs, os investimentos são claramente insuficientes. Embora 1556 medicamentos tenham sido lançados no mercado mundial entre 1975 e 2004, apenas 21 deles são indicados para pacientes com DTNs (Lindoso e cols, 2009). As leishmanioses, doenças que apresentam ampla ocorrência nas camadas sociais mais pobres, encontram-se entre as doenças mais negligenciadas do mundo com investimentos extremamente limitados em diagnóstico, tratamento e controle (Yamey e cols, 2002; Alvar e cols, 2006).

As leishmanioses compreendem um complexo de doenças causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, protozoários transmitidos durante o repasto sanguíneo da fêmea de um inseto vetor que mede entre 2 e 3mm, denominado genericamente de flebotomíneo (ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae). Dois gêneros de flebotomíneos transmitem *Leishmania* para humanos: *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Ready, 2010; Shukla e cols, 2010). Os hospedeiros vertebrados do parasito consistem em uma grande variedade de mamíferos, como humanos, roedores, cachorros, lobos e raposas (Neuber, 2008).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos flagelados, pertencentes à ordem Kinetoplastidae e à família Trypanosomatidae. Os tripanossomatídeos caracterizam-se pela presença de minicírculos de DNA compactados em uma estrutura denominada cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria única da célula. Todos são protozoários móveis, que

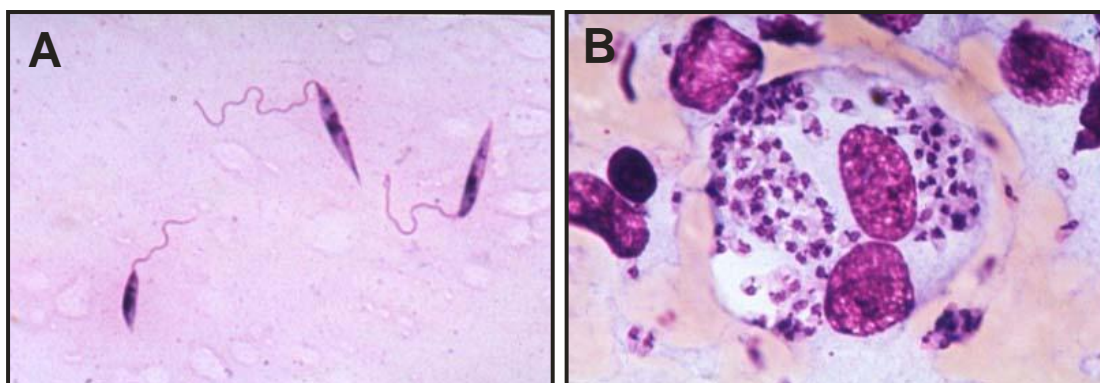
possuem corpo geralmente alongado contendo um único flagelo, que emerge na extremidade anterior da célula, em uma região denominada bolsa flagelar. Essa região corresponde a uma invaginação da membrana plasmática onde também ocorrem os processos de endocitose e exocitose. Um conjunto de microtúbulos subpeliculares regularmente espaçados localiza-se abaixo da membrana plasmática. Nesses organismos os peroxissomos são modificados para a glicólise e, portanto, chamados glicossomos (Stuart e cols, 2008). Além da leishmaniose, outras doenças humanas também são causadas por tripanossomatídeos, como a tripanossomíase africana e a doença de Chagas. O gênero *Leishmania* apresenta dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, que englobam as espécies causadoras das leishmanioses (Ilustração 1.1) (Stuart e cols, 2008).



**Ilustração 1.1 - Taxonomia da família Trypanosomatidae [adaptado de (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009)].** \* Alguns autores sugerem a criação de dois novos gêneros para melhor classificação de certos isolados (*Strigomonas* e *Angomonas*) (Brandao e cols, 2000; Podlipaev e cols, 2000; Cupolillo e cols, 2001).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas morfológicas distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota encontra-se presente no inseto vetor. Nesse estágio, os parasitos possuem formato alongado e flagelo externalizado. A forma amastigota é intracelular, encontrada principalmente nos fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado. Dados recentes têm demonstrado a presença de amastigotas em neutrófilos, identificando um mecanismo descrito como “Cavalo de Tróia”. Neste modelo, neutrófilos infectados entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos. A internalização através do reconhecimento do neutrófilo apoptótico impede o contato do parasito com os receptores dos fagócitos, induzindo a produção de imunossupressores, como TGF- $\beta$ . Dessa forma, este

mecanismo facilita a entrada dos parasitos no macrófago e inibe a ativação desta célula, resultando no estabelecimento da infecção (Van Zandbergen e cols, 2004). Adicionalmente, dados recentes demonstraram que os neutrófilos seriam as células hospedeiras iniciais de *Leishmania*, uma vez que sua depleção resulta na redução da infecção na primeira semana (Peters e cols, 2008). As amastigotas possuem formato arredondado e um flagelo curto, não visualizado por microscopia óptica (Ilustração 1.2) (Santos e cols, 2008; Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009).



**Ilustração 1.2 - Formas evolutivas de *Leishmania* spp.** Morfologia por microscopia de luz de formas promastigotas do parasito (WHO, 2009b) (a). Esfregaço de biópsia de baço, mostrando células infectadas com formas amastigotas de *L. donovani* (WHO, 2009a) (b).

A infecção do inseto ocorre durante o repasto sanguíneo, quando ele suga do hospedeiro vertebrado o sangue contendo células infectadas. No trato digestivo do vetor, ocorre a lise das células e a liberação das formas amastigotas, que se diferenciam inicialmente em promastigotas procíclicas não infectivas e se multiplicam de forma logarítmica no intestino. Quando alcançam a fase estacionária, se diferenciam em promastigotas metacíclicas infectivas, que migram para a probóscide e são transferidas para o hospedeiro vertebrado durante um novo repasto sanguíneo do inseto. No local da infecção, as formas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico presentes na derme. Nessas células, os parasitos são capazes de resistir à ação microbicida das hidrolases ácidas, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária levando as células ao rompimento. As amastigotas liberadas são rapidamente fagocitadas por novos macrófagos, estabelecendo e disseminando a infecção (Stuart e cols, 2008; Mishra e cols, 2009; Kale e cols, 2009; Singh e cols, 2009) (Ilustração 1.3).



Ilustração 1.3 - Ciclo biológico da leishmaniose (WHO).

As leishmanioses desencadeiam 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). As manifestações clínicas variam desde úlceras cutâneas localizadas à doença sistêmica fatal (El-On, 2009). No Brasil, as espécies mais importantes são *Leishmania amazonensis*, *L. guyanensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* (Ministério da Saúde, 2006).

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais prevalente da doença, causada principalmente pelas espécies de *Leishmania* dermatrópicas (Goto e cols, 2010). As espécies que normalmente provocam esse tipo de manifestação clínica são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo, e *L. mexicana*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo (El-On, 2009). As lesões usualmente são encontradas em partes expostas da superfície corporal como mãos, rosto ou pernas (Neuber, 2008; David e cols, 2009). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) tem como seu primeiro sinal um pequeno eritema inchado e avermelhado que se desenvolve após um período variável no local da inoculação. O eritema se desenvolve em uma pápula e em seguida como um nódulo que, progressivamente úlcera em um período de duas semanas a seis meses, transformando-se em uma lesão característica da LCL (Reithinger e cols, 2007). As lesões se apresentam como ulcera de superfície plana com margens aumentadas e bem delimitadas (Ilustração 1.4a-b).

As lesões da leishmaniose cutânea (LC) variam em termos de severidade (tamanho da lesão), aparência clínica (LCL típica, leishmaniose disseminada ou recidiva) e tempo para a



cura (Reithinger e cols, 2007). Neste tipo de manifestação, a cura pode ocorrer espontaneamente, deixando o local da lesão hipopigmentado e com uma cicatriz lisa e fina. De acordo com o tipo de parasito e hospedeiro, alguns casos evoluem para outras formas da doença (Goto e cols, 2010).

A forma disseminada da leishmaniose cutânea é relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos. As causadoras desta síndrome são a *Leishmania (V.) braziliensis* e a *Leishmania (L.) amazonensis*. Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem duas ou mais áreas não contíguas do corpo (Ilustração 1.4c). A carga parasitária na forma disseminada é baixa, quando comparado com a forma difusa (Goto e cols, 2010; Ministério da Saúde, 2006).

A forma recidiva caracteriza-se pela reativação da infecção por *L. tropica* ou *L. braziliensis* em torno da borda de uma lesão cicatrizada após um período variável de tempo que pode ser de meses até anos (Bailey e cols, 2007). (Ilustração 1.4d).



**Ilustração 1.4 - Leishmaniose Cutânea.** (A) Lesão cutânea localizada em estágio inicial. (B) Lesão ulcerada com margens elevadas. (C) Forma cutânea disseminada. (D) Forma cutânea recidiva (Ministério da Saúde, 2007)

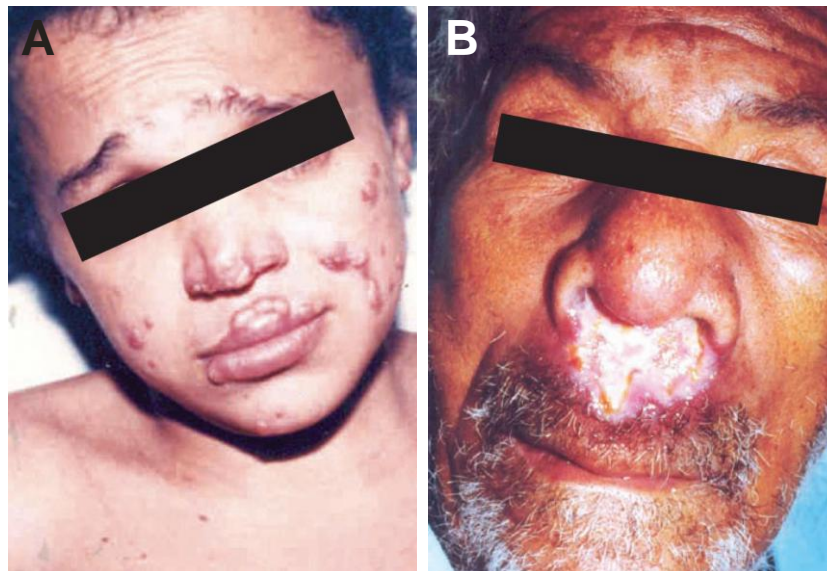
A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a



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 (Bailey e cols, 2007; Ministério da Saúde, 2007) (Ilustração 1.5a). As lesões apresentam tipicamente uma grande quantidade de parasitos e as espécies envolvidas são *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. amazonensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo, sendo que as lesões apresentam tipicamente uma grande quantidade de parasitos (Goto e cols, 2010).

No Brasil, a LCD está exclusivamente associada com *Leishmania amazonensis* (Leon e cols, 1990), principalmente nas regiões norte e nordeste. Recentemente, foi diagnosticado em Angra dos Reis o primeiro caso de LCD autóctone causado por *L. amazonensis* no estado do Rio de Janeiro (Azeredo-Coutinho e cols, 2007). Além disso, dois casos de infecção por *L. amazonensis* foram relatados em cães domésticos em Araçatuba, no estado de São Paulo, região onde a infecção humana por esta espécie de parasito ainda não foi registrada. Neste estudo, os animais infectados foram inicialmente diagnosticados como portadores de leishmaniose visceral (LV), doença endêmica nesta região (Tolezano e cols, 2007). A ocorrência de leishmaniose visceral canina desencadeada pela infecção por *L. amazonensis* também foi detectada em Paracatu, no estado de Minas Gerais (Dias e cols, 2010). Esses estudos indicam que as infecções provocadas por essa espécie de *Leishmania* têm se espalhado para regiões não consideradas endêmicas e se associado à manifestações clínicas atípicas, como a LCD e LV.

A leishmaniose mucocutânea (LM) é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faringiana, frequentemente envolvendo lesões desfigurantes. A forma clássica de LM é secundária à lesão cutânea (Ilustração 1.5b). Na maioria dos casos, a LM resulta da LC de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Goto e cols, 2010). A progressão clínica para LM depende de uma combinação entre a imunidade celular do hospedeiro e a virulência do parasito (David e cols, 2009). Esta forma ocorre devido à disseminação linfática ou hematogênica de amastigotas da pele para a mucosa nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traquéia e árvore respiratória superior (Ministério da Saúde, 2007). A LM é causada principalmente por *L. braziliensis*, mas outras espécies também podem desencadeá-la, como *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. major*. A ocorrência da LM varia de acordo com a região geográfica. No Brasil varia de 0,4% na região sul a 1,4% na região central e 2,7% no nordeste. Em outros países como a Bolívia, por exemplo, os casos de LM chegam a 20% (Goto e cols, 2010).



**Ilustração 1.5 - Leishmaniose cutâneo-difusa (a) e Leishmaniose mucocutânea (b)** (Ministério da Saúde, 2006).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é forma mais grave da doença, quase sempre fatal se não tratada. A LV é causada por *L. donovani* na Índia, Ásia e África; *L. infantum* no Mediterrâneo e por *L. chagasi* na América Latina. Após vários meses de incubação a LV se manifesta com febre intermitente, perda de peso, hepatoesplenomegalia e progressiva deterioração do hospedeiro (Maltezou, 2010). A doença pode acometer os linfonodos, baço, fígado e medula óssea. Inchaço nos linfonodos, baço e fígado são visualizados após poucas semanas (Ilustração 1.6a). Devido ao envolvimento do sistema hematopoiético na medula óssea, os pacientes são acometidos por anemia severa, leucopenia e trombocitopenia, levando a complicações, tais como maior susceptibilidade a infecções e tendência a sangramentos (Neuber, 2008).

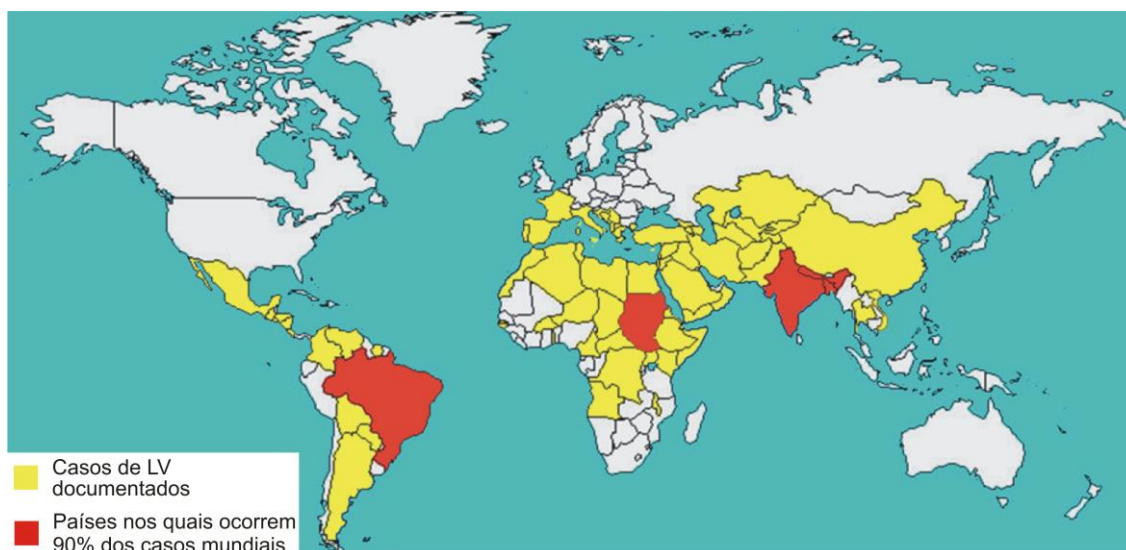
A leishmaniose dérmica pós calazar (LDPC), causada por *L. donovani*, é uma manifestação dérmica que ocorre após a cura da LV (Srivastava e cols, 2010). O intervalo de tempo para o desenvolvimento da LDPC é variável e essa manifestação ocorre somente em uma pequena porcentagem de pacientes na África e na Índia (Piscopo e cols, 2006). A LDPC manifesta-se como múltiplas máculas hipocrômicas, pápulas eritematosas e nódulos que usualmente se espalham a partir da região oral para outras áreas do corpo (Piscopo e cols, 2006) (Ilustração 1.6b).



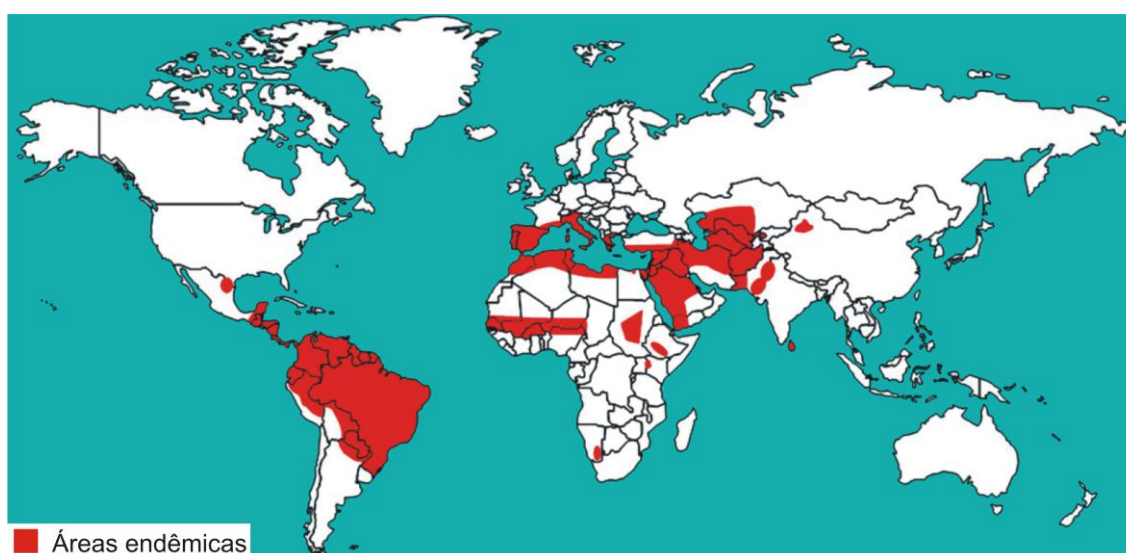
**Ilustração 1.6 - Leishmaniose Visceral (a) (Ministério da Saúde, 2006) e Leishmaniose dérmica pós calazar (b) (WHO, 2009c)**

Segundo estatísticas da Organização Mundial de Saúde, a leishmaniose é endêmica em 88 países em 4 continentes – África, Ásia, Europa e América. Dos 88 países nos quais a doença é endêmica, 72 são países em desenvolvimento (Lindoso e cols, 2009). Estima-se que 12 milhões de casos existam no mundo inteiro com 2 milhões de novos casos ocorrendo a cada ano (1,5 milhão de casos de leishmaniose cutânea e 500 mil casos de leishmaniose visceral) e que 350 milhões de pessoas se encontrem em áreas de risco de contrair a infecção (Desjeux, 2004; WHO, 2010). Dos 500.000 casos de LV documentados a cada ano aproximadamente 90% ocorrem em apenas cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Ilustração 1.7) (Faucher e cols, 2010). Em relação à LC, 90% dos casos documentados ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e Síria (Ilustração 1.8) (Reithinger e cols, 2007). 90% dos casos de LM ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru (Lindoso e cols, 2009).

As leishmanioses estão presentes em todas as regiões do Brasil, com aproximadamente 28 mil casos de LC e 3 mil casos de LV documentados a cada ano. No Brasil a LC é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, enquanto a LV é causada apenas pela *L. chagasi*. A LC é mais prevalente na região norte do país e a LV, na região nordeste (Lindoso e cols, 2009).



**Ilustração 1.7 - Distribuição Mundial da leishmaniose visceral** (Faucher e cols, 2010)



**Ilustração 1.8 - Distribuição Mundial da leishmaniose cutânea** (Bailey e cols, 2007)

## Tratamento

As opções terapêuticas utilizadas para o controle das leishmanioses estão associadas a diversos problemas, como baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade de administração, altos custos e crescente resistência. Apesar das diferenças existentes entre as várias espécies de *Leishmania* à suscetibilidade a fármacos e às várias formas de manifestação da doença, os medicamentos usualmente empregados nos tratamentos são os mesmos para as várias formas da doença (Goto e cols, 2010).

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 são disponibilizados comercialmente em duas formulações, que incluem o antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato de meglumina) (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®).

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, há indicativos de que este composto iniba enzimas glicolíticas e a oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas do parasito, reduzindo de maneira concentração-dependente, a formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Singh e cols, 2004).

Diversos efeitos colaterais estão relacionados ao uso dos antimoniais pentavalentes. Os principais efeitos adversos consistem em artralgia, mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, dor abdominal, pancreatite, prurido, febre, fraqueza, cefaléia, tontura, insônia, nervosismo, choque pirogênico e edema (Ministério da Saúde, 2007). A pancreatite, rotineiramente desencadeada pelo tratamento, é a provável causa de dor abdominal e náuseas relatadas pelos pacientes (Singh e cols, 2004). Efeitos adversos mais graves, como cardiotoxicidade e falha renal também podem ocorrer, principalmente em pacientes idosos. Além disso, o uso deste medicamento não é indicado durante a gravidez (Goto e cols, 2010).

A eficácia dos antimoniais varia de acordo com a espécie de *Leishmania* que desencadeou a infecção e manifestação clínica da doença (Goto e cols, 2010). Casos de resistência aos antimoniais pentavalentes são frequentemente relatados. Inicialmente, a dosagem de antimonial indicada era de 10mg/kg durante 6 a 10 dias, com uma taxa de cura maior que 90%. Entretanto, após a primeira falha do tratamento ocorrida na Índia em 1980, altas doses e esquemas de tratamento prolongados (20mg/kg por 30 dias) foram gradualmente introduzidos, paralelamente com o aumento das taxas de resistência a esse medicamento. Atualmente, 60% dos casos de LV diagnosticados na Índia não respondem ao tratamento com antimoniais, sendo necessária a utilização de medicamentos de segunda escolha para combater a infecção (Maltezou, 2010). No Novo Mundo a eficácia dos antimoniais para o tratamento da leishmaniose cutânea tem sido variável, sendo que falhas na resposta ao tratamento são observadas em 7% dos pacientes na Bolívia, 16% dos pacientes no Brasil e 39% dos pacientes na Colômbia. No Velho Mundo, as falhas neste tratamento são de aproximadamente 13% e os antimoniais são, portanto, considerados satisfatórios para os casos

de leishmaniose cutânea. Em casos de LM, a taxa de cura com os antimoniais varia entre 30% e 90%, de acordo com o país e dosagem administrada (Goto e cols, 2010).

A anfotericina B é um antibiótico e antifúngico poliênico também utilizado no tratamento da leishmaniose, sendo o medicamento de primeira escolha em algumas partes do mundo (Goto e cols, 2010). Seu mecanismo de ação seletivo baseia-se na sua afinidade pelo ergosterol, esterol amplamente encontrado na membrana de *Leishmania* e ausente em membranas de células de mamíferos (Singh e cols, 2004). Dessa forma, a anfotericina B forma poros na membrana dos parasitos, levando-os à morte (Goto e cols, 2010; Singh e cols, 2004; Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009). No entanto, este composto também se liga, em menores proporções, ao colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos, induzindo efeitos adversos sobre os pacientes. Esses efeitos colaterais incluem febre, náuseas, vômitos, hipotassemia e flebite no local da infusão. Efeitos menos freqüentes incluem anorexia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (Ministério da Saúde, 2007).

Novas formulações lipídicas, menos tóxicas e mais efetivas, de anfotericina B foram desenvolvidas. Essas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009). Formulações lipossomais de anfotericina B constituem o tratamento de primeira escolha em países endêmicos no sul da Europa e em outros países desenvolvidos. Entretanto, essas formulações apresentam um alto custo, dificultando sua utilização em países pobres, nos quais a escolha do tratamento depende mais do custo do que da eficácia ou toxicidade (Maltezou, 2010).

A pentamidina é uma poliamina utilizada no tratamento de pacientes com LV resistentes aos antimoniais (Piscopo e cols, 2006) e no tratamento da LC e LM em algumas regiões do Novo Mundo (Goto e cols, 2010), podendo ser utilizada também como o medicamento de primeira escolha (David e cols, 2009). A pentamidina desencadeia a morte do parasito por interferir na síntese do seu DNA, induzindo modificações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial (Goto e cols, 2010; David e cols, 2009). A pentamidina é comercializada em duas formulações: Isotionato (Di-β-hidroxietano sulfonato) e Mesilato (Di-β-hidroximetil-sulfonato) (Ministério da Saúde, 2007). Entretanto, o uso deste medicamento tem sido limitado pela sua substancial toxicidade (Piscopo e cols, 2006). As principais reações adversas incluem dor no local da injeção, gosto metálico, dores de cabeça, hipotensão, síncope e hipoglicemia (Goto e cols, 2010; Ministério da Saúde, 2007; David e cols, 2009). Casos de resistência à pentamidina também tem sido relatados (Bray e cols, 2003).



Dessa forma, quando o paciente apresenta resistência ao tratamento, ou quando os efeitos adversos desencadeados pelos medicamentos de primeira escolha tornam-se severos, medicamentos leishmanicidas de segunda escolha devem ser indicados.

O principal avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos ocorreu com a descoberta do efeito terapêutico da hexadecilfosfocolina (miltefosina), originalmente desenvolvida como um agente antitumoral. A miltefosina é o mais recente fármaco leishmanicida disponibilizado no mercado e se caracteriza como o primeiro fármaco de administração oral utilizado no tratamento da leishmaniose. O mecanismo de ação exato da miltefosina permanece desconhecido. Esse composto se liga à membrana plasmática, é internalizado pela célula do hospedeiro e induz alterações significativas em seu metabolismo. Alguns estudos têm demonstrado que a miltefosina induz a morte celular por apoptose em *L. donovani*, provocando diversas alterações no parasito (Paris e cols, 2004). A miltefosina também tem efeitos imunológicos e inflamatórios sobre os macrófagos. Esse fármaco induz um aumento na quantidade de receptores de IFN- $\gamma$ , elevando conseqüentemente a resposta de macrófagos infectados para o controle da infecção (Maltezou, 2010).

Esse medicamento está associado a altas taxas de eficácia para o tratamento da leishmaniose visceral, inclusive em casos de pacientes resistentes aos tradicionais antimoniais (Maltezou, 2010). Diversos estudos também demonstraram a eficácia da miltefosina no tratamento da LC do Velho Mundo e Novo Mundo e no tratamento da LM. Entretanto, de acordo com a espécie de *Leishmania*, com a região na qual o tratamento foi realizado (Blum e cols, 2009) e com a dose administrada (Goto e cols, 2010), podem ser observadas variações em sua eficácia.

Os problemas relacionados à ampla utilização da miltefosina incluem seu potencial teratogênico e a ocorrência de resistência. A resistência à miltefosina pode aparecer facilmente durante o tratamento devido a mutações pontuais, que levam a diminuição no acúmulo do composto no interior da célula (Maltezou, 2010). Além disso, a miltefosina desencadeia efeitos colaterais adversos durante o tratamento, como náuseas, vômitos, enjôos, dores de cabeça e diarreia. Ressalta-se ainda, o alto custo deste composto como um fator que limita sua utilização (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009).

A paramomicina é um aminoglicosídeo com atividade antileishmanial, que inibe a síntese proteica e altera a fluidez e permeabilidade de membrana. Estudos *in vitro* indicam que a paramomicina induz a perda do potencial de membrana mitocondrial em *L. donovani*, sugerindo que a mitocôndria seja a organela alvo deste composto. A paramomicina tem sido utilizada por aplicação oral e parenteral no tratamento da LC no Novo e Velho Mundo. Quando associada com cloreto de metilbenzetônio, o uso tópico da paramomicina foi eficaz

no tratamento da leishmaniose cutânea do Velho Mundo. Quando aplicada de maneira parenteral, a paramomicina também se mostrou efetiva no tratamento da leishmaniose cutânea localizada do Novo Mundo (Goto e cols, 2010). A combinação de paramomicina e estibogluconato tem sido também utilizada para o tratamento da doença cutâneo difusa (Singh e cols, 2004). Atualmente a paramomicina encontra-se sob ensaios clínicos de fase IV para leishmaniose visceral (Maltezou, 2010). Entretanto, sua utilização tem sido limitada pelos seus efeitos colaterais, como toxicidade renal e ao oitavo nervo craniano (Singh e cols, 2004).

Diversos outros fármacos têm sido utilizados como medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses. Os azóis, inicialmente desenvolvidos para o tratamento de infecções fúngicas tem sido usados para o tratamento da LC. Alguns estudos demonstraram eficácia do fluconazol, cetoconazol e itraconazol no tratamento da leishmaniose, com uma taxa de cura que variou entre 55% e 79% no Velho Mundo. O alupurinol, um composto utilizado em associação com os antimoniais, também apresenta resultados bastante divergentes. A dapsona tem sido efetiva no tratamento da leishmaniose no Velho mundo e a rifampicina utilizada sozinha ou em associação com outros compostos apresenta eficácia variada (Goto e cols, 2010).

Não existem vacinas contra a leishmaniose e a quimioterapia permanece como a única opção para o controle da infecção, apesar de nenhum fármaco atualmente utilizado ter se demonstrado como uma estratégia de fato efetiva (Cavalli e cols, 2009). Dessa forma, torna-se indispensável a busca por novos fármacos leishmanicidas e a identificação de novos alvos para o desenvolvimento de agentes mais eficazes contra *Leishmania*.

### **Naftopterocarpanoquinonas antileishmaniais**

As quinonas representam um grupo de moléculas biologicamente importantes, com atividade em vários sistemas. Algumas estão envolvidas em diversos processos bioquímicos, como as ubiquinonas e as plastoquinonas (Silva e cols, 2003). Essas moléculas também apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas, incluindo propriedades bactericidas (Kim e cols, 2010), tripanossomicidas (Menna-Barreto e cols, 2005; da Silva e cols, 2010), antivirais (Cheng e cols, 2010; Crosby e cols, 2010) e antitumorais (Bringmann e cols, 2008; Esteves-Souza e cols, 2008). Diversos estudos têm demonstrado a atividade leishmanicida de quinonas diterpenóidicas (Sairafianpour e cols, 2001), naftofuranoquinonas, naftotiofenequinonas (Tapia e cols, 2003), acilcloroquinonas, hidroquinonas (Valderrama e cols, 2005) e hidroxinaftoquinonas (Garnier e cols, 2007). Entretanto, o desenvolvimento



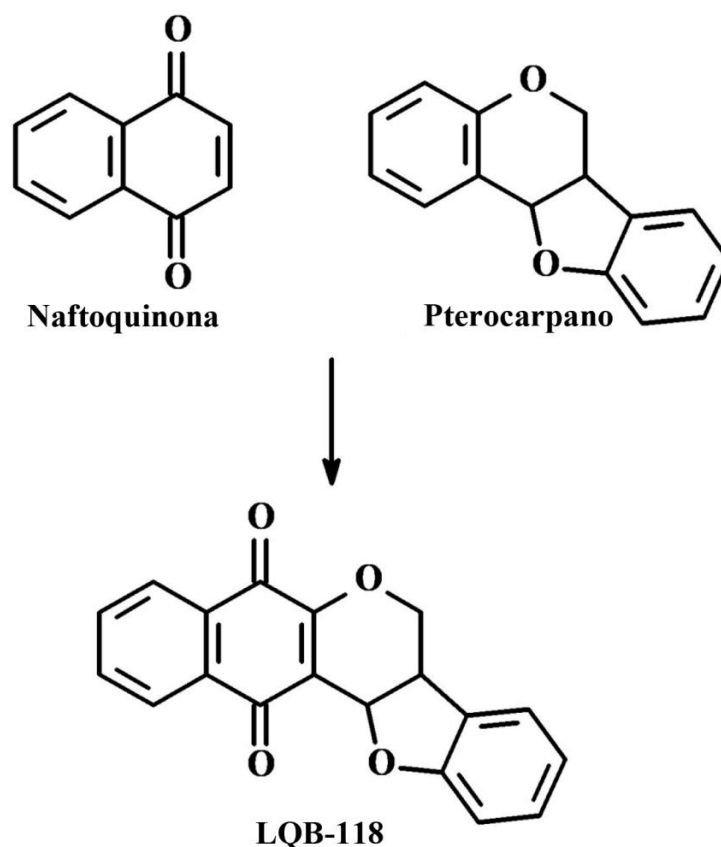
deste grupo de compostos tem sido dificultado pela sua alta toxicidade e baixa biodisponibilidade.

Na década de 1940, Fieser e colaboradores (Fieser e cols, 1948) descreveram a atividade de várias naftoquinonas na inibição do crescimento de *Plasmodium vivax*. Posteriormente, diversos estudos foram direcionados em busca de novas quinonas antiparasitárias. Além disso, esses compostos têm sido estudados como agentes antineoplásicos e várias quinonas de ocorrência natural ou seus análogos sintéticos têm sido utilizados na terapia anticâncer (Williams, 2002). A atovaquona, uma hidroxinaftoquinona inicialmente utilizada como agente antineoplásico, foi licenciada para tratar infecções provocadas por *Pneumocystis carinii* (Baggish e cols, 2002). A atovaquona também demonstrou possuir atividade *in vitro* contra *Leishmania infantum*, mas sua atividade *in vivo* em camundongos infectados não foi satisfatória (Murray e cols, 1996).

Por outro lado, os pterocarpanos são isoflavonóides cuja atividade tripanossomicida e antitumoral tem sido descrita.

Recentemente novos compostos foram projetados e sintetizados através da hibridização molecular de naftoquinonas (estruturalmente relacionadas ao lapachol) e pterocarpanos (estruturalmente relacionados aos isoflavonóides), originando as naftopterocarpanoquinonas, que apresentaram atividade antineoplásica e antiparasitária (da Silva e cols, 2002; da Silva, 2002; Netto e cols, 2010).

Na busca por novos fármacos eficazes no combate às leishmanioses, a atividade leishmanicida dessas moléculas vem sendo avaliada. Estudos em andamento no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do IOC/FIOCRUZ mostraram que a naftopterocarpanoquinona LQB-118 é um dos protótipos mais promissores, devido a sua seletividade e relativa simplicidade de obtenção por síntese química (Ilustração 1.9) (Cunha-Júnior e cols –submetido).



**Ilustração 1.9 – Estrutura do protótipo LQB-118**

A LQB-118 apresenta *in vitro* um grande potencial contra um amplo espectro de espécies de *Leishmania*, tanto do Novo Mundo (*L. amazonensis* e *L. chagasi*) quanto do Velho Mundo (*L. major*). O tratamento de promastigotas de *Leishmania* com LQB-118 resulta em uma inibição concentração-dependente do crescimento parasitário. Em promastigotas de *L. amazonensis* a LQB-118 possui um IC<sub>50</sub> de 1,73μM (Cunha-Júnior e cols – submetido).

A LQB-118 também apresenta atividade contra amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Esse composto induz uma significativa diferença no perfil de proliferação das amastigotas, induzindo uma redução concentração-dependente da carga parasitária nos macrófagos, com IC<sub>50</sub> de 1,45μM. Além disso, este composto também apresenta atividade *in vivo*, reduzindo o tamanho da lesão e a carga parasitária em camundongos infectados com *L. amazonensis* (Cunha-Júnior e cols – submetido).

O mecanismo de ação comumente associado às quinonas em diversos tipos celulares envolve a inibição da cadeia transportadora de elétrons e a produção de radicais livres, devido à formação de semiquinonas e radicais fenóxidos através da ação da quinona oxidoredutase. Porém, recentemente as quinonas também têm sido implicadas na indução de apoptose, tanto em células tumorais (Ross e cols, 2010), como em *Leishmania spp.* (Bringmann e cols, 2008;

Mukherjee e cols, 2009). É possível que a apoptose descrita nesses trabalhos seja decorrente das alterações mitocondriais, uma vez que a mitocôndria e a indução de apoptose estão intimamente relacionadas, como discutido a seguir.

### **Morte celular programada em organismos multicelulares**

Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em três tipos principais: apoptose, autofagia e necrose.

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 da apoptose. A morfologia das células necróticas é bastante diversificada (Ziegler e cols, 2004). Ao contrário da apoptose, a necrose é caracterizada pela distorção e degradação de organelas e pela dilatação celular (Kerr e cols, 1972). Na fase mais tardia desse processo ocorre desintegração nuclear e em alguns casos também pode ocorrer condensação da cromatina. Entretanto, fragmentação nuclear não constitui uma característica comum deste tipo de morte celular. Durante este processo a membrana plasmática torna-se permeável, levando à ruptura celular. A liberação do conteúdo citoplasmático para os tecidos circundantes promove uma reação inflamatória local (Ziegler e cols, 2004). Embora tenha sido inicialmente considerada como um tipo de morte celular não programada, estudos recentes sugerem que a necrose também pode ser geneticamente regulada (Zong e cols, 2006).

A autofagia é um processo adaptativo conservado evolutivamente e controlado geneticamente. Esse processo ocorre em resposta a stresses metabólicos que resultam na degradação de componentes celulares. A autofagia envolve o encapsulamento de porções citoplasmáticas e organelas por membrana, originando estruturas conhecidas como autofagossomos. O autofagossomo se funde a um lisossomo formando um autofagolisossomo cujo conteúdo é degradado por hidrolases lisossomais (Grivicich e cols, 2007).

A apoptose é um programa de morte celular cuidadosamente regulado, responsável por muitos processos biológicos, tais como renovação celular, desenvolvimento e funcionamento adequado do sistema imune, atrofia hormônio-dependente e desenvolvimento embrionário e cerebral. Assim como a mitose, é um processo celular altamente regulado que decorre de sinais estritamente conservados em indivíduos saudáveis. A apoptose é um mecanismo de equilíbrio da renovação celular na proliferação e regeneração de tecidos, tais como o revestimento intestinal e a pele. A apoptose não é apenas um mecanismo de controle do número celular e tamanho tecidual, sendo o principal método de remoção seletiva de

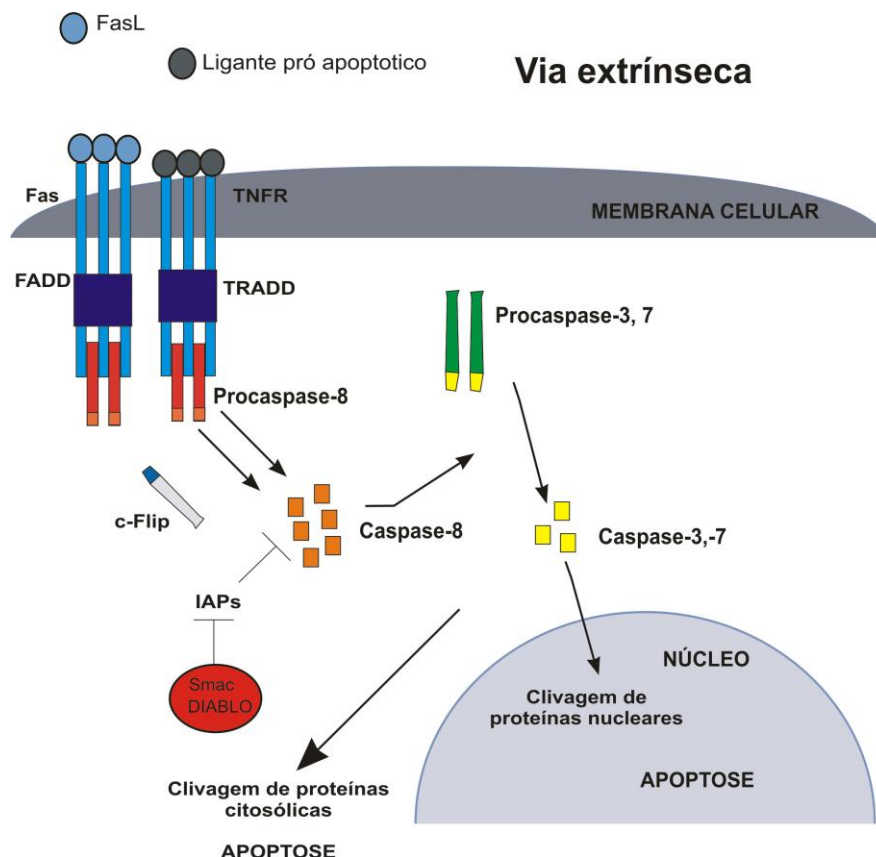
células em um organismo, dirigindo a remoção de células em processos tão diversos quanto o desenvolvimento cerebral e a resposta imune. Esse processo é responsável também pela remoção de células infectadas ou danificadas do organismo. Variações do mecanismo clássico de apoptose são encontradas em uma 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).

A morte celular por apoptose ocorre tanto em condições normais quanto nos tecidos patologicamente alterados. Esse processo foi reconhecido como um tipo característico de morte celular há mais de 100 anos (Ziegler e cols, 2004), embora o termo “apoptose” só tenha sido empregado em 1972 por Kerr, Wyllie e Currie (Kerr e cols, 1972).

Uma vez que o processo apoptótico é altamente regulado, as alterações nessas vias de regulação levam a diversas formas de doença. Em alguns casos, o estresse celular pode induzir apoptose indesejada nas células, como no caso de muitas formas de doença cardíaca. A inibição de caspases tem resultado na inibição da apoptose, e poderia ser usada por exemplo durante um infarto cardíaco, para prevenir danos ao miocárdio. Por outro lado, a quebra da maquinaria apoptótica pode levar ao desencadeamento do câncer. Dessa forma, o disparo seletivo do mecanismo apoptótico tem sido tema de estudo entre muitos pesquisadores. Como a apoptose exerce um importante papel tanto no funcionamento de um organismo saudável, quanto no desencadeamento de doenças, a elucidação dos mecanismos moleculares relacionados a esse processo pode proporcionar uma melhor compreensão das doenças, levando a avanços no tratamento e diagnóstico (Martinez e cols, 2010).

O processo apoptótico pode ocorrer através de duas vias principais: a via extrínseca ou dos receptores de morte e a via intrínseca ou mitocondrial. A via de sinalização extrínseca que inicia a apoptose envolve interações mediadas por receptores transmembrana. Esses envolvem receptores de morte que são membros da família de receptores TNF (fator de necrose tumoral). Os membros da família de receptores TNF compartilham domínios extracelulares ricos em cisteína e possuem um domínio citoplasmático de aproximadamente 80 aminoácidos chamado “domínio de morte”. Este domínio de morte exerce um papel fundamental na transmissão dos sinais de morte da superfície da célula para o caminho de sinalização intracelular. Os principais ligantes e seus correspondentes receptores de morte incluem: FasL/FasR, TNF- $\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5. A sequência de eventos que definem o caminho extrínseco da apoptose é melhor caracterizada nos modelos FasL/FasR e TNF- $\alpha$ /TNFR1. A ligação FasL/FasR e a ligação TNF- $\alpha$ /TNFR1 resulta no recrutamento das proteínas citoplasmáticas adaptadoras FADD e TRADD, respectivamente,

formando um complexo indutor e sinalizador de morte (DISC). Esse complexo é responsável pela ativação auto-catalítica da pro-caspase 8 inativa. A caspase 8 é uma caspase iniciadora responsável pela ativação das caspases efetoras 3 e 7 (Elmore, 2007; Martinez e cols, 2010) (Ilustração 1.10).



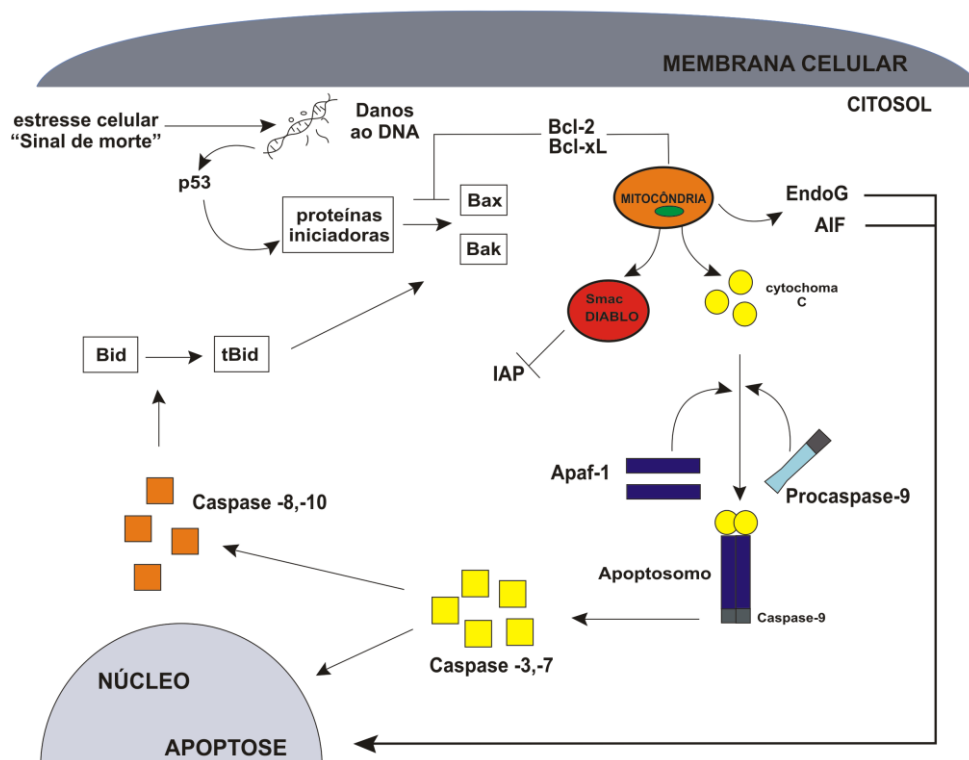
**Ilustração 1.10 – Via extrínseca.** A porção intracelular dos receptores de morte (DR) é conhecida como domínio de morte (DD). O complexo formado a partir da ligação do receptor aos ligantes pro-apoptóticos forma um complexo indutor e sinalizador de morte (DISC), que recruta a pro-caspase 8 iniciadora e libera caspase 8 ativa no citosol. Essa molécula ativa as caspases efetoras 3 e 7, resultando na clivagem de proteínas nucleares e no desencadeamento da apoptose. FasL=Ligante de Fas; TNFR=Receptor do fator de necrose tumoral; FASS=Domínio de morte associado ao Fas; TRADD=Domínio de morte associado ao TNF; C-FLIP= Proteína inibitória FLICE; IAPs=Proteínas inibidoras da apoptose. [Figura adaptada de (Martinez e cols, 2010)].

A via de sinalização intrínseca que inicia a apoptose envolve estímulos não mediados por receptores que provocam alterações na membrana mitocondrial interna, com consequente abertura de poros de transição da permeabilidade mitocondrial (PTP). O PTP é um canal transmembrana que permite a entrada de solutos (íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ ) e água na organela, levando à dilatação da matriz mitocondrial, ruptura da membrana externa e subsequente liberação de proteínas pró-apoptóticas mitocondriais. A abertura completa e irreversível do

PTP torna a mitocôndria permeável a várias moléculas, levando a perda do potencial de membrana mitocondrial e da função respiratória.

As proteínas liberadas do espaço intermembranoso para o citosol constituem dois grupos principais. O primeiro grupo engloba o citocromo c, Smac/DIABLO e outras serino-proteases HtrA2/Omi. Essas proteínas ativam a via mitocondrial dependente de caspases. O citocromo c se liga e ativa a proteína adaptadora Apaf-1 e a pró-caspase 9, formando um apoptossomo, que leva à ativação da caspase 9, que por sua vez ativa as caspases efetoras 3 e 7. As proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi promovem a apoptose inibindo as IAPs (proteínas inibidoras da apoptose). O segundo grupo de proteínas pró-apoptóticas liberadas da mitocôndria inclui o fator indutor de apoptose (AIF) e a endonuclease G, que estimulam a apoptose de maneira independente de caspases, provocando a fragmentação do DNA. O controle e a regulação dos eventos apoptóticos mitocondriais ocorre através dos membros da família de proteínas Bcl-2. As proteínas Bcl-2 regulam a permeabilidade de membrana mitocondrial e podem ser tanto pró-apoptóticas (Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik, and Blk.) quanto anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG) (Szabadkai e cols, 2004; Elmore, 2007; Martinez e cols, 2010 ; Ly e cols, 2003) (Ilustração 1.11).

### Via mitocondrial



**Ilustração 1.11 - Via mitocondrial ou intrínseca.** A ativação desta via pode ocorrer através de proteínas iniciadoras que são induzidas por p53, em decorrência de danos ao DNA celular, ou através da ativação de Bax e

Bak a partir da conversão de Bid em tBid pelas caspases 8 e 10. Na membrana mitocondrial a ativação provoca a liberação de vários fatores mitocondriais, tais como citocromo c, que se combina a Apaf-1 e a procaspase 9 formando um apoptossomo. A procaspase 9 é então convertida em sua forma ativa, caspase 9, que por sua vez ativa as caspases 3 e 7 que desencadeiam o processo apoptótico. Além disso, EndoG e AIF, moléculas que estimulam a apoptose de maneira independente de caspases, também são liberadas. IAP=Inibidor de apoptose; Apaf-1=Fator de ativação de apoptose; Bcl-2 e Bcl-xL=Bloqueadores da ativação de Bax e Bak; Smac=Segundo ativador de caspase mitocondrial; tBid=ligado a Bid; Endo G=Endonuclease G; AIF=Fator indutor de apoptose; Bax=Proteína x associada a Bcl-2; Bak=Proteína k associada a Bcl-2. [Figura adaptada de (Martinez e cols, 2010)]

Os eventos centrais desencadeadores do processo apoptótico estão relacionados à liberação de citocromo c pela mitocôndria e também à liberação de cálcio pelo retículo endoplasmático (RE) (Szabadkai e cols, 2004). O RE é uma organela subcelular envolvida na síntese de proteínas e lipídeos. Ao contrário do citosol, o RE mantém um rico ambiente oxidativo e altos níveis de  $Ca^{2++}$  em seu interior (Hussain e cols, 2007). Os íons  $Ca^{2++}$  são responsáveis pela regulação de vários processos fisiológicos e exercem um papel importante no processo de morte celular. Alterações na homeostasia celular deste íon desencadeiam diversas desordens no sistema cardiovascular, imunológico e nervoso. Embora o mecanismo exato seja desconhecido, a apoptose induzida pelo estresse do retículo endoplasmático é mediada pela mitocôndria (via intrínseca) ou através da ativação da cascata de cinases pro-apoptóticas, que são ativadas a partir dos receptores de morte da via extrínseca (Hussain e cols, 2007).

Alguns estudos têm identificado o cálcio como um mensageiro que coordena as interações entre o RE e a mitocôndria durante a morte celular (Szabadkai e cols, 2004). A translocação do cálcio do RE para a mitocôndria é um processo chave na ativação da apoptose. Alguns trabalhos demonstraram que após determinado estímulo apoptótico que promova a liberação de cálcio do RE, ocorre um prolongado aumento na concentração desse íon e observa-se várias alterações na morfologia da mitocôndria, como dilatação da organela e ruptura de suas cristas (Szabadkai e cols, 2004). Entretanto, o mecanismo de captação do cálcio liberado do RE pela mitocôndria ainda permanece sob investigação. Alguns trabalhos têm demonstrado uma estreita conexão entre essas organelas, sugerindo que a proximidade entre elas seja um fator determinante para a translocação deste íon (Szabadkai e cols, 2004). Estudos têm sugerido a participação de proteínas da membrana mitocondrial externa, que aumentariam a captação deste íon pela mitocôndria e sensibilizariam a célula ao estímulo apoptótico (Szabadkai e cols, 2004). Tem sido sugerido que proteínas da família BCL2

regulariam a liberação do cálcio do RE e a comunicação do sinal de estresse para a mitocôndria (Hussain e cols, 2007).

Alguns trabalhos demonstraram o papel do cálcio e do citocromo C como mensageiros inter-organelares da apoptose (Boehning e cols, 2003). Quando as células são expostas a algum estímulo apoptótico esse determinado estímulo induz a formação de PTP na membrana da mitocôndria adjacente. Essa mitocôndria libera então uma pequena quantidade de citocromo c, que se difunde para o RE adjacente e se liga a receptores inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) presentes em sua membrana, promovendo a condutância de cálcio através do retículo endoplasmático. A liberação de cálcio do retículo endoplasmático resulta em um aumento global na concentração de cálcio livre no citoplasma. Esses íons são então captados pelas mitocôndrias celulares e promovem a liberação de todo o citocromo c de todas as mitocôndrias. No citoplasma o citocromo c induz a formação do apoptossomo, no qual as caspases são ativadas (Mattson e cols, 2003).

As vias apoptóticas, intrínseca e extrínseca, diferem no modo pelo qual são iniciadas, mas ambas convergem para a ativação de caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7), responsáveis pela proteólise observada durante o processo apoptótico. As caspases iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e efetoras constituem-se como marcadores do processo apoptótico (Taylor e cols, 2008; Martinez e cols, 2010). De uma maneira geral, várias horas são necessárias do início do processo de morte celular até a fragmentação celular final, sendo que o cronograma correto depende do tipo celular, do estímulo e da via apoptótica desencadeada (Ziegler e cols, 2004).

As caspases ativadas clivam muitos dos principais constituintes do citoesqueleto celular. Esses substratos incluem componentes dos microfilamentos de actina, proteínas microtubulares e proteínas dos filamentos intermediários. A proteólise destes constituintes do citoesqueleto provavelmente contribui para o arredondamento e retração celular observados durante os estágios iniciais da apoptose. Devido à retração celular, as células apresentam-se menores, com o citoplasma mais denso e organelas mais agrupadas (Elmore, 2007). Outra consequência da clivagem do citoesqueleto é a formação de projeções (blebs) de membrana (característica distintiva de apoptose), resultantes do fluxo do citosol para outras áreas do córtex celular nas quais o citoesqueleto foi clivado. Em contrapartida, a formação dessas projeções membranosas requer pelo menos alguns filamentos de actina intactos no interior da célula (Taylor e cols, 2008).

A ocorrência de fragmentação do DNA tem sido extensivamente utilizada como um marcador da morte por apoptose (Hengartner, 2000; Taylor e cols, 2008). Este modelo de fragmentação resulta da clivagem da cromatina entre os nucleossomos, e é tipicamente acompanhado pela condensação da cromatina (Taylor e cols, 2008; Wyllie, 2010). Os



fragmentos gerados pela clivagem internucleossomal têm comprimentos correspondentes a números inteiros múltiplos de aproximadamente 180 pares de bases (Wyllie, 2010).

O objetivo da fragmentação do DNA durante a apoptose ainda não foi claramente compreendido, mas este evento não parece ser essencial para a ocorrência da morte celular. Esse processo certamente exclui qualquer possibilidade de divisão celular, mas seu verdadeiro propósito pode ser tornar a cromatina mais vulnerável para posterior eliminação por células fagocíticas. Em *Caenorhabditis elegans*, por exemplo, a degradação do DNA não ocorre no interior da célula apoptótica em si, mas ocorre no macrófago que a fagocita. A fragmentação do DNA pode também ser importante para impedir uma ativação indesejada do sistema imune. A degradação do DNA pode prevenir o acúmulo de DNA que, se liberado para o espaço extracelular, poderia disparar respostas auto-imunes (Taylor e cols, 2008).

A cromatina eucariótica é composta de proteínas histonas envolvidas por DNA que formam os nucleossomos. Trabalhos recentes têm sugerido que a fosforilação da histona 2B está intimamente relacionada à condensação da cromatina durante a apoptose (Taylor e cols, 2008). Durante a fase de condensação da cromatina, o material nuclear torna-se caracteristicamente elétron-denso quando visualizado por microscopia eletrônica de transmissão e se agrega perifericamente sob a membrana nuclear (Elmore, 2007; Grivicich e cols, 2007).

Outros eventos característicos da apoptose incluem a fragmentação de organelas celulares, tais como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (RE) e o consequente empacotamento dessas organelas nos corpos apoptóticos. Nos estágios finais do programa apoptótico, o RE é extensivamente remodelado e redistribuído para os corpos apoptóticos, formando uma membrana ao redor da cromatina (Taylor e cols, 2008).

A mitocôndria também se torna fragmentada durante a apoptose. A fragmentação mitocondrial resulta na permeabilização da membrana externa da organela e na liberação de proteínas do espaço intermembranas. Essa organela também pode apresentar-se dilatada, com alterações morfológicas acentuadas, como discutido anteriormente. Além disso a apoptose também é caracterizada pela perda do potencial de membrana mitocondrial, declínio do nível de ATP celular e pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

O evento final do processo apoptótico consiste no englobamento das células apoptóticas por fagócitos, sendo talvez o aspecto mais importante de todo esse processo. Isso permite que as células sejam eliminadas com sua membrana plasmática íntegra, sem a liberação dos constituintes celulares potencialmente prejudiciais para o meio circundante. O colapso das células apoptóticas em numerosos corpos apoptóticos, resultantes da formação dos blebs de membrana (Taylor e cols, 2008), facilita a ocorrência da fagocitose. Esses corpos

apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos e removidos sem induzir um processo inflamatório (Elmore, 2007; Grivicich e cols, 2007).

Os mecanismos de sinalização celular envolvidos no reconhecimento das células apoptóticas por fagócitos ainda não foi completamente esclarecido. O ligante fagocítico melhor caracterizado é o fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS). Em células saudáveis a fosfatidilserina encontra-se do lado interno da membrana plasmática. No entanto, sob estímulos pró-apoptóticos esse fosfolípido é translocado para o lado externo da membrana, onde induz o processo de fagocitose. Essa translocação é dependente de caspases, mas o modo pelo qual essa externalização é promovida ainda não foi esclarecido (Taylor e cols, 2008).

Em síntese, a apoptose é caracterizada por uma série de alterações na estrutura celular, que contribuem não apenas para o processo de morte em si, mas também para que a célula seja removida por fagócitos, prevenindo uma resposta imunológica indesejada. As células apoptóticas são caracterizadas por alterações morfológicas tais como retração celular, condensação da cromatina nuclear em massas bem delimitadas nas proximidades do envoltório nuclear, projeções da membrana plasmática e empacotamento de conteúdo celular em corpos apoptóticos. Outras características envolvidas no processo apoptótico envolvem: externalização de fosfatidilserina, estresse oxidativo, perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), liberação de proteínas mitocondriais (citocromo c, endonuclease G, fatores indutores de apoptose) e atividade de proteases (caspases).

### **1.5. Apoptose em organismos unicelulares**

O termo “apoptose” foi proposto com base em uma série de estudos realizados com tecidos de metazoários. A elucidação dos aspectos básicos da maquinaria molecular da apoptose, e de seu controle genético, também foram feitos a partir de estudos em animais multicelulares, principalmente *C. elegans* e *Drosophila*. Uma avaliação temporal do conhecimento sobre a morte celular apoptótica explica porque o conceito de apoptose foi inicialmente reservado a multicelularidade, não sendo aplicado à organismos unicelulares. Desde a primeira descrição da morte celular fisiológica realizada em 1842 por Vogt [citado em (Clarke e cols, 1996)], até as primeiras descrições de apoptose em eucariotos unicelulares realizada em 1994 (Cornillon e cols, 1994), todos os estudos sobre morte celular consideravam apenas os metazoários. A descrição inicial da apoptose, baseada em tecidos de mamíferos, ajudou a promover a perspectiva centrada de que este mecanismo seria exclusivo de animais multicelulares, com importantes funções fisiológicas, como na embriogênese,

homeostasia dos tecidos e eliminação de células danificadas. Após décadas da introdução do termo “apoptose”, esse mecanismo passou a ser reconhecido também em eucariontes unicelulares, sendo atualmente tema bastante discutido (Silva, 2010).

Durante muito tempo, questões relacionadas aos tipos e mecanismos de morte celular em protozoários parasitos foram surpreendentemente negligenciadas. De maneira geral, acreditava-se que a morte de organismos unicelulares ocorria de maneira descoordenada e os processos envolvidos nas decisões de vida ou morte após o tratamento de parasitos com quimioterápicos ou após a indução de imunidade antiparasitária foram, por conseguinte, amplamente ignorados. Isso ocorreu devido à suposição de que caminhos de morte celular geneticamente controlados em organismos unicelulares não seriam favoráveis durante a evolução. Entretanto, com a detecção de marcadores de morte celular característicos da morte apoptótica de metazoários em diversos organismos unicelulares, esse processo de morte tornou-se um tema de intensa pesquisa (Luder e cols, 2010).

A ocorrência de morte celular programada com características apoptóticas já foi descrita em vários organismos unicelulares, tais como *Saccharomyces cerevisiae*, *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*, *Trypanosoma cruzi*, *T. brucei* e *Trichomonas foetus* (Deponte, 2008).

O primeiro estudo a descrever processo de morte celular com características apoptóticas em protozoários foi publicado há 15 anos, sem uma aceitação ampla por parte da comunidade científica (Jimenez-Ruiz e cols, 2010). Apesar das controvérsias iniciais, atualmente tem sido amplamente aceito que os parasitos protozoários são capazes de apresentar muitas características apoptóticas durante o processo de morte celular (Jimenez-Ruiz e cols, 2010). Embora as primeiras descrições do fenótipo apoptótico tenham sido realizadas em *T. cruzi* e *T. brucei*, parasitos *Leishmania* tem sido atualmente utilizados como organismos modelo para o estudo deste processo e para a definição dos possíveis marcadores dessa morte celular. Esses estudos têm sido realizados com os parasitos em diferentes estágios do ciclo de vida e uma ampla variedade de indutores de morte celular tem sido testada. Os protocolos típicos para identificar os marcadores de apoptose em mamíferos têm sido bastante utilizados para caracterizar a morte celular em protozoários (Jimenez-Ruiz e cols, 2010).

Estudos recentes sugerem que a apoptose é um processo importante para o ciclo de vida dos tripanossomatídeos, contribuindo para o estabelecimento da infecção e para a progressão da doença (Wanderley e cols, 2009). Os clones de parasitos relativamente mais fracos são eliminados para que apenas os indivíduos mais aptos sobrevivam para reproduzir e

montar novos ataques com sucesso nas células hospedeiras de modo a manter a propagação (Raina e cols, 2006). Esse processo pode representar um mecanismo altruísta para a seleção de células da população parasitária que sejam mais aptas para serem transmitidas para o próximo hospedeiro (Shaha, 2006). No intestino do inseto vetor, as formas promastigotas mais aptas a passar para a faringe do inseto e disseminar a infecção são selecionadas através da eliminação das formas não-infectivas por apoptose. Como as populações de tripanosomatídeos são clonais, é esperado que exista um mecanismo altruístico que opere para a manutenção da estabilidade gênica dentro de uma determinada população (Barcinski e cols, 2003).

Alternativamente, a morte por apoptose pode ajudar no controle da população de parasitos no hospedeiro, aumentando sua sobrevivência e favorecendo a transmissão parasitária. A apoptose funciona como um mecanismo regulatório do número absoluto de parasitos durante o processo de divisão celular das promastigotas no trato digestivo do inseto vetor, impedindo que uma multiplicação excessiva comprometa a vida do flebotomíneo. Nos macrófagos do hospedeiro vertebrado a apoptose pode atuar no controle da divisão celular, regulando o número de amastigotas na célula hospedeira e minimizando a resposta imune (Shaha, 2006). Isso garante a sobrevivência da célula hospedeira e conseqüentemente a sobrevivência dos próprios parasitos (Raina e cols, 2006). Dessa forma, a apoptose em parasitos tripanossomatídeos pode ser importante para a sobrevivência e propagação dessas espécies. Além disso, esse mecanismo também pode ser explorado como um novo alvo para o desenvolvimento de medicamentos e intervenção terapêutica (Shaha, 2006).

Alguns autores associam o processo de apoptose à relação parasito-hospedeiro. Esses autores acreditam que a morte por apoptose parece estar relacionada à capacidade de adaptação desenvolvida por *Leishmania* ao longo de sua evolução, de mimetizar uma morte apoptótica por meio de eventos biológicos e bioquímicos iguais ou semelhantes encontrados em células de metazoários e assim, evadir-se do sistema de defesa do hospedeiro vertebrado (Wanderley e cols). De acordo com esses estudos, a exposição de PS nas formas amastigotas constitui um fenótipo apoptótico que não necessariamente induz a morte celular, sendo um mecanismo chamado “mimetismo apoptótico” (Wanderley e cols, ; Wanderley e cols, 2005). A exposição de PS participa da internalização das amastigotas. O reconhecimento dessa molécula pelos macrófagos induz a secreção de TGF- $\beta$  e a síntese de IL-10, inibindo a produção de NO e desmobilizando os mecanismos microbicidas da célula hospedeira (Shaha, 2006). Trabalhos têm demonstrado que em *L. amazonensis* tanto a morte apoptótica quanto o mimetismo apoptótico co-existem e ocorrem em diferentes formas do parasito: no caso de promastigotas, uma subpopulação expõe PS e morre por apoptose, enquanto que em

amastigotas toda a população expõe PS e não necessariamente sofre o processo de morte celular (Wanderley e cols, 2005; Wanderley e cols, 2010).

Diferente do que ocorre nas formas amastigotas do parasito, as formas promastigotas que expõe fosfatidilserina não são viáveis e infectivas e sofrem de fato o processo de morte celular, tanto *in vitro* quanto *in vivo* no trato digestivo do inseto vetor. A infecção de macrófagos *in vitro* ou o desencadeamento de lesões *in vivo* ocorre apenas quando parasitos PS<sup>POS</sup> e PS<sup>NEG</sup> são simultaneamente adicionados à cultura celular ou inoculados no hospedeiro mamífero. Dessa forma, parasitos apoptóticos contribuem para o estabelecimento da infecção no hospedeiro. As promastigotas PS<sup>NEG</sup> são viáveis e constituem-se como as formas infectivas, enquanto a subpopulação de promastigotas PS<sup>POS</sup> atuam inibindo a resposta inflamatória dos macrófagos (Wanderley e cols, 2009).

A morte celular programada exerce um papel importante na regulação da interação entre organismos unicelulares e multicelulares, permitindo o estabelecimento e a manutenção de interações estáveis entre parasito e hospedeiro. Dessa forma, a apoptose é extremamente relevante no contexto da resposta imune do hospedeiro e no sucesso do estabelecimento da infecção (Shaha, 2006). A sobrevivência desses parasitos no interior dos macrófagos é uma questão importante na patogênese da doença no hospedeiro mamífero. A compreensão dos processos de morte celular em macrófagos pode oferecer novas possibilidades para o controle das doenças parasitárias. O estudo de efetores e reguladores da apoptose nesses parasitos e na célula hospedeira pode contribuir para a identificação das vias específicas que levam à morte celular, de forma que possam ser exploradas para o controle parasitário (Shaha, 2006).

Os mecanismos pelos quais o processo apoptótico é desencadeado e executado são bem delimitados em metazoários. Entretanto, as vias operatórias deste processo em organismos unicelulares ainda não foram detalhadamente descritas e têm sido elucidadas através do estudo de vários modelos celulares utilizando-se diferentes agentes apoptóticos (Shaha, 2006).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (Nomenclature Committee on Cell Death - NCCD), criado em 2005 pela Revista “Cell Death and Differentiation”, o termo apoptose descreve um aspecto morfológico específico de morte celular. As alterações morfológicas que ocorrem durante esse processo incluem arredondamento e redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, projeções na membrana plasmática e, de acordo com o contexto, fagocitose por fagócitos residentes. Poucas alterações ultraestruturais nas organelas citoplasmáticas são observadas durante a apoptose. Por outro lado, a necrose é morfológicamente caracterizada pelo aumento do volume celular, dilatação de organelas e ruptura da membrana plasmática

com subsequente perda do conteúdo celular. A permeabilização da membrana plasmática é o principal marcador bioquímico da morte celular por necrose (Jimenez-Ruiz e cols, 2010).

Considerando essas orientações, diversas alterações podem ser utilizadas para definir se a morte celular ocorre através de apoptose ou necrose. Do ponto de vista morfológico, a retração celular pode ser considerada um processo de morte celular por apoptose. Em relação aos marcadores bioquímicos, a detecção da fragmentação do DNA, atividade de caspases e manutenção da integridade de membrana podem ser utilizados para identificar as células apoptóticas. A alteração do potencial de membrana mitocondrial sem o rompimento da membrana plasmática e a abertura de poros na membrana mitocondrial também se constituem marcadores de células apoptóticas que não estão presentes em células necróticas. Com exceção da formação de projeções membranosas e corpos apoptóticos, os demais eventos têm sido observados na maioria dos protozoários parasitos sob morte celular (Jimenez-Ruiz e cols, 2010).

A mitocôndria é a organela na qual se encontram os sítios da cadeia respiratória e onde ocorre a produção de adenosina trifosfato (ATP) para a manutenção da viabilidade celular. A manutenção de um potencial de membrana mitocondrial adequado é essencial para a sobrevivência da célula e este parâmetro tem sido intensamente estudado durante o processo apoptótico, uma vez que diversas investigações tem demonstrado um grande impacto funcional das alterações mitocondriais na apoptose (Shaha, 2006).

Pelo fato dos cinetoplastídeos apresentarem uma única mitocôndria, eles são um modelo interessante para a investigação das alterações mitocondriais desencadeadas durante a apoptose. A mitocôndria única dos parasitos *Leishmania spp.* exerce um papel central na apoptose celular, disparada pela queda ou aumento do potencial de membrana mitocondrial (Shaha, 2006).

Estudos demonstraram que promastigotas de *L. donovani* tratadas com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) apresentaram muitas das características apoptóticas observadas em metazoários, como condensação nuclear, fragmentação do DNA, retração celular e alterações no potencial de membrana mitocondrial. Nesse estudo, foram detectadas áreas de alto e baixo potencial de membrana mitocondrial dentro da mitocôndria única das promastigotas. A importância deste evento é óbvia para a sobrevivência desses parasitos. Nos metazoários, as células possuem múltiplas mitocôndrias que se apresentam em diferentes estágios energéticos. Dessa forma, as mitocôndrias que mantêm normais os níveis de produção de ATP proporcionam a sobrevivência das células, mesmo na presença de outras mitocôndrias danificadas. No caso de organismos unicelulares com uma única mitocôndria, a perda total do potencial de membrana mitocondrial resultaria no rompimento abrupto da maquinaria de

sobrevivência, levando a célula à necrose. Dessa forma a mitocôndria única de *L. donovani* adota um estado de geração de energia variado para sustentar a produção de ATP e manter a viabilidade celular até que o processo apoptótico se complete. A manutenção tardia de aproximadamente 20% da produção de ATP após o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indica que um nível mínimo de ATP deve ser mantido para que a célula sofra apoptose (Shaha, 2006).

Nos metazoários o poro mitocondrial está envolvido no processo de apoptose, possibilitando a liberação dos fatores mitocondriais para que se inicie o processo de morte celular. Nos organismos unicelulares, por sua vez, a participação deste poro no processo apoptótico ainda não se encontra definida (Shaha, 2006).

Diversos íons estão intimamente relacionados ao processo de apoptose, de forma que constituem importante parâmetro de estudo. Cálcio (Ca<sup>2+</sup>) parece ser um íon importante que está envolvido na apoptose de *Leishmania*. A modulação do potencial de membrana mitocondrial é importante para a homeostasia dos íons Ca<sup>2+</sup>. Durante o estresse oxidativo um aumento nos níveis de Ca<sup>2+</sup> citosólico pode ser detectado, resultando da liberação de estoques intracelulares deste íon e do influxo extracelular. A quelação de Ca<sup>2+</sup> extracelular inibe o aumento inicial de espécies reativas de oxigênio (ROS), indicando que este íon tem ação importante para a geração de ROS (Shaha, 2006).

Uma vez que os eventos de morte celular afetam diretamente a mitocôndria dos parasitos, os níveis de ATP dessas células também devem ser alterados. O nível de ATP celular pode ser medido por fluorescência utilizando-se kits comerciais. Entretanto poucos estudos têm utilizado os níveis de ATP como marcador de morte celular (Jimenez-Ruiz e cols, 2010).

As caspases e os membros da família Bcl-2 são os reguladores mais relevantes do processo apoptótico em metazoários. Existem poucas informações sobre a possibilidade de existência de homólogos das proteínas Bcl-2 em protozoários parasitas, embora algumas evidências indiretas indiquem que eles possam existir. Diversos grupos têm descrito a ativação de proteases capazes de degradar substratos clássicos de caspases durante a morte celular em *Leishmania* (Jimenez-Ruiz e cols, 2010). Diversos grupos têm prevenido o aparecimento de marcadores apoptóticos clássicos, como alterações no potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA, a partir da incubação das células com determinados inibidores de caspases (Jimenez-Ruiz e cols, 2010), evidenciando o papel das caspases na morte celular de protozoários.

Eucariotos unicelulares apresentam diversas vias de transdução de sinais apoptóticos remanescentes das células de metazoários. A maioria dessas vias são ativadas por estresse celular e desencadeiam o processo de apoptose a partir da perda do potencial de membrana

mitocondrial. Essas vias de transdução possivelmente existem em todas as espécies de eucariotos unicelulares que possuem mitocôndria (Shemarova, 2010).

Recentemente, foi descrito em metazoários uma nova via apoptótica independente de caspases, realizada com a participação de proteínas mitocondriais aptas à translocação nuclear. Em mamíferos essa via é ativada em casos de inibição das enzimas chave dos mecanismos de caspases. Alguns elementos da via independente de caspases tem sido descrito em protistas, mas seu papel no processo apoptótico ainda não foi completamente esclarecido (Shemarova, 2010).

Diversos estudos têm demonstrado a ocorrência de apoptose em *Leishmania* em resposta a diferentes compostos antileishmaniais (Tab. 1.1). A maioria desses estudos foram realizados *in vitro* (Shaha, 2006).

**Tabela 1.1 – Resumo dos marcadores utilizados para analisar o fenótipo apoptótico em protozoários *Leishmania* sob diferentes estímulos**

Parasito	Característica apoptótica	Estímulo
<i>Leishmania amazonensis</i> (promastigotas)	Exposição de PS	Metaciclo gênese (Wanderley e cols, 2009)
	Degradação de DNA	Choque térmico (Moreira e cols, 1996);
	Condensação da cromatina	Choque térmico (Moreira e cols, 1996)
<i>Leishmania amazonensis</i> (amastigotas)	Degradação de DNA	Óxido nítrico (NO) (Holzmuller e cols, 2002)
<i>Leishmania donovani</i> (promastigotas)	Exposição de PS	Miltefosina (Paris e cols, 2004); Análogo da glicosil dihidropiridina (GDA) (Kaur e cols, 2009); <i>Aloe vera</i> (Dutta e cols, 2007a); Derivado etanolamina da diospirina (Mukherjee e cols, 2009); Artemisinina (Sen e cols, 2007a); 3,3'-diindolilmetano (DIM) (Roy e cols, 2008); Diidropirimidona (DHPM) (Singh e cols, 2009); Racemosideo A (Dutta e cols, 2007a); Curcumina (Das e cols, 2008); cloridrato de peganina desidratado (Misra e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a); Berberina (Saha e cols, 2009)
	Alterações no $\Delta\Psi_m$	GDA (Kaur e cols, 2009); Witaferina A (Sen e cols, 2007b); <i>Aloe vera</i> (Dutta e cols, 2007a); Diospirina, Derivado etanolamina da diospirina (Mukherjee e cols, 2009); Artemisinina (Sen e cols, 2007a); DIM (Roy e cols, 2008); DHPM (Singh e cols, 2009); H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Das e



	cols, 2001); Racemosideo A (Dutta e cols, 2007b); cloridrato de peganina desidratado (Misra e cols, 2008); BCL (Bosedasgupta e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a; Sen e cols, 2004b); Berberina (Saha e cols, 2009)
Produção de ROS	GDA (Kaur e cols, 2009); Witaferina A (Sen e cols, 2007b); DIM (Roy e cols, 2008); Curcumina (Das e cols, 2008); BCL (Bosedasgupta e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a; Sen e cols, 2004b); Berberina (Saha e cols, 2009)
Peroxidação Lipídica	DIM (Roy e cols, 2008); Curcumina (Das e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004b)
Diminuição dos níveis de ATP	DIM (Roy e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a)
Liberação de citocromo c	Witaferina A (Sen e cols, 2007b); <i>Aloe vera</i> (Dutta e cols, 2007a); DIM (Roy e cols, 2008); Curcumina (Das e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004b)
Atividade de caspases	Miltefosina (Paris e cols, 2004); Witaferina A (Sen e cols, 2007b); DIM (Roy e cols, 2008); H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Das e cols, 2001); Curcumina (Das e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a; Sen e cols, 2004b)
Degradação de DNA	Miltefosina (Paris e cols, 2004; Verma e cols, 2004); GDA (Kaur e cols, 2009); Witaferina A (Sen e cols, 2007a); <i>Aloe vera</i> (Dutta e cols, 2007a); Diospirina, Derivado etanolamina da diospirina (Mukherjee e cols, 2009); Artemisinina (Sen e cols, 2007a); Choque térmico (Raina e cols, 2006); DHPM (Singh e cols, 2009); H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Das e cols, 2001); Racemosideo A (Dutta e cols, 2007b); Curcumina (Das e cols, 2008); Cloridrato de peganina desidratado (Misra e cols, 2008); BCL (Bosedasgupta e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a; Sen e cols, 2004b); Berberina (Saha e cols, 2009)
Retração celular	Miltefosina (Paris e cols, 2004); H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Das e cols, 2001); Racemosideo A (Dutta e cols, 2007b)
Condensação da cromatina	Choque térmico (Moreira e cols, 1996);
Blebs	Choque térmico (Raina e cols, 2006);
Corpos pró-apoptóticos	Choque térmico (Raina e cols, 2006)
Participação de íons Ca <sup>2+</sup>	Choque térmico (Raina e cols, 2006); H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Das e cols, 2001); Curcumina (Das e cols, 2008); Camptotecina (Sen e cols, 2004a)

	Alterações no $\Delta\Psi_m$	Tártaro de antimônio e potássio (PTA) (Sudhandiran e cols, 2003); Curcumina (Das e cols, 2008)
<i>Leishmania donovani</i> (Amastigotas intracelulares)	Degradação de DNA	Miltefosina (Verma e cols, 2004), PTA (Sudhandiran e cols, 2003); GDA (Kaur e cols, 2010); cloridrato de peganina desidratado (Misra e cols, 2008)
	Exposição de PS	PTA (Sudhandiran e cols, 2003)
	Participação de íons $Ca^{2+}$	PTA (Sudhandiran e cols, 2003)
	Alterações no $\Delta\Psi_m$	GDA (Kaur e cols, 2010)
<i>Leishmania infantum</i> (Promastigotas)	Exposição de PS	Choque térmico (Alzate e cols, 2006)
	Alterações no $\Delta\Psi_m$	Edelfosina (Alzate e cols, 2008); Choque térmico (Alzate e cols, 2006)
	Atividade de caspases	Edelfosina (Alzate e cols, 2008); Choque térmico (Alzate e cols, 2006)
	Degradação de DNA	Edelfosina (Alzate e cols, 2008); Choque térmico (Alzate e cols, 2006)
<i>Leishmania infantum</i> (Amastigotes axênicas)	Degradação de DNA	Sb(III) (Serenó e cols, 2001)
<i>Leishmania major</i> (Promastigotas)	Degradação de DNA	Falta de nutrientes; fase estacionária (Zangger e cols, 2002)
	Retração celular	Estaurosporina (Arnoult e cols, 2002)
	Exposição de PS	Estaurosporina (Arnoult e cols, 2002)
	Alterações no $\Delta\Psi_m$	Estaurosporina (Arnoult e cols, 2002)
	Liberação de citocromo c	Estaurosporina (Arnoult e cols, 2002)
	Degradação de DNA	Estaurosporina (Arnoult e cols, 2002)
<i>Leishmania Mexicana</i> (Amastigotes e promastigotas)	Degradação de DNA	Falta de nutrientes; fase estacionária (Zangger e cols, 2002)

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Avaliar os possíveis mecanismos de ação da LQB-118 sobre *Leishmania amazonensis*, identificando as organelas alvo e os eventos bioquímicos envolvidos na morte dos parasitos.

### Objetivos Específicos

- 1- Determinar a razão de seletividade da LQB-118 sobre *L. amazonensis* em relação à célula hospedeira;
- 2- Avaliar as alterações morfológicas ultraestruturais induzidas pela LQB-118 em promastigotas de *L. amazonensis*;
- 3- Estudar o efeito da LQB-118 sobre a integridade de membrana e o tamanho celular de promastigotas de *L. amazonensis*;
- 4- Estudar a indução pela LQB-118 dos indicadores clássicos de apoptose em *L. amazonensis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### **Fármacos**

O protótipo LQB-118 foi elaborado e sintetizado no Laboratório de Química Bioorgânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo grupo do professor Paulo Costa. Essa substância foi preparada em duas etapas, a partir de lausona e o-iodofenol, disponíveis comercialmente, como descrito previamente (Netto e cols, 2009). Pentamidina (Sideron, Laboratotios Filaxis S.A., Buenos Aires, Argentina), curcumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), camptotecina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), estaurosporina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e miltefosina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foram comercialmente adquiridos.

#### **Manutenção e cultivo dos parasitos**

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB 0016) foram mantidas a 26°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 100 g/mL de estreptomicina, e 100 U/mL de penicilina. Para manutenção dos parasitos foram feitos repiques duas vezes por semana até a décima passagem. Os parasitos foram obtidos rotineiramente de lesão de camundongos BALB/c, e mantidos *in vitro* como promastigotas até, no máximo, a décima passagem. Todos os protocolos usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (P-32/09-5).

#### **Atividade anti-mastigota e ensaio de citotoxicidade**

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos Suíços foram retirados em meio RPMI (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), plaqueados em lâminas Lab-Tek (Nunc, Roskilde, Dinamarca) e incubados a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5% por 1 hora. Posteriormente, promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária foram adicionadas na proporção 3:1 (parasito/macrófago), e as culturas incubadas por mais 3 horas. Após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com meio RPMI pré-aquecido para remover os parasitos livres. Em seguida, 400µL de diferentes concentrações de LQB-118 em meio RPMI foram adicionados em duplicata por 24, 48 e 72 horas.

As lâminas foram coradas com o sistema de corantes hematológicos *Instant Prov* (Newprov, Curitiba, Brasil) e analisadas por microscopia de luz para observação do efeito da LQB-118 sobre a carga parasitária e sobre os macrófagos.

Adicionalmente, para avaliar a toxicidade do protótipo, macrófagos peritoneais murinos ( $2 \times 10^6$  em 200  $\mu\text{L}$ ) foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços e incubados com LQB-118 (1,25–40 $\mu\text{M}$ ) em meio RPMI por 72 horas a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Após a incubação, o meio de cultura com LQB-118 foi retirado e descartado, as células foram lavadas com PBS e incubadas com solução de azul de trypan 0,4% em volume suficiente para cobrir o fundo dos poços da placa. A porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da quantificação por microscopia de luz de, no mínimo, 200 macrófagos por amostra. As células foram contadas diferencialmente, sendo que células sem coloração foram consideradas viáveis e células coradas em azul, inviáveis. A significância das proporções das médias das triplicatas foi analisada pelo teste *t* de *Student*. Foi considerado estatisticamente significativo  $p < 0,05$ .

### **Microscopia eletrônica de varredura**

A morfologia de promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com LQB-118 e as alterações sobre a superfície dos parasitos foram comparativamente avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para as análises morfológicas, foram processados parasitos incubados com 2,5 $\mu\text{M}$  e 5 $\mu\text{M}$  de LQB-118 por 72 horas. Parasitos não tratados foram processados como controle.

Após 72 horas, as células foram centrifugadas, lavadas em PBS e fixadas em paraformaldeído a 1% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3) durante 1 hora em temperatura ambiente (Karnovsky e cols, 1965). Após esse período, as células foram lavadas duas vezes e o material mantido em tampão fosfato foi acondicionado em refrigerador (4°C). Pequenos fragmentos de lamínulas, com superfície aproximada de 0,5cm x 0,5cm, foram obtidos com o auxílio de uma caneta de diamante. Os fragmentos de lamínula foram cobertos com poli-L-lisina (Sigma) e posteriormente utilizados para adesão das promastigotas fixadas. As promastigotas aderidas aos fragmentos de lamínulas foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% em tampão fosfato por 1 hora, lavadas, desidratadas em séries crescentes de etanol e submetidas à secagem em ponto crítico de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as amostras foram metalizadas com ouro e o material foi analisado no microscópio eletrônico de varredura (DSM 950, Zeiss, Oberkochen, Alemanha) no Centro de Microscopia Eletrônica

(CEMEL) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### **Análises morfométricas por microscopia eletrônica de varredura e citometria de fluxo**

Além das análises qualitativas, medidas quantitativas foram realizadas nas micrografias eletrônicas obtidas por MEV utilizando-se o programa de computador *ImageJ* (National Institutes of Health, USA). O comprimento médio do corpo celular e flagelo das promastigotas foram determinados pela análise de 123 células de amostras controle, 74 e 134 células de amostras tratadas com 2,5 e 5 $\mu$ M de LQB-118, respectivamente. A medida do tamanho das promastigotas foi baseada no comprimento total do parasito (corpo celular + flagelo) em micrômetros ( $\mu$ m). Os dados das medidas dos diferentes grupos foram comparados pelo teste ANOVA ( $p < 0,01$ ) e são apresentados como a média do tamanho  $\pm$  SEM.

O tamanho dos parasitos também foi avaliado por citometria de fluxo. Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com 2,5, 5 e 10 $\mu$ M de LQB-118 por 48 horas. As células foram centrifugadas e a concentração de parasitos foi ajustada para  $1 \times 10^6$  células/ml em PBS. A morfologia das promastigotas foi avaliada por citometria de fluxo de acordo com a dispersão (*forward light scatter* - FSC) ou refração da luz do laser pelas células (*side light scatter* - SSC). Dot-plots biparamétricos do volume (FSC) e granularidade (SSC) celular foram utilizados para avaliar os aspectos morfológicos das promastigotas. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCalibur (Becton-Dickinson, San Jose, EUA) equipado com o programa de computador *Cell Quest* (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, San Jose, EUA). Um total de 10000 eventos foram adquiridos em uma região previamente estabelecida como correspondente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os dados foram analisados usando-se o programa de computador *Summit v4.3* (Dako, Inc. CO, USA).

### **Microscopia eletrônica de transmissão**

As alterações ultraestruturais induzidas pela LQB-118 sobre os parasitos também foram analisadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foram processados promastigotas tratadas com 2,5 $\mu$ M de LQB118 por 72 horas ou com 10 $\mu$ M de LQB118 por 24 horas. Parasitos sem tratamento foram processados como controle.

Os parasitos foram fixados em paraformaldeído a 1% e glutaraldeído a 1% diluídos em tampão fosfato (0,1M, pH 7,3), *overnight* a 4°C, como descrito anteriormente (Karnovsky e cols, 1965). As células foram lavadas em tampão fosfato e os *pellets* foram incluídos em ágar

3% (Merk, Darmstad, Alemanha). Esses *pellets* foram pós-fixados em uma mistura de tampão fosfato com 1% de tetróxido de ósmio e 1,5% de ferrocianeto de potássio por uma hora, desidratados em séries crescentes de etanol e incluídos em resina (PolyBed 821, Polysciences) (Melo, 1999). Cortes ultrafinos do material foram obtidos com faca de diamante em ultramicrotomo (Sorvall MT2, Newton, MA, EUA). Os cortes foram corados com acetato de uranila e citrato de chumbo e analisados em microscopia eletrônica de transmissão (EM 10, Zeiss, Oberkochen, Alemanha), no Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

### **Análises quantitativas por microscopia eletrônica de transmissão**

Além das análises qualitativas foi realizado um estudo quantitativo nas micrografias eletrônicas obtidas por MET. Alterações morfológicas típicas de apoptose, referentes a modificações observadas na estrutura mitocondrial e nuclear, foram quantificadas nas secções de diferentes promastigotas. Foram avaliados 78 cortes de parasitos controle e tratados com LQB-118. Os resultados dessas análises foram expressos como percentual de células que apresentou determinada alteração em cada grupo avaliado.

### **Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118**

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$ ) tratadas por 48 horas com 2,5, 5 e  $10 \mu\text{M}$  de LQB-118 foram incubadas com  $30 \mu\text{g/ml}$  de iodeto de propídeo (PI) por 15 minutos e mantidas no gelo até o momento da análise (Santoro e cols, 2007). O controle positivo de lise foi obtido pelo aquecimento das promastigotas em banho maria a  $65^\circ \text{C}$  durante 10 minutos. Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCalibur equipado com o programa de computador Cell Quest. Um total de 10000 eventos foi adquirido em uma região previamente estabelecida como correspondente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os dados foram analisados usando-se o programa de computador *Summit v4.3*.

### **Análise da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *Leishmania amazonensis* e macrófagos**

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 por 24 horas e posteriormente, a exposição de fosfatidilserina (PS) nesses parasitos

foi avaliada utilizando-se o Kit de detecção de apoptose anexina-V-FITC (BD Biosciences, San Diego, EUA). Miltefosina (20 $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo do experimento. As células foram lavadas em PBS e 2 $\times$ 10<sup>6</sup> parasitos foram ressuspensos em 100 $\mu$ L de solução de anexina-V-FITC (100 $\mu$ L do tampão de cálcio, contendo 1 $\mu$ L de anexina-V-FITC). Após 20 minutos de incubação no escuro, 300 $\mu$ L do tampão de cálcio (contendo 0,5 $\mu$ L de iodeto de propídeo) foram adicionados às células.

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos foram retirados em meio RPMI, plaqueados em placas de 24 poços (Nunc) e incubados a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5% por 1 hora para possibilitar a adesão celular. Posteriormente, os poços foram lavados para remoção das células não aderidas e incubados com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) em triplicatas por 24 horas. Após a incubação, a placa foi colocada sobre uma camada de gelo e as células foram destacadas por raspagem. As células foram marcadas com o Kit de detecção de apoptose *Annexin-V-FITC* como descrito para promastigotas.

Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCalibur equipado com o programa de computador Cell Quest e analisados usando-se o programa de computador *Summit v4.3*.

#### **Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de *L. amazonensis* e macrófagos tratados com LQB-118**

O  $\Delta\Psi_m$  de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) foi avaliado por citometria de fluxo (rodamina 123), espectrofluorimetria (JC-1) e microscopia de fluorescência (*Mitocapture*). O  $\Delta\Psi_m$  de parasitos incubados com os indutores de apoptose estaurosporina (4 $\mu$ M), camptotecina (50 $\mu$ M) e curcumina (25 $\mu$ M) também foi avaliado e utilizado para comparação.

**Ensaio por citometria de fluxo** - A funcionalidade mitocondrial das promastigotas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a sonda fluorescente rodamina 123. Os parasitos foram cultivados por 24 horas na presença ou ausência de diferentes concentrações de LQB-118. As células (5 $\times$ 10<sup>6</sup>) foram incubadas com 10 $\mu$ g/mL de rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro. Os dados foram adquiridos utilizando-se o canal FL-1 (sensível a detecções na faixa de 515 a 530 nm) do citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo programa de computador *Summit v4.3*.

Alterações na intensidade de fluorescência da rodamina123 foram quantificadas a partir do Índice de Variação (IV) obtido pela equação  $(M_T - M_C)/M_C$ , na qual  $M_T$  corresponde



a mediana de fluorescência para parasitos tratados e  $M_C$  à mediana de fluorescência para parasitos controle. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (Menna-Barreto e cols, 2009).

Macrófagos peritoneais residentes de camundongos foram retirados em meio RPMI, plaqueados em placas de 24 poços (Nunc) e incubados a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> 5% por 1 hora para possibilitar a adesão celular. Posteriormente, os poços foram lavados para remoção das células não aderidas e incubados com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5 e 5µM) em triplicatas por 24 horas. Após a incubação as células foram destacadas por raspagem, com a placa colocada sobre uma camada de gelo, marcadas com rodamina 123 (10µg/mL) e analisadas por citometria de fluxo.

**Ensaio por espectrofluorimetria** - Após 24 horas de incubação com as substâncias, as células foram lavadas em PBS e 2x10<sup>6</sup> parasitos foram transferidos para tubos (*ependorf*) e ressuspensos em 1 mL de tampão Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Em seguida foram adicionados 10µL do corante JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (10µg/mL) e as células foram incubadas por 10 minutos protegidas da luz. Após a incubação, as células foram centrifugadas por 20 minutos, ressuspensas em 1 mL de HBSS e transferidas em triplicatas para placas negras de 96 poços (200µL por poço). A emissão de fluorescência foi avaliada em fluorímetro nos comprimentos de onda 480/485 e 530/590nm de excitação e emissão, respectivamente. A razão entre a fluorescência vermelha/verde (590/530) representa o potencial mitocondrial (Roy e cols, 2008). As análises estatísticas foram realizadas no programa de computador *Graph Pad Prism*. Os dados foram comparados pelo teste ANOVA (p<0,05) com pós-teste de Dunnett's.

**Ensaio por microscopia de fluorescência** - Para confirmar e ilustrar as alterações no  $\Delta\Psi_m$  de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 os parasitos foram visualizados por microscopia de fluorescência, após a marcação com o kit de detecção de apoptose *Mitocapture*<sup>TM</sup> (Biovision, Mountain View, EUA). Os sinais de fluorescência foram detectados utilizando-se o filtro dual band-pass. Parasitos foram tratados com 5µM de LQB-118 por 24 horas e processados para visualização em microscópio de fluorescência. Após a incubação com LQB-118, as células foram lavadas em PBS e a concentração foi ajustada para 2x10<sup>7</sup>/mL. As promastigotas foram cuidadosamente misturadas a uma matriz de agarose a 1,25% (Pierce, Rockford, EUA), em uma proporção de 1:3 (20 µL de células : 60µL de agarose) e espalhadas sobre lâminas (aproximadamente 20µL por lâmina). Uma câmara de perfusão (CoverWell<sup>TM</sup>, Grace Bio-Labs, Bend, EUA) foi colocada sobre as células e em

seguida PBS foi adicionado a câmara para manter a umidade (Melo e cols, 2005; Melo e cols, 2009). Todo o procedimento de lavagem e coloração das células foi realizado nesta câmara. As células foram lavadas com 400µL de PBS, incubadas no escuro por 20 minutos com 300µL do tampão do kit + 0,3µL do corante mitocapture diluído e lavadas novamente com 300µL do tampão do kit. Posteriormente a câmara foi removida e as lâminas montadas em meio aquoso. As análises foram realizadas por microscopia de fluorescência em microscópio Olympus (Provis, Olympus, Melville, EUA) em filtro dual band-pass.

### **Avaliação do ciclo celular de promastigotas tratadas com LQB-118**

Promastigotas ( $1 \times 10^6$ ) tratadas com 2,5, 5 e 10µM de LQB-118 por 24 horas foram fixadas em 1mL de etanol 70% e mantidas a -20°C durante 1 hora. As células foram centrifugadas e o pellet foi ressuspenso e incubado por 1 hora a 37° C em 500µL de RNase (200µg/mL) solubilizada em PBS. Posteriormente 20µL de PI (40µg/mL) foram adicionados e as células foram incubadas no escuro por 20 minutos em temperatura ambiente (Sen;Bandyopadhyay e cols, 2007). Os dados foram adquiridos no citômetro FACSCalibur equipado com o programa de computador *Cell Quest*. Um total de 10000 eventos foi adquirido em uma região previamente estabelecida como correspondente as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os dados foram analisados no programa de computador *Summit v4.3*.

### **Avaliação da ocorrência de fragmentação de DNA em promastigotas tratadas com LQB-118**

A ocorrência de fragmentação de DNA nas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 foi detectada pelo ensaio TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) utilizando-se um kit comercial (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System, Promega, Madison, EUA).

Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 por 24 e 48 horas. Células não tratadas com LQB-118, foram incubadas com DNase (5µg/mL, 10 minutos, temperatura ambiente) e utilizadas como controle positivo.

O procedimento utilizado para verificar a indução de fragmentação de DNA pela LQB-118 nas promastigotas foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, com pequenas modificações. As células ( $1 \times 10^7$ ) foram lavadas duas vezes em PBS e incubadas com 1mL de solução de fixação/permeabilização (eBioscience, San Diego, EUA) por 30

minutos a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas novamente, ressuspensas em PBS e transferidas para *ependorfs*. As células foram centrifugadas, ressuspensas e mantidas em 80µL do tampão de equilíbrio fornecido pelo kit por 5 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas novamente e ressuspensas em 51µL do tampão de marcação (45µL do tampão de equilíbrio, 5µL da mistura de nucleotídeos acoplados ao FITC e 1µL da enzima TdT), no qual foram mantidas por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida pelo acréscimo de 1mL de EDTA (20mM), as células foram centrifugadas e ressuspensas em 1ml de solução de BSA (5mg/ml) + 0,1% de Triton-X-100. Posteriormente as células foram ressuspensas em 500µL de uma solução de RNase (250µg/mL) em PBS. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur e analisados pelo programa de computador *Summit v4.3*.

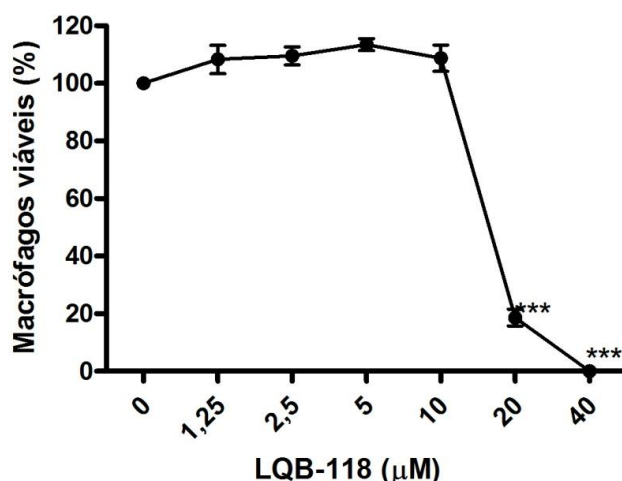
### **Avaliação da indução de fragmentação de DNA em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* pela LQB-118**

A fragmentação do DNA de amastigotas e macrófagos infectados foi avaliada em microscopia de fluorescência utilizando-se o Kit de Detecção de morte celular *in situ*, POD (Roche, Mannheim, Alemanha). Macrófagos peritoneais residentes de camundongos foram obtidos e infectados como descrito no tópico 3.3. Em seguida, 400µL de diferentes concentrações de LQB-118 (2,5, 5 e 10µM) em meio RPMI foram adicionados em duplicata por 48 horas. As células nas Lab-Teks foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, lavadas com PBS e incubadas com solução bloqueadora (3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol) por mais 10 minutos. Em seguida as células foram lavadas e permeabilizadas em solução com 0,1% de Triton X-100 e 0,1% de citrato de sódio por 2 minutos no gelo. As células foram lavadas novamente e cada poço das Lab-Teks foi marcado com 16µL da solução de TUNEL. Para garantir a uniformidade da marcação as lâminas foram cobertas com lamínulas plásticas removíveis. Controles negativos foram realizados seguindo-se o mesmo procedimento, porém sem a incorporação da enzima TdT. Controles positivos foram realizados incubando-se as células com 10µg/ml de DNase antes do processo de fixação. As lâminas foram montadas em meio Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, EUA) e analisadas em microscópio de fluorescência (Axio Observer, Zeiss, Gottingrn, Alemanha).

## 4. Resultados

### LQB-118 não interfere com a viabilidade de macrófagos nas concentrações eficazes contra *Leishmania amazonensis*

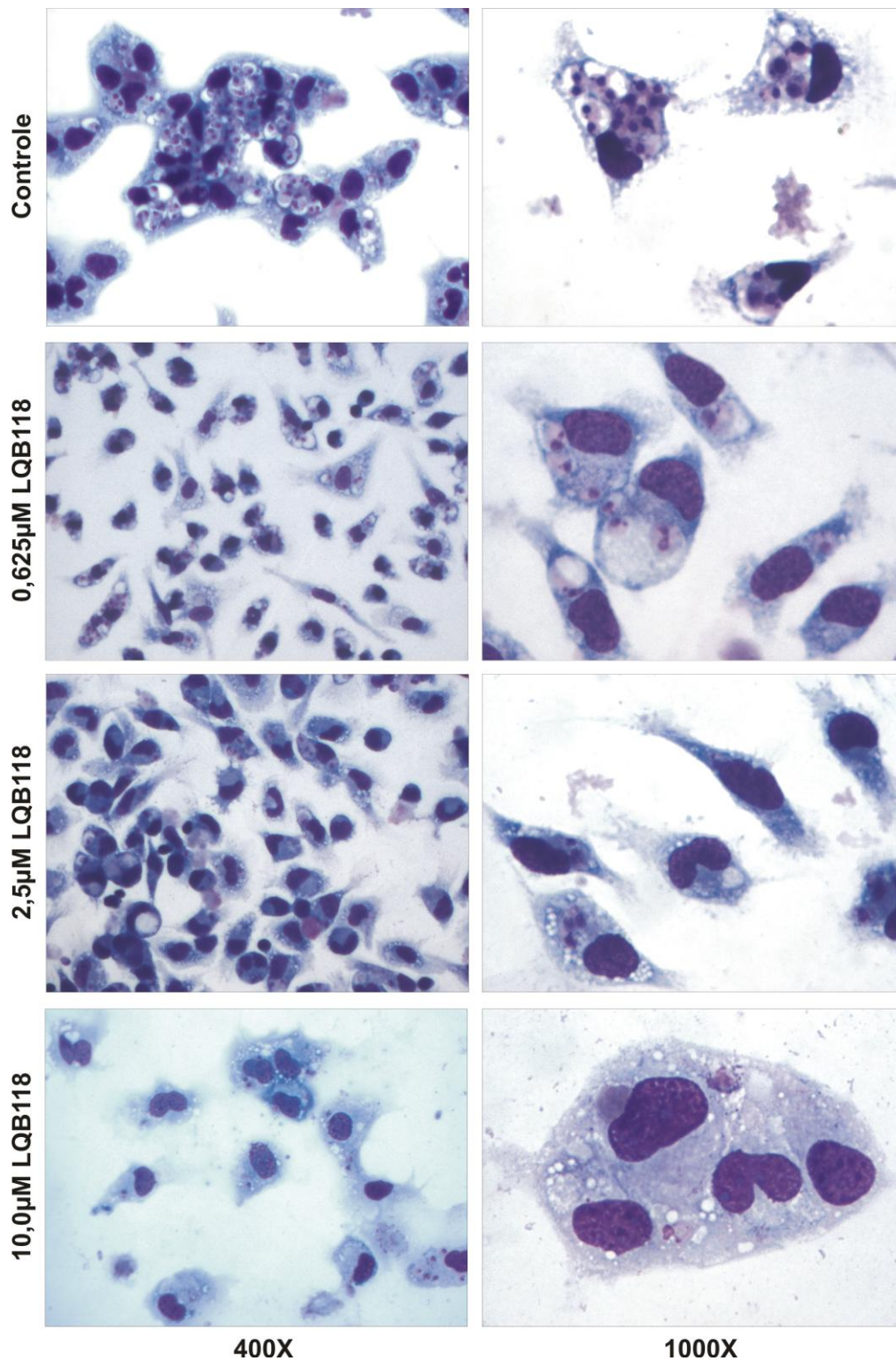
A viabilidade de macrófagos peritoneais murinos não-infectados, mas tratados com LQB-118 também foi verificada a partir do ensaio com azul de Trypan. As células foram incubadas com concentrações de até 40 $\mu$ M de LQB-118 por 72 horas. A viabilidade dos macrófagos não foi afetada por concentrações de até 10 $\mu$ M de LQB-118 (Figura 4.1). A LD<sub>50</sub> da LQB-118 sobre macrófagos foi de 18,46 $\mu$ M, concentração 12 vezes maior do que o IC<sub>50</sub> em amastigotas intracelulares.



**Figura 4.1 - LQB-118 não interfere na viabilidade de macrófagos na faixa de eficácia.** Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com várias concentrações de LQB-118 (1,25 - 20  $\mu$ M) por 72 horas. A viabilidade macrofágica foi avaliada pela contagem de pelo menos 100 células usando o corante azul de tripan. Os pontos representam a média  $\pm$  SD e o gráfico obtido no programa Graphpad Prism 5 é representativo de três experimentos. Foi utilizado One-Way ANOVA e o pós-teste de Dunnett's, \*\*\*  $P < 0,001$  em relação ao controle.

### LQB-118 é seletivamente citotóxica para amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

A citotoxicidade seletiva da LQB-118 sobre as amastigotas de *L. amazonensis* no interior dos macrófagos foi investigada. Macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com várias concentrações de LQB-118 por 24 horas, não apresentaram alterações morfológicas à microscopia de luz. Além disso, durante os ensaios anti-amastigota, não foi observado efeito tóxico aparente. Observações realizadas por microscopia óptica demonstraram que a LQB-118 nas concentrações ativas não possui efeito tóxico aparente sobre a aderência de macrófagos (Fig. 4.2).



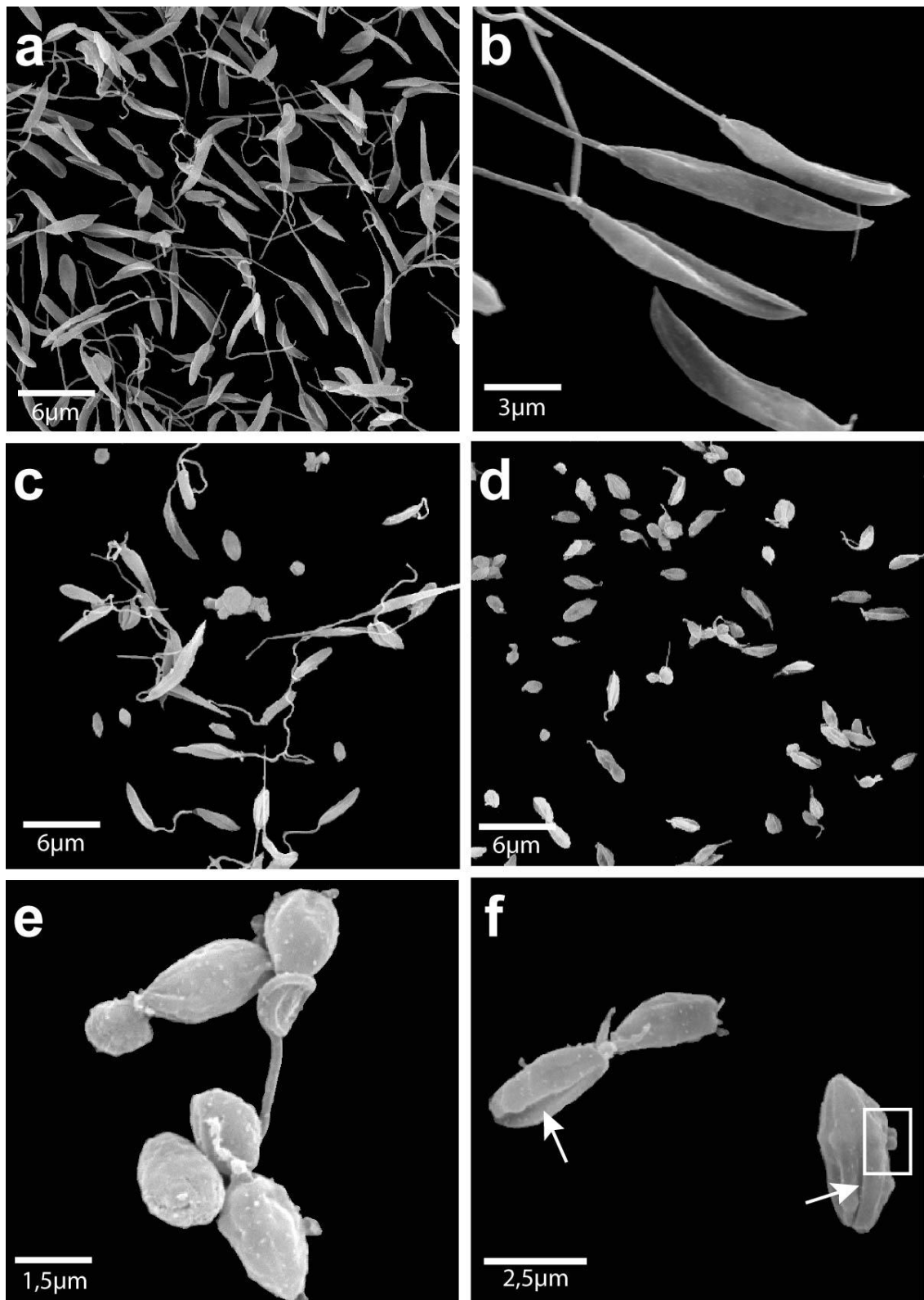
**Figura 4.2 – Fotomicrografia demonstrando a seletividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. amazonensis* e incubados com várias concentrações (0 - 10  $\mu$ M) de LQB-118. Após 24 horas, as lâminas foram coradas com Panótipo rápido e analisadas em microscópio óptico. Macrófagos infectados e tratados com LQB-118 apresentam redução no número de amastigotas intracelulares sem apresentar alterações morfológicas típicas de toxicidade, como arredondamento ou perda de adesão às lâminas.

## **Promastigotas de *L. amazonensis* apresentam alterações morfológicas características de apoptose após o tratamento com LQB-118**

### **– Alterações observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Para investigar os eventos celulares induzidos pela LQB-118 sobre a superfície promastigotas de *L. amazonensis*, os parasitos foram incubados com 2,5 e 5 $\mu$ M de LQB-118 por 72 horas e as alterações morfológicas foram analisadas por MEV.

As células tratadas com LQB-118 apresentaram-se bastante alteradas (Fig. 4.3c-f) quando comparadas às células controle (Fig. 4.3a-b). Estas se apresentaram tipicamente alongadas e com flagelos bem caracterizados. O tratamento com LQB-118 induziu alterações morfológicas concentração-dependentes nos parasitos (Fig. 4.3a,c,d). O tratamento com 2,5 $\mu$ M de LQB-118 induziu arredondamento e diminuição do comprimento do corpo celular e do flagelo de número significativo de promastigotas (Fig. 4.3c). Quando tratadas com 5 $\mu$ M do composto, as alterações morfológicas induzidas na superfície dos parasitos tornaram-se mais evidentes e a grande maioria dos parasitos apresentaram-se ainda menores e mais arredondados (Fig. 4.3d). Detalhes das células controle e tratadas com LQB-118 são mostrados nas Figuras 4.3b e 4.3e-f, respectivamente. Enquanto as células do grupo controle mostram-se filiformes e alongadas (Fig. 4.3b), as células tratadas com LQB-118 apresentaram retração citoplasmática, corpo celular arredondado e flagelos curtos (Fig. 4.3e-f) Além disso, projeções da membrana plasmática também foram observadas nos parasitos tratados (Fig. 4.3f).

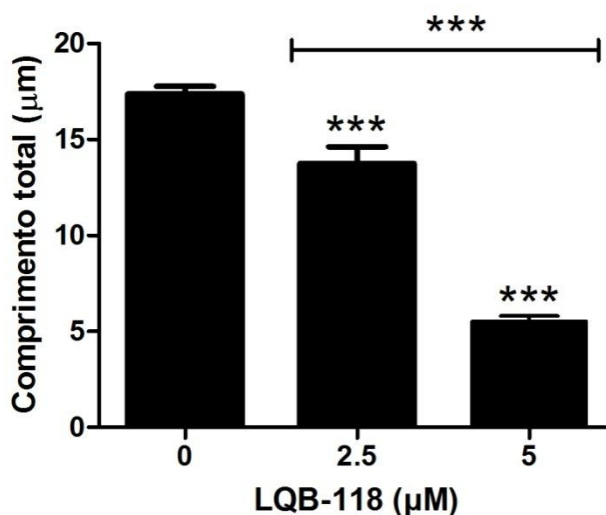


**Fig. 4.3 - LQB-118 induziu alterações morfológicas na superfície de promastigotas de *L. amazonensis*.** Promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas (a-b) ou incubadas com LQB-118 [2,5 $\mu$ M (c) ou 5 $\mu$ M (d-f)] por 72 horas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura. Imagens panorâmicas das células controle (a) e tratadas com 2,5 $\mu$ M (c) e 5 $\mu$ M (d) mostram o efeito desse protótipo sobre os parasitos. Detalhes de aspecto filiforme das células controle (b) e aspecto arredondado das promastigotas tratadas são mostrados em maior aumento. Observe o nítido encurtamento do corpo celular e flagelo (e-f). Retração celular (setas) e projeções membranosas (blebs) também foram observadas (f).



- **O tamanho celular de promastigotas de *L. amazonensis* é reduzido de maneira concentração-dependente após o tratamento com LQB-118**

Análises morfométricas foram realizadas nas micrografias eletrônicas obtidas por MEV. Para quantificar as alterações no tamanho do parasito, foram realizadas avaliações morfométricas do comprimento total (corpo celular + flagelo) das promastigotas usando o programa de computador *Image J*. As análises revelaram que a LQB-118 induziu uma redução significativa e dose dependente no tamanho dos parasitos após o tratamento com 2,5 $\mu$ M e 5,0 $\mu$ M de LQB-118 (Fig. 4.4). Enquanto o grupo controle apresentou comprimento total de 17,37  $\pm$  0,40, nos grupos tratados 2,5 $\mu$ M e 5,0 $\mu$ M, essa média foi respectivamente de 13,76  $\pm$  0,86 e 5,53  $\pm$  0,27.



**Fig. 4.4 - A LQB-118 induziu redução concentração-dependente no comprimento das promastigotas de *L. amazonensis*.** Análises quantitativas por microscopia eletrônica de varredura mostraram redução significativa no comprimento das promastigotas quando expostas a concentrações gradativas de LQB-118. O comprimento médio do corpo celular e flagelo das promastigotas foram determinados pela análise de 123 células de amostras controle, 74 e 134 células de amostras tratadas com 2,5 e 5 $\mu$ M de LQB-118, respectivamente. As análises foram realizados usando-se o programa de computador *Image J*. As barras representam a média  $\pm$  SD e o gráfico foi obtido no programa Graphpad Prism 5. Foi utilizado One-Way ANOVA e o pós-teste de Bofferoni, \*\*\* P<0,001 em relação ao controle e entre os grupos tratados.

A retração celular, característica da morte apoptótica em metazoários, pode ser analisada tanto por microscopia quanto por citometria de fluxo, com base nas mudanças nas propriedades de espalhamento das células quando o feixe do laser é direcionado sobre elas (Jimenez-Ruiz e cols, 2010). No citômetro de fluxo um feixe de laser incide sobre cada célula

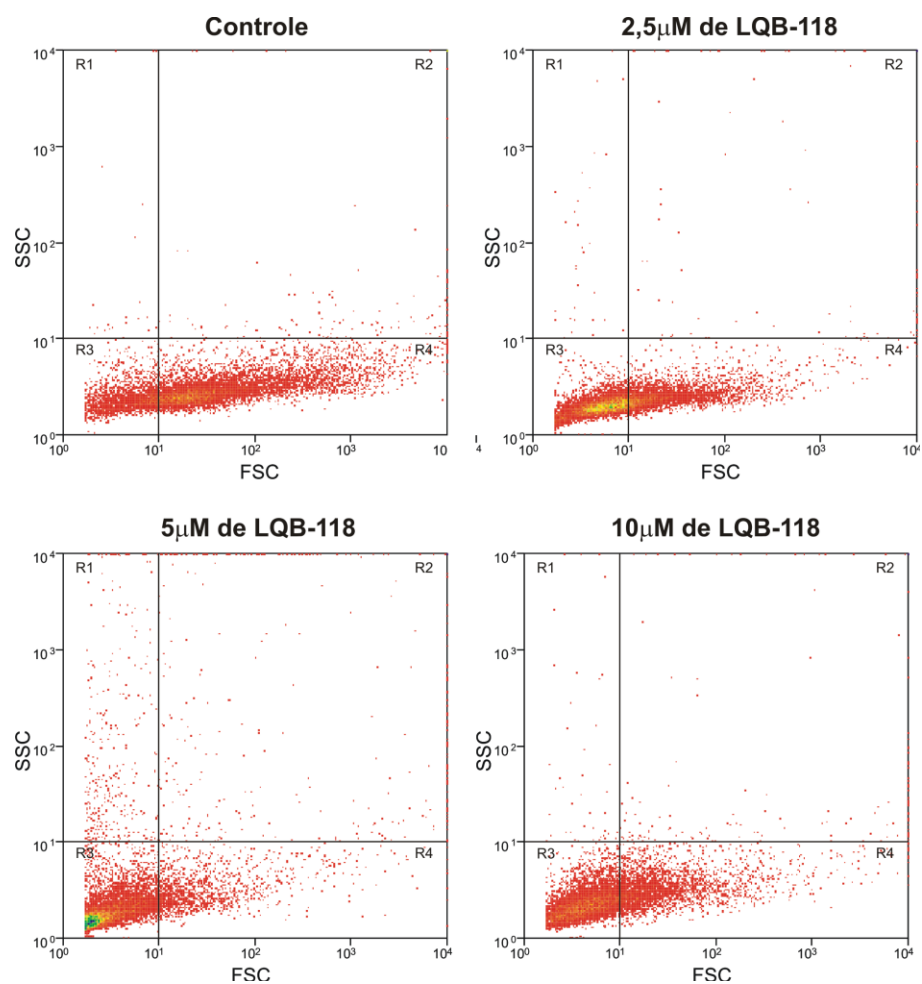


de forma individual e é desviado em várias direções conforme a morfologia celular (tamanho, estrutura interna, características topográficas e densidade óptica de cada célula).

Dots bi-parametricos mostrando FSC (volume celular) e SSC (granularidade celular) da população são utilizados para detectar alterações no volume celular e têm sido empregados para determinar a ocorrência de retração celular associada com a morte de protozoários parasitos *Leishmania* (Jimenez-Ruiz e cols, 2010).

Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) por 48 horas e tiveram seus parâmetros morfológicos avaliados por citometria de fluxo. Essas análises corroboraram os resultados obtidos por microscopia eletrônica, demonstrando que a LQB-118 induziu uma redução concentração-dependente no tamanho celular dos parasitos, observada pelo desvio da população celular para a esquerda da linha de referência nos gráficos de dispersão (*dot-plots*) (Fig. 4.5). Pequenas alterações na granularidade celular dos parasitos tratados com LQB-118 foram observadas.

A Tabela 4.1 mostra o percentual de células em cada região dos gráficos de dispersão. A porcentagem de células na região R4, correspondente às celulares menores e menos granulosas, diminui quando as promastigotas são tratadas com LQB-118. Em contrapartida, a porcentagem de células presentes na região R3 aumenta após o tratamento com LQB-118, indicando que essas células tiveram seus tamanhos reduzidos. A porcentagem de células presentes nas regiões R1 e R2, correspondentes as regiões de maior granularidade, também sofre um aumento discreto após o tratamento com LQB-118.



**Fig. 4.5 - A LQB-118 induz retração celular nas promastigotas de *L. amazonensis*.** Promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 e seus parâmetros de tamanho e granularidade foram avaliados por citometria de fluxo. Dot-plots biparamétricos de FSC (tamanho) x SSC (granularidade) mostram que o tratamento com LQB-118 induz uma redução concentração-dependente do tamanho dos parasitos. Os dot-plots foram obtidos pelo programa de computador *Summit v4.3*.

**Tabela 4.1 - Análise por citometria de fluxo do tamanho *L. amazonensis* tratadas com LQB-118**

Região de células	Controle	2,5µM de LQB-118	5µM de LQB-118	10µM de LQB-118
<b>R1</b>	0,23	0,30	3,23	0,43
<b>R2</b>	1,48	2,05	6,35	5,98
<b>R3</b>	24,43	59,54	76,37	61,49
<b>R4</b>	73,86	38,11	14,05	32,4

\*Os valores representam o percentual de células em cada região

– **Alterações observadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As alterações subcelulares induzidas pela LQB-118 sobre as promastigotas de *L. amazonensis* foram avaliadas por MET. No grupo controle, as células apresentaram-se alongadas em cortes longitudinais e com organelas com aspecto característico. As mitocôndrias apresentaram-se com as cristas bem definidas e matriz elétron-lúcida. O núcleo apresentou-se com nucléolo evidente e com heterocromatina distribuída periféricamente ao longo do envoltório nuclear. As demais organelas como complexo de Golgi e retículo endoplasmático (RE), além de estruturas como a bolsa flagelar e o flagelo com microtúbulos organizados apresentaram aspecto normal (Fig. 4.6).

O tratamento das promastigotas com a menor concentração de LQB-118, 2,5µM, induziu principalmente a desestruturação do complexo de Golgi, o qual perdeu o arranjo típico em cisternas paralelas (compare a Fig. 4.7a, com o controle, Fig. 4.6). Além disso, um aumento no número de vacúolos foi detectado no citoplasma dos parasitos tratados (Fig. 4.7b). Em uma mesma secção, foram observados diversos vacúolos com conteúdo principalmente elétron-lúcido (Fig. 4.7b). Alterações na organização dos microtúbulos subpeliculares não foram visualizadas (Fig. 4.7b, cabeças de seta).

Quando os parasitos foram incubados com 10µM de LQB-118, as alterações morfológicas se tornaram mais evidentes (Figs. 4.8, 4.9 e 4.10). Nessa concentração, o fármaco provocou retração celular, conforme observado previamente por MEV e as promastigotas, que se apresentaram filiformes no grupo controle, tornaram-se arredondadas (Fig. 4.9) e em alguns casos, com o citoplasma rarefeito (Fig. 4.8, asterisco).

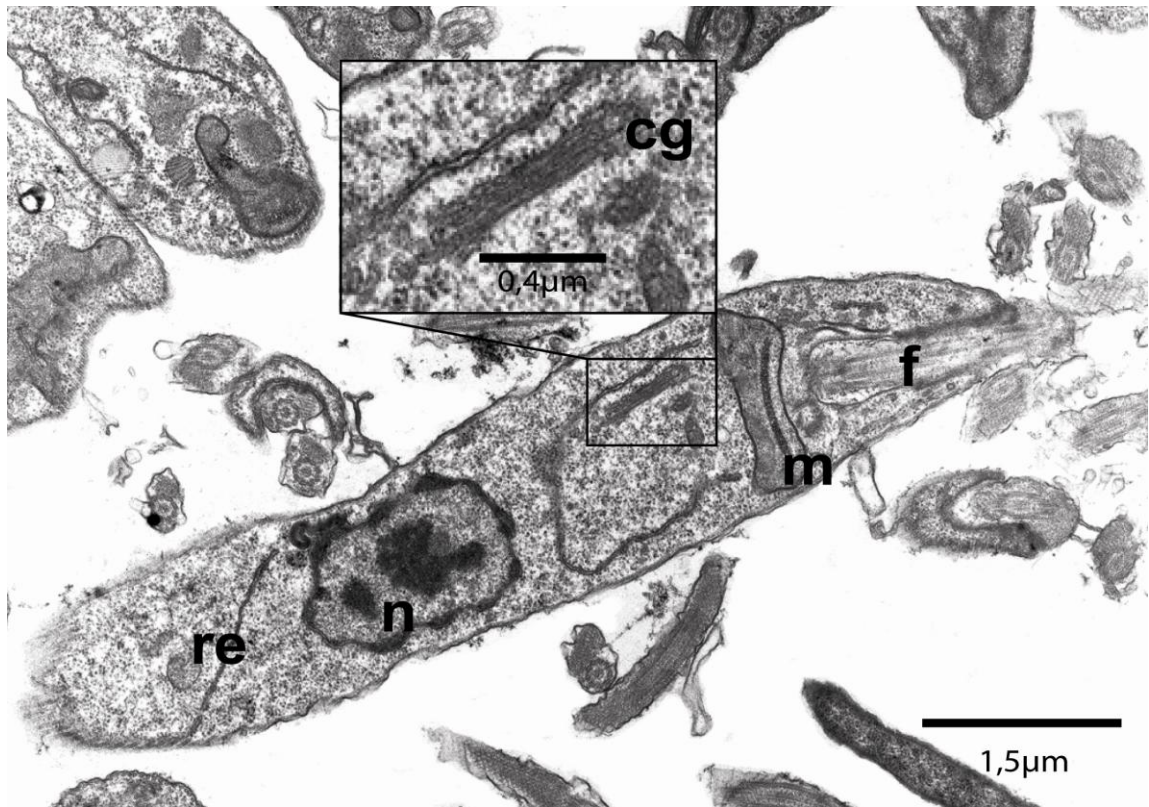
A mitocôndria do parasito tornou-se, de maneira geral muito dilatada, com matriz elétron-densa e com cristas nitidamente desestruturadas (Fig. 4.8a,b, seta branca). Essa organela mostrou-se particularmente afetada pelo tratamento com LQB-118. O retículo endoplasmático, caracteristicamente visualizado nas células controle, (Fig. 4.6), foi raramente observado, com sua estrutura típica, nos cortes ultrafinos das células tratadas com 10µM de LQB-118. Mesmo quando tratadas com concentrações elevadas de LQB-118, os parasitos não apresentaram desorganização em seus microtúbulos subpeliculares.

Em *Leishmania*, a estrutura morfológica do núcleo apoptótico é semelhante à de células de metazoários (Moreira e cols, 1996). A maioria das células tratadas com 10µM de LQB-118 apresentou características nucleares típicas de apoptose, principalmente condensação da cromatina nuclear em massas bem delimitadas nas proximidades do envoltório do núcleo (Fig. 4.9). Além disso, raramente foi observada a desintegração do núcleo. Aumento no tamanho da bolsa flagelar (Fig. 4.8a) e projeções de membrana na

superfície (blebs) dos flagelos, também foram observados (Fig. 4.10). Apesar das alterações morfológicas observadas nas micrografias eletrônicas obtidas por MET, os parasitos tratados com LQB-118 apresentaram-se com a membrana plasmática bem delimitada sem extravasamento de conteúdo celular.

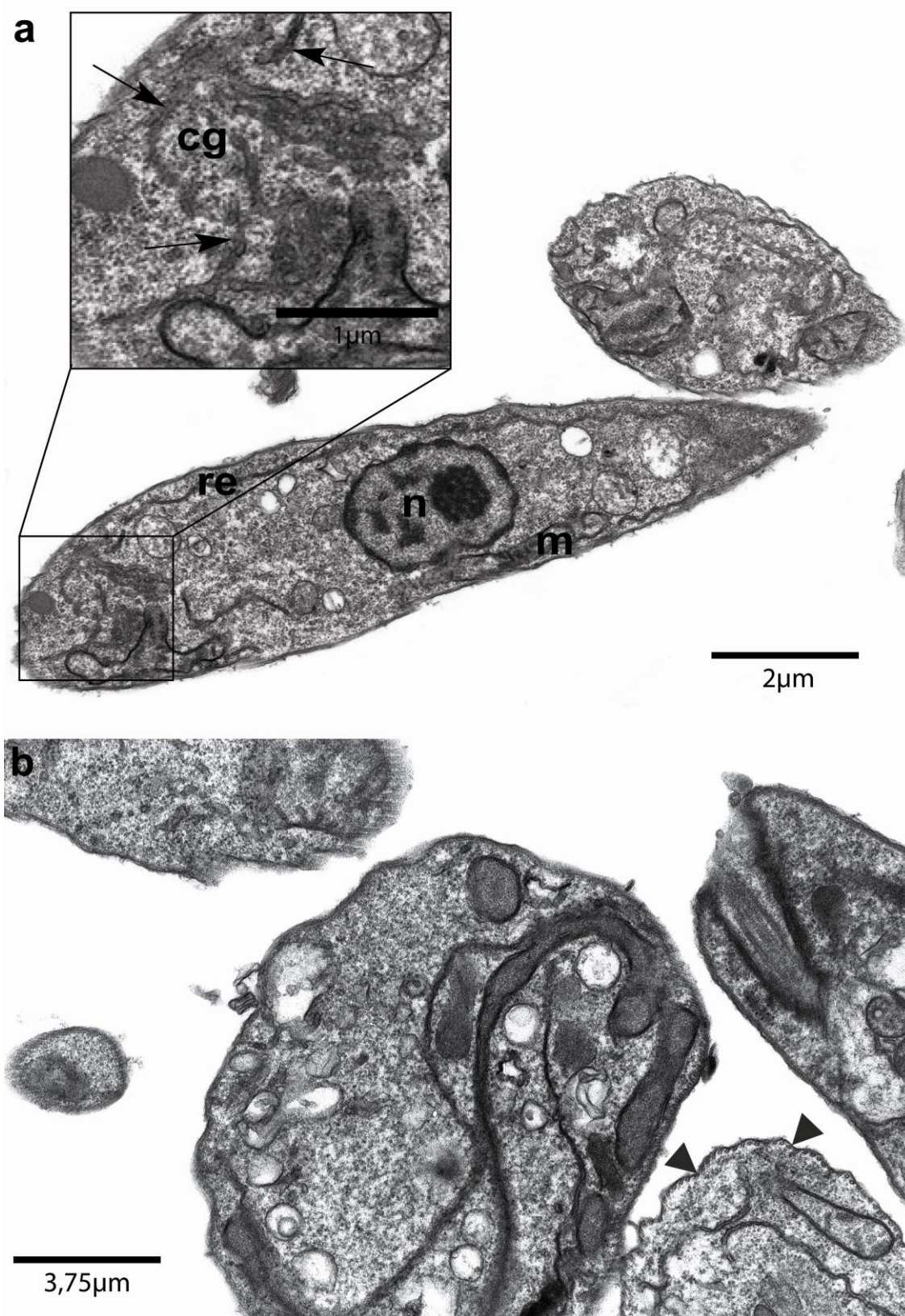
Análises quantitativas revelaram que 22,7% e 40% das células tratadas com 2,5 $\mu$ M de LQB-118 apresentaram alterações nucleares e mitocondriais, respectivamente. Quando tratadas com a maior concentração do composto, quase todas as promastigotas observadas apresentaram essas alterações (100% das células tiveram alterações nucleares e 91,4% das células apresentaram alterações mitocondriais) (Fig. 4.11).

Os resultados obtidos por MET mostram que promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 apresentaram alterações morfológicas típicas das alterações apoptóticas visualizadas em células de metazoários. A Tabela 4.2 resume as principais alterações morfológicas observadas nas promastigotas após o tratamento com LQB-118.

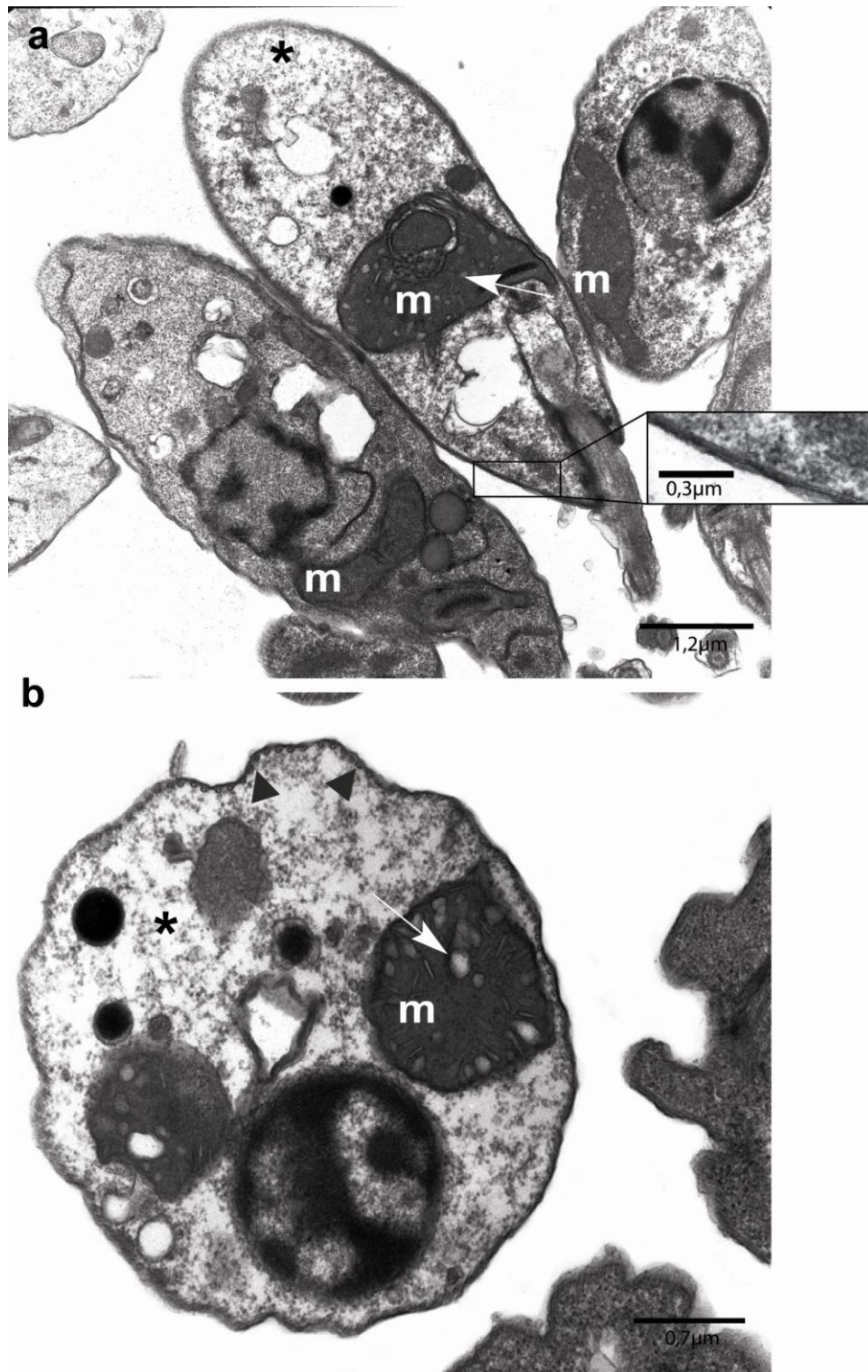


**Fig. 4.6 – Aspectos ultraestruturais típicos de promastigotas de *L. amazonensis*.** Corte longitudinal de promastigota em cultura mostrando aspecto filiforme e organelas celulares com morfologia típica. Promastigotas em cultura foram fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. (cg, complexo de Golgi; n, núcleo; m, mitocôndria; re, retículo endoplasmático; f, flagelo).



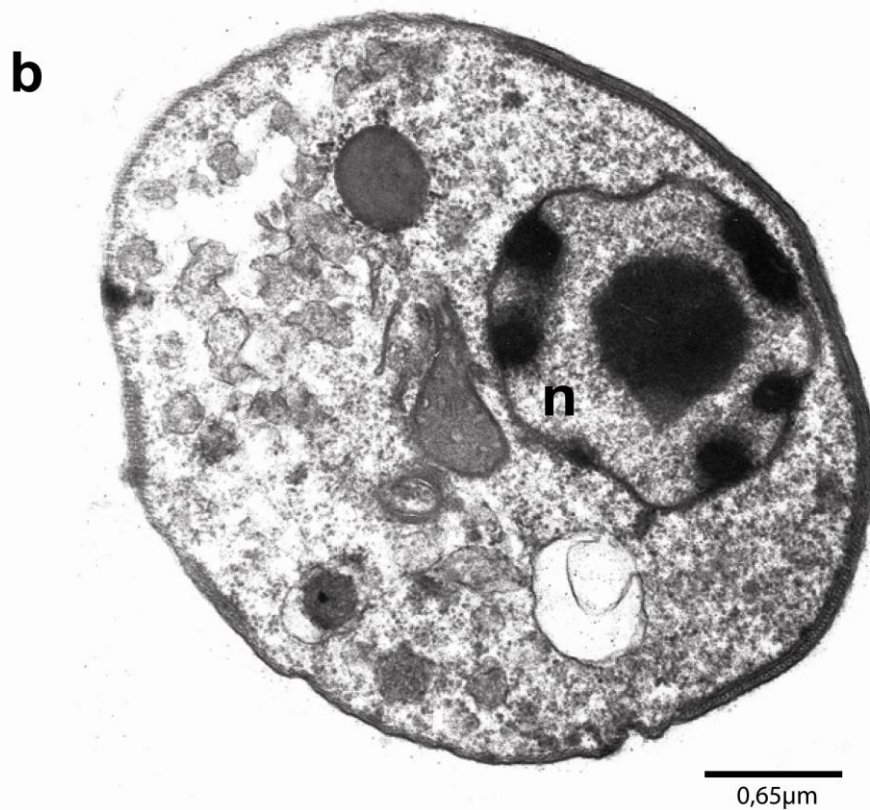
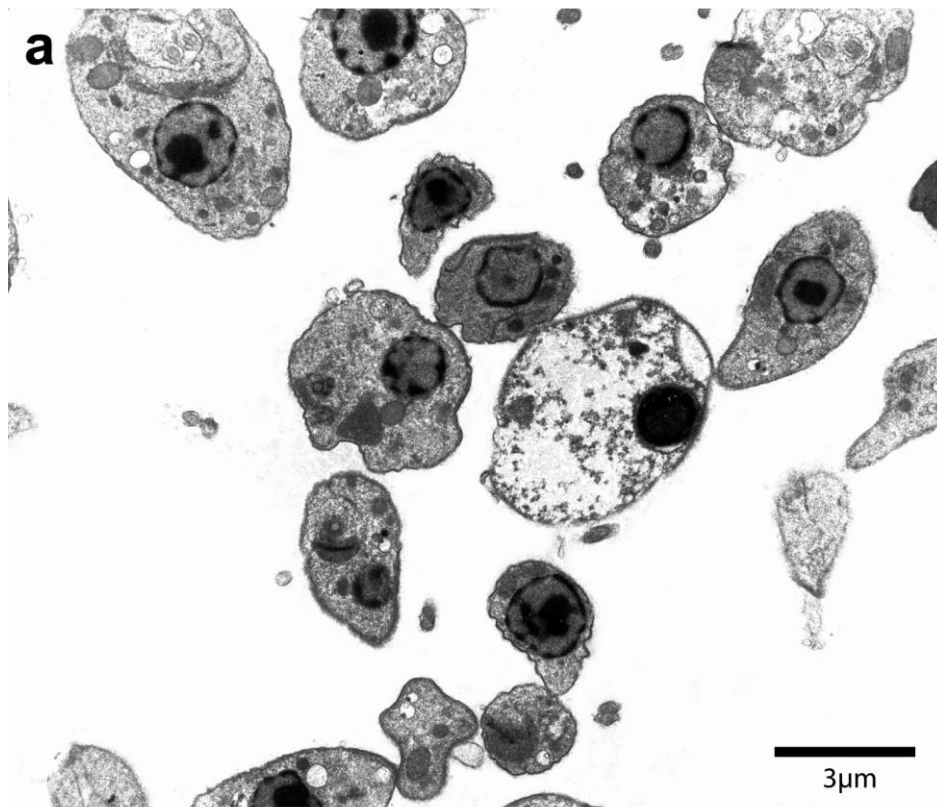


**Fig. 4.7 - Alterações ultraestruturais induzidas por 2,5µM de LQB-118 em promastigotas de *L. amazonensis*.** LBQ-118 afetou principalmente o complexo de Golgi do parasito (a) e induziu a formação de diversos vacúolos no citoplasma das células (b). (cg, complexo de golgi; n, núcleo; m, mitocôndria; re, retículo endoplasmático; f, flagelo; as setas indicam os sáculos do complexo de Golgi; as cabeças de seta indicam os microtúbulos subpeliculares). Promastigotas foram tratadas por 72 horas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.



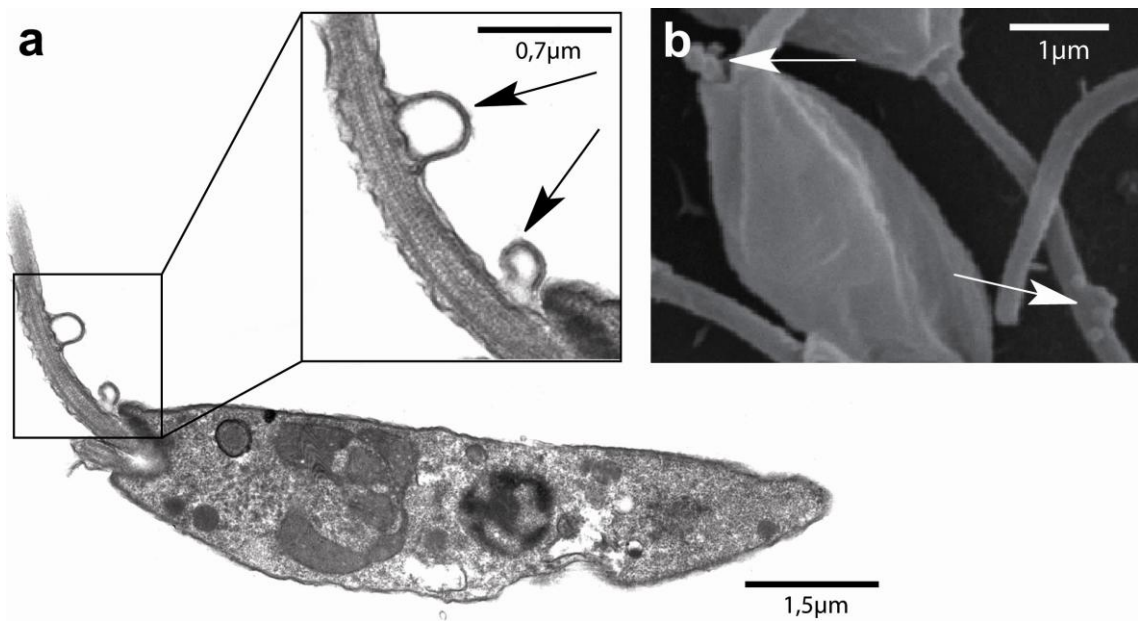
**Fig. 4.8 – Mitocôndrias de promastigotas de *L. amazonensis* são dramaticamente afetadas pelo tratamento com 10 μM de LQB-118.** LBQ-118 provocou dilatação acentuada das mitocôndrias (setas brancas), desestruturação das cristas mitocondriais e ação na matriz mitocondrial, a qual se apresentou elétron-densa. Observe também a rarefação do citoplasma (asterisco) e retração celular nos parasitos, que se tornaram mais arredondados. Note a típica organização trilaminar da membrana celular (a) e a organização inalterada dos microtúbulos subpelícuos (b, cabeças de seta). Promastigotas foram tratadas por 72 horas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.



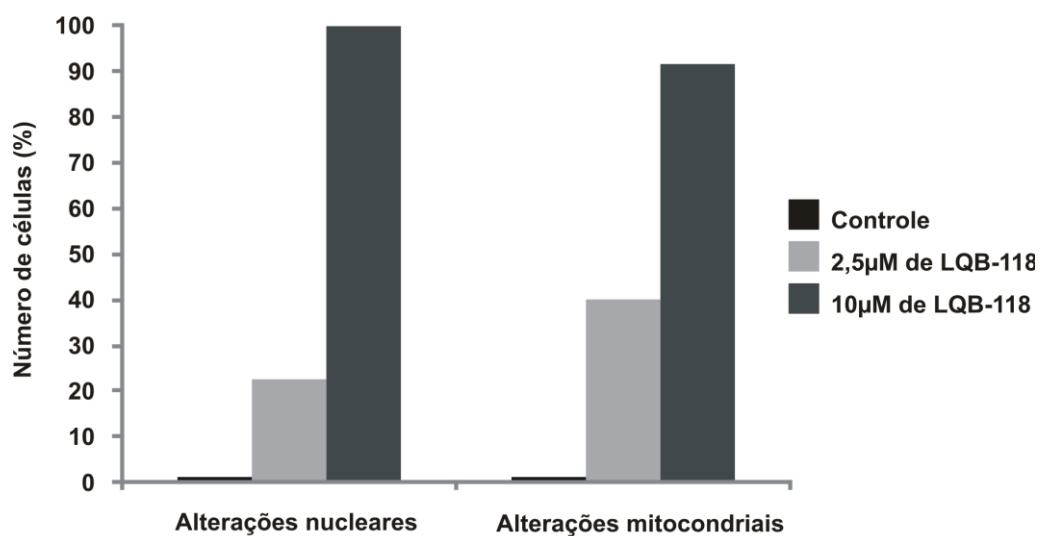


**Fig. 4.9 – LQB-118 induz condensação da cromatina nuclear de promastigotas de *L. amazonensis*.** Micrografia eletrônica panorâmica (a) em maior aumento (b) mostram a intensa compactação da cromatina nuclear, dentre outras alterações morfológicas resultantes do tratamento com LQB-118. Observe em (b) a distribuição típica da cromatina em massas agregadas na face interna do envoltório nuclear, uma das características da apoptose. Promastigotas foram tratadas por 24 horas, fixadas e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.





**Fig. 4.10 – LQB-118 induz formação de blebs na membrana de promastigotas de *L. amazonensis*.** O tratamento com 10 $\mu$ M de LBQ-118 induziu a formação de protuberâncias na membrana das promastigotas, como pode ser observado por MET (a) e MEV (b).



**Fig. 4.11 – Análise quantitativa das alterações ultraestruturais induzidas pela LQB-118 em promastigotas de *L. amazonensis*.** LQB-118 induziu, de maneira concentração-dependente, aumento das alterações morfológicas nas mitocôndrias e núcleos de promastigotas. Dados foram comparados usando-se o programa de computadores Excel. Para quantificação das alterações 25 micrografias obtidas ao acaso por microscopia eletrônica de transmissão foram avaliadas. Nestas micrografias, um total de 78 cortes de parasitos foram analisados e as organelas com ou sem alterações foram quantificadas.

**Tabela 4.2 – Alterações morfológicas desencadeadas pela LQB-118 em promastigotas**

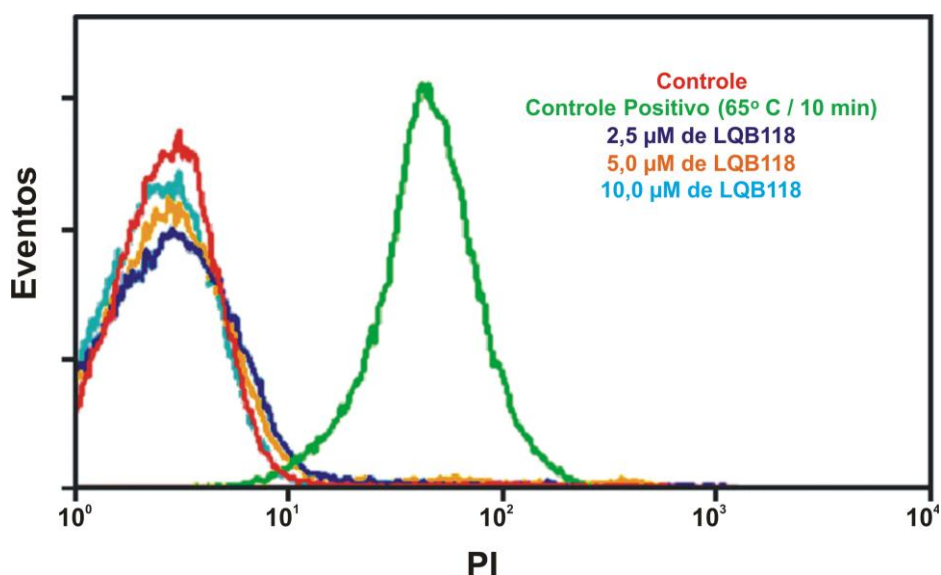
<b>Característica</b>	<b>2,5µM de LQB-118</b>	<b>10µM de LQB-118</b>
<b>Formato</b>	levemente arredondado	arredondado
<b>Citoplasma</b>	normal	Rarefeito
<b>Mitocôndria</b>	matriz elétron-densa em algumas células	dilatadas, com matriz elétron-densa e cristas desestruturadas
<b>Retículo endoplasmático</b>	normal	não visualizado na maioria das células
<b>Complexo de Golgi</b>	desestruturado	não visualizado na maioria das células
<b>Núcleo</b>	condensação da cromatina em algumas células	condensação da cromatina na maioria das células
<b>Membrana plasmática</b>	normal	normal
<b>Microtúbulos subpeliculares</b>	normais	normais
<b>Blebs</b>	ausentes	presentes

### **LQB-118 não interfere com a integridade de membrana dos parasitos tratados**

Uma das características típicas da morte celular apoptótica é a manutenção da integridade das membranas celulares. O rompimento das membranas plasmáticas com extravasamento do conteúdo celular é um evento característico da necrose (Galluzzi e cols, 2007). Micrografias obtidas por MET mostraram que mesmo células em estágios mais avançados de morte celular não apresentaram rompimento em suas membranas plasmáticas, que se mantiveram morfológicamente íntegras (Fig. 4.8).

Para confirmar as observações ultraestruturais que demonstraram que o tratamento com LQB-118 não induz alterações nas membranas das promastigotas, a integridade de membrana dos parasitos tratados também foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se o corante vital iodeto de propídeo (PI). O PI é um agente intercalante de DNA que não atravessa membranas celulares íntegras, auxiliando na identificação do tipo de morte celular que foi desencadeado nas células. A marcação com este corante é assim um método eficiente para detecção de alterações na integridade das membranas celulares (Silva e cols, 2001; Elmore, 2007).

O tratamento com LQB-118 por 48 horas não altera a integridade de membrana das promastigotas de *L. amazonensis*. As células tratadas com este protótipo, assim como as promastigotas não tratadas utilizadas como controle do experimento, não apresentaram marcação para o iodeto de propídeo (Fig. 4.12). Células aquecidas a 65°C foram utilizadas como controle positivo. Esses resultados indicam que as células tratadas com LQB-118 não estão morrendo por necrose, já que mantiveram íntegras as suas membranas.



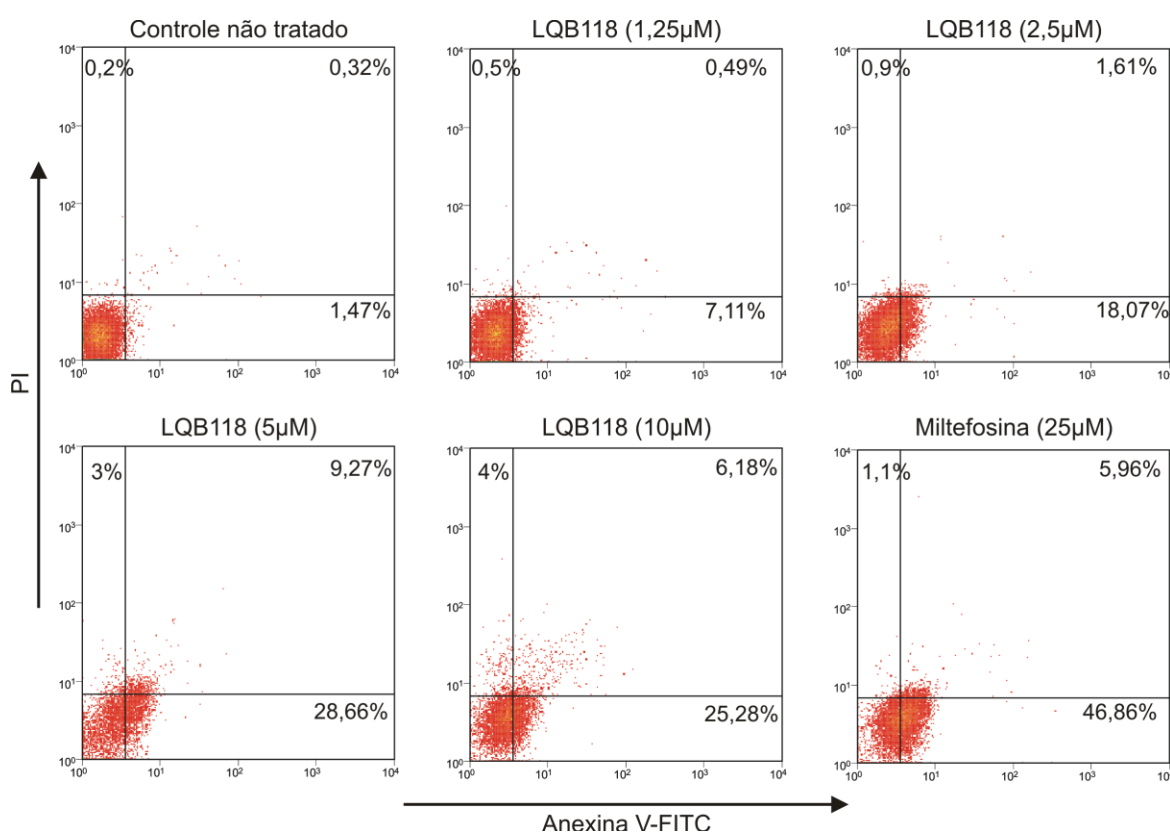
**Figura 4.12 - A LQB-118 não altera a integridade de membrana das promastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento.** Promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10µM) durante 48 horas e posteriormente coradas com iodeto de propídeo (PI). Análises por citometria fluxo das promastigotas mostraram que as células tratadas não incorporam o PI, mantendo, portanto, suas membranas íntegras. Como controle positivo para necrose, as células foram aquecidas a 65°C por 10 minutos em banho maria, e mostraram intensa marcação para PI. O histograma foi obtido no programa de computador *Summit v4.3* e é representativo de três experimentos.

### **LQB-118 induz seletivamente a externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis***

A translocação de fosfatidilserina (PS) da camada interna para a camada externa da membrana plasmática é uma alteração recorrente durante a morte celular programada (Taatjes e cols, 2008). Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos de maneira Ca<sup>2+</sup> dependente e que apresenta afinidade por PS. Como a anexina-V pode se ligar à PS na face interna da membrana de células necróticas, devido a perda da integridade de membrana durante este processo, uma marcação com iodeto de propídeo (PI) também é realizada. A partir da marcação com Anexina V e PI é possível fazer uma discriminação entre células em

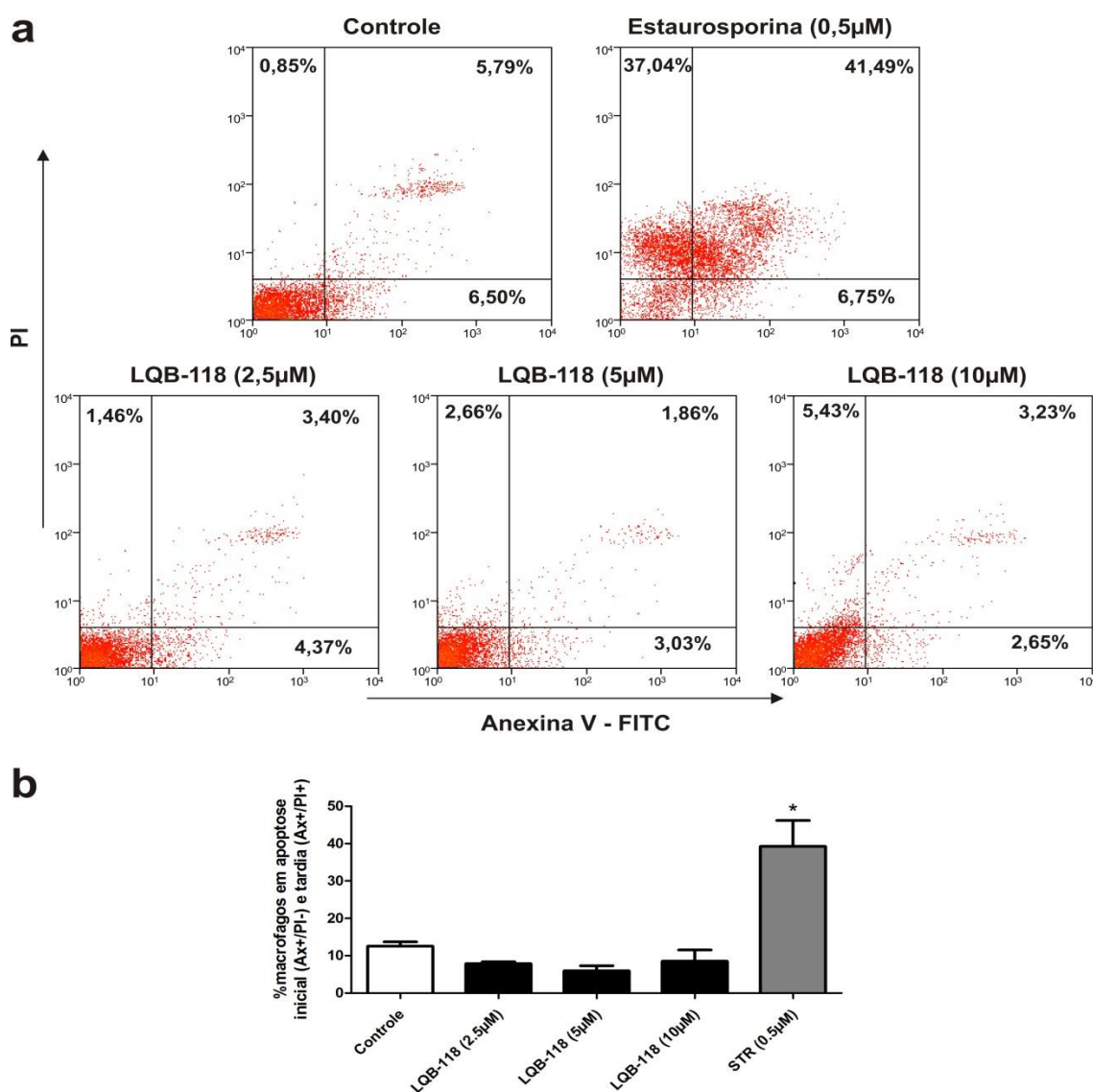
apoptose inicial (Anexina V+, PI-), células necróticas ou células em apoptose tardia (Anexina V+, PI+) e células viáveis (Anexina V-, PI-).

Como foram observadas alterações morfológicas características de apoptose nas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118, os marcadores bioquímicos deste processo também foram avaliados nos parasitos. Promastigotas tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 por 24 horas foram duplamente marcadas com Anexina-V-FITC e PI. Como mostrado na Figura 4.13, o tratamento com LQB-118 induziu um aumento na exposição de PS na membrana externa dos parasitos. A miltefosina, composto capaz de induzir externalização de PS em promastigotas de *Leishmania* (Paris e cols, 2004), foi utilizada como controle positivo do experimento.



**Figura 4.13 - Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 apresentam externalização de fosfatidilserina (PS) em suas membranas.** Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações de LQB118 (2,5; 5 e 10μM) durante 24 horas e a exposição de PS foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o marcador Anexina V-FITC. A distinção entre células apoptóticas e necróticas foi feita pela marcação simultânea com iodeto de propídeo (PI). Os parasitos tratados apresentaram aumento na exposição de PS em suas membranas quando comparados aos parasitos controle. A miltefosina foi utilizada como controle positivo do experimento. Os gráficos obtidos pelo programa de computador *Summit v4.3* mostram a fluorescência medida para cada ponto experimental e são representativos de três experimentos independentes.

Em contrapartida, macrófagos tratados com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) e submetidos à marcação com Anexina V e PI, não apresentaram exposição de PS indicativa de apoptose. A estaurosporina, utilizada como controle positivo do experimento, induziu um aumento no número de células em apoptose tardia (anexina<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) e necrose (anexina<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>), fato não observado no tratamento com LQB-118 (Fig. 4.14a). A porcentagem de células em apoptose inicial (Ax<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup>) e tardia (Ax<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) é expressa no gráfico da Figura 4.14b. Nas concentrações avaliadas a LQB-118 não induziu apoptose em macrófagos.



**Fig. 4.14 - A LQB-118 não induz externalização de fosfatidilserina (PS) em macrófagos tratados com LQB-118.** Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com várias concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) por 24 horas e a exposição de PS foi avaliada por citometria de fluxo a partir da dupla marcação com Anexina V-FITC e (iodeto de propídeo) PI. Células tratadas com LQB-118 e estaurosporina são representadas em dot-plots bi-paramétricos juntamente com células controle sem tratamento. Os dot plots obtidos pelo programa de computador *Summit v4.3* mostram a fluorescência medida para cada ponto experimental e são

representativos de três experimentos independentes (a). O gráfico obtido pelo programa de computador *Graphpad Prism 5* mostra a porcentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia quando tratadas com LQB-118 e estaurosporina. Foi utilizado One-Way ANOVA e o pós-teste de Dunnett's, \*  $P < 0,05$  em relação ao controle (b).

### **LQB-118 induz perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de maneira seletiva nos parasitos**

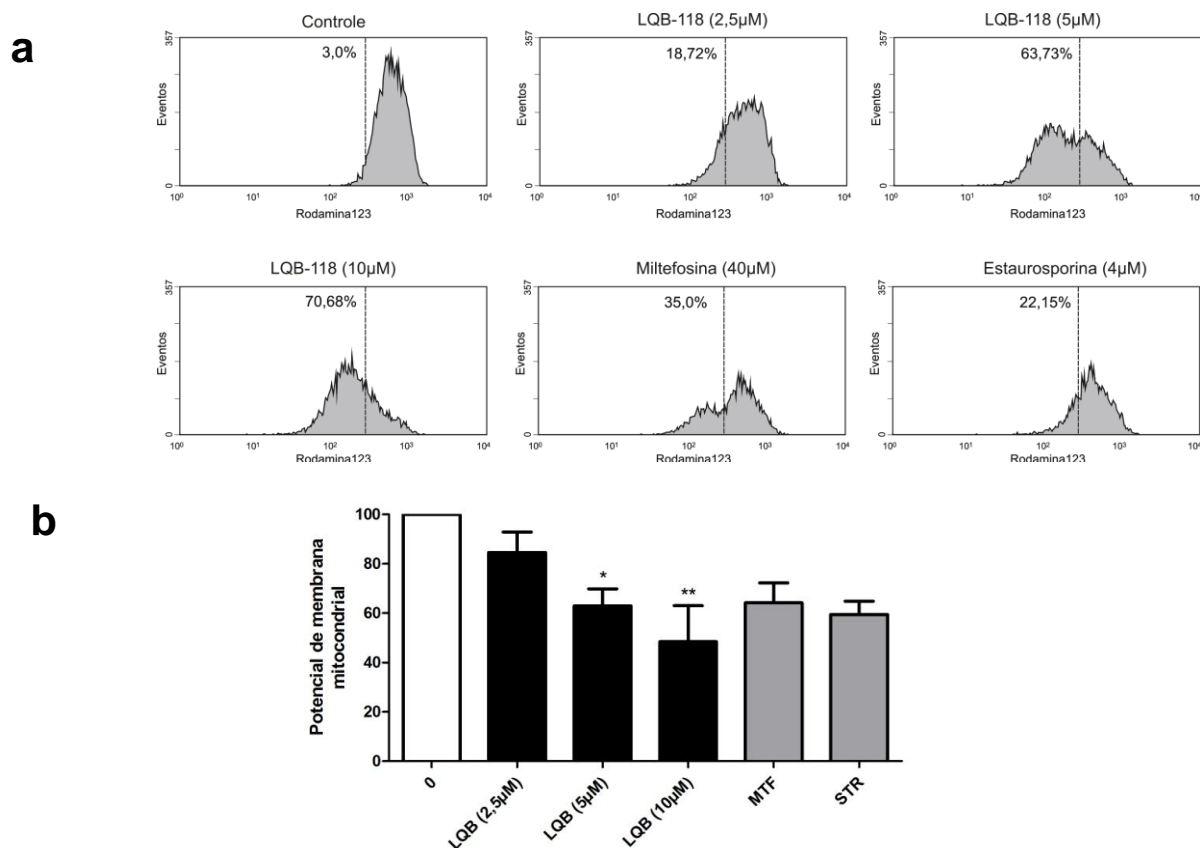
A perda do  $\Delta\Psi_m$  é uma característica típica de apoptose em metazoários e tem sido observada durante a morte induzida por fármacos em *Leishmania* (Dutta e cols, 2007a; Sen e cols, 2007a; Roy e cols, 2008; Das e cols, 2001). Como as análises ultraestruturais demonstraram que a LQB-118 induz várias alterações na morfologia mitocondrial das promastigotas, alterações no potencial de membrana dessa organela também foram avaliadas. As alterações no  $\Delta\Psi_m$  induzidas pela LQB-118 sobre promastigotas de *L. amazonensis* foram avaliadas por diferentes técnicas: citometria de fluxo, espectrofluorimetria e microscopia de fluorescência.

O  $\Delta\Psi_m$  de promastigotas tratadas com LQB-118 foi avaliado por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente rodamina 123, molécula fluorescente catiônica permeável à membrana plasmática e rapidamente seqüestrada por mitocôndrias metabolicamente ativas. Alterações no  $\Delta\Psi_m$  desencadeiam um efluxo da rodamina 123 da mitocôndria (Chen e cols, 1982). Vários estudos vêm utilizando esse composto para analisar alterações no potencial de membrana mitocondrial de células tratadas com substâncias citotóxicas (Peres e cols, 2005).

Reduções na intensidade total de fluorescência desta sonda, detectadas através do deslocamento dos picos no histograma, apontam para a perda do  $\Delta\Psi_m$ . Após o tratamento com concentrações gradativas de LQB-118, foi observado um deslocamento progressivo na distribuição de células para a esquerda do histograma, o que indica que este composto induziu a despolarização do  $\Delta\Psi_m$  dos parasitos (Fig. 4.15a). Quando tratadas com 2,5, 5 e 10  $\mu\text{M}$  de LQB-118, aproximadamente 18%, 63% e 70% das promastigotas apresentaram perda do  $\Delta\Psi_m$ , respectivamente. Uma redução no  $\Delta\Psi_m$  foi também observada após o tratamento das promastigotas com 40  $\mu\text{M}$  de miltefosina e 4  $\mu\text{M}$  de estaurosporina, substâncias cuja capacidade de alterar o  $\Delta\Psi_m$  em *Leishmania* já havia sido descrita (Arnoult e cols, 2002; Paris e cols, 2004). Os parasitos avaliados com rodamina 123 não apresentaram perda da integridade de membrana e não foram marcados com o corante fluorescente PI.

A média das medianas de fluorescência da rodamina123 para cada grupo experimental foi representada no gráfico da Figura 4.12b. Para cada experimento a mediana dos controles

foi considerada como 100% e as medianas dos grupos tratadas também foram convertidas em valores percentuais. O tratamento com 5 e 10 $\mu$ M de LQB-118 induziu uma queda significativa na mediana de fluorescência dos parasitos marcados com rodamina 123 (Fig. 4.15b).



**Fig. 4.15 - Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 apresentam diminuição do  $\Delta\Psi_m$ .** Promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10  $\mu$ M) por 48 horas e marcadas com a sonda fluorescente Rodamina 123. Alterações na intensidade de fluorescência deste marcador foram avaliadas por citometria de fluxo. Promastigotas incubadas sob as mesmas condições com 40 $\mu$ M de miltefosina e 4 $\mu$ M de estaurosporina foram usadas como controle positivo. O tratamento com LQB-118 induziu uma queda dose dependente do potencial transmembrânario mitocondrial. O experimento foi repetido pelo menos três vezes e a figura apresenta um resultado representativo. Os histogramas foram obtidos no programa de computador *Summit v4.3* (a). As medianas de fluorescência da rodamina 123 foram convertidas nos valores percentuais representados no gráfico. O tratamento com 5 e 10 $\mu$ M de LQB-118 induziu uma perda significativa do  $\Delta\Psi_m$  das promastigotas. O gráfico obtido no programa Graphpad Prism 5 é baseado em seis experimentos realizados de forma independente (média $\pm$ SEM). Teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de Dunnett's \* P<0,05 e \*\* P<0,01 em relação ao controle (b).

Alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 foram quantificadas a partir do Índice de Variação (IV) obtido pela equação  $(M_T - M_C)/M_C$ , na qual  $M_T$  corresponde a mediana de fluorescência para parasitos tratados e  $M_C$  à mediana de fluorescência para

parasitas controle (Menna-Barreto e cols, 2009). Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3 - Análise  $\Delta\Psi_m$  e Índice de variação (IV) de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118.**

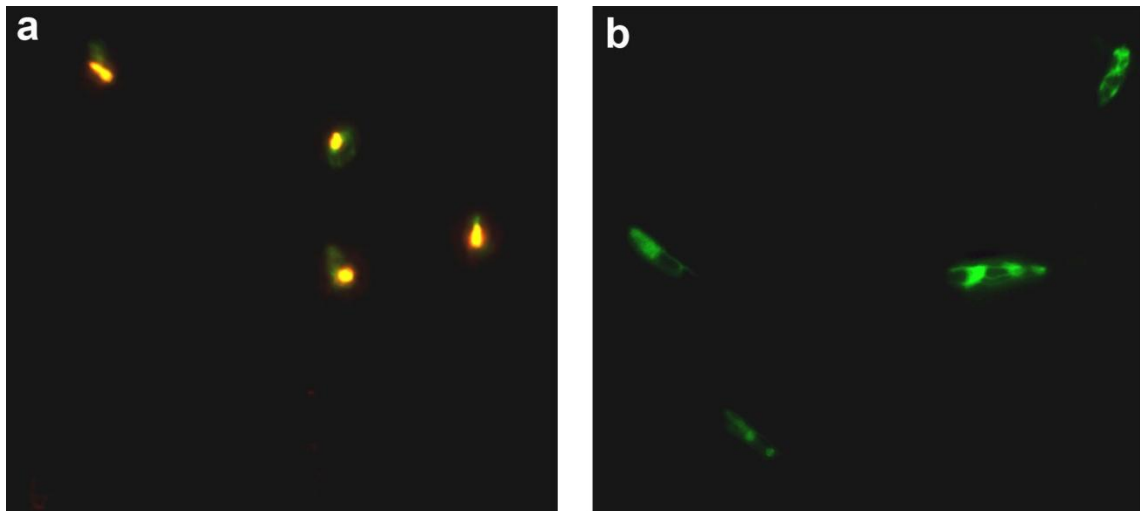
Agente	$\mu\text{M}$	Mediana	IV
<b>LQB-118</b>	0	597,7	0,00
	2,5	464,16	-0,22
	5	181,5	-0,70
	10	181,5	-0,70
<b>Miltefosina</b>	40	373,7	-0,37
<b>Estaurosporina</b>	4	401,7	-0,33

\* IV=  $(M_T - M_C)/M_C$ , na qual  $M_T$  é a mediana de fluorescência para parasitas tratados e  $M_C$  é a mediana de fluorescência para parasitas controle.

Para confirmar e ilustrar as alterações no  $\Delta\Psi_m$  de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 as células foram marcadas com o kit de detecção de apoptose Mitocapture™ (Biovision) e visualizadas por microscopia de fluorescência. O mitocapture é um marcador fluorescente que funciona de maneira similar ao corante catiônico JC-1, agregando-se e emitindo fluorescência vermelha nas mitocôndrias de células viáveis e fluorescência verde no citoplasma de células que tiveram alterações no seu  $\Delta\Psi_m$ . A marcação com mitocapture foi realizada em promastigotas mantidas em uma matriz úmida de agarose que proporciona não somente uma boa marcação das células como também a preservação da morfologia celular (Melo e cols, 2005; Melo e cols, 2009).

Os sinais de fluorescência foram detectados em microscópio de fluorescência, utilizando o filtro *dual band-pass*. O Mitocapture se acumulou na mitocôndria das células controle emitindo uma fluorescência vermelha pontual, correspondendo à mitocôndria única dos parasitos (Fig. 4.16a). Nas células tratadas com 5 $\mu\text{M}$  de LQB-118 por 48 horas o mitocapture foi visualizado pela emissão de uma fluorescência verde dispersa no citoplasma, indicando a ocorrência de perda do  $\Delta\Psi_m$  nessas promastigotas (Fig. 4.16b).

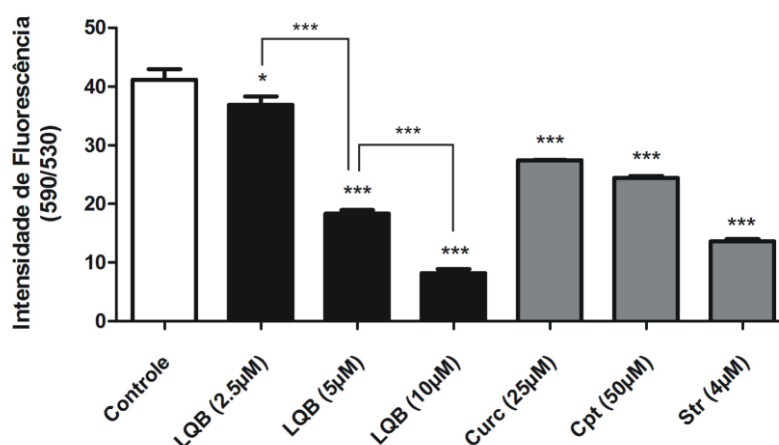




**Fig. 4.16 - Promastigotas de *L. amazonensis* apresentam colapso do  $\Delta\Psi_m$  após o tratamento com LQB-118.** Promastigotas foram tratadas com 5 $\mu$ M de LQB-118 por 48 horas, marcadas com Mitocapture e avaliadas por microscopia de fluorescência. Nas promastigotas não tratadas, o mitocapture se acumula e se agrega na mitocôndria, emitindo uma fluorescência vermelha pontual (a). Após a incubação com 5 $\mu$ M de LQB-118 a mitocôndria foi despolarizada, o corante não penetrou no espaço transmembrana e permaneceu no citoplasma sob a forma monomérica, fluorescendo em verde. As imagens foram editadas no programa de computador *Adobe Photoshop CS2*.

O  $\Delta\Psi_m$  também foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando-se a carbocianina catiônica lipofílica JC-1, nos comprimentos de onda 480/485 e 530/590nm de excitação e emissão, respectivamente. Quando as células estão ativas, a voltagem gerada através da membrana mitocondrial interna (negativa do lado interno) leva ao acúmulo de substâncias solúveis em lipídeos dentro da mitocôndria. Dessa forma, em altos  $\Delta\Psi_m$ , o corante lipofílico JC-1 se acumula e 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 laranja. A emissão de fluorescência vermelha derivada da formação de agregados é, portanto indicativa de um alto  $\Delta\Psi_m$ . 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. Assim, a formação e manutenção de agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico. A razão entre a fluorescência vermelha/verde (590/530) representa o potenciais mitocondrial (Roy e cols, 2008). Promastigotas tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 tiveram uma redução concentração-dependente do seu  $\Delta\Psi_m$ , quando comparadas com as células do grupo controle (Fig. 4.17). De maneira similar, compostos utilizados como controle positivo, tais como estaurosporina (Arnoult e cols, 2002), camptotecina (Sen e cols, 2004a) e curcumina (Das e cols, 2008), também tiveram seu  $\Delta\Psi_m$  alterado.

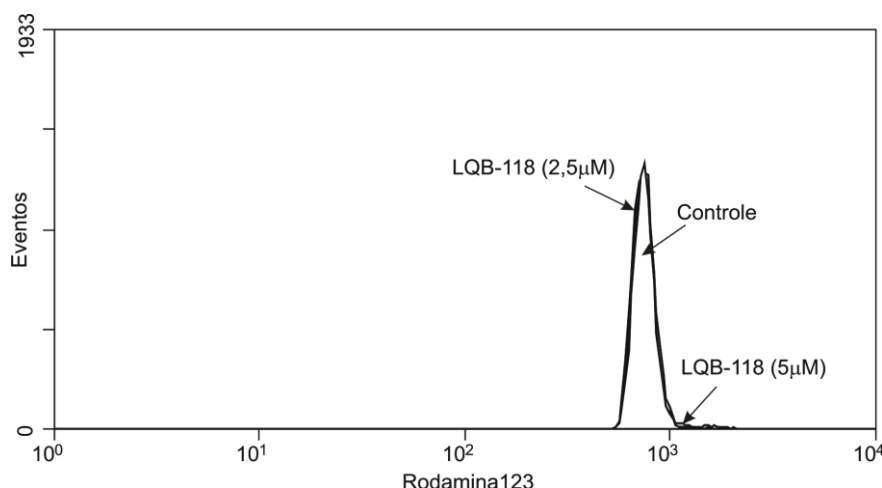
Os resultados a partir dos ensaios para verificação de alterações no potencial de membrana mitocondrial dos parasitos foram condizentes com as alterações morfológicas mitocondriais detectadas por MET.



**Fig. 4.17 - LQB-118 induz alterações no  $\Delta\Psi_m$  de formas promastigotas de *L. amazonensis*.** Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5, 5 e 10  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e marcadas com JC-1 (10 $\mu\text{g/ml}$ ). Estaurosporina (4 $\mu\text{M}$ /24horas), camptotecina (50 $\mu\text{M}$ /24horas) e curcumina (25 $\mu\text{M}$ /5horas) foram utilizados para comparação. As alterações nos valores do  $\Delta\Psi_m$  são expressas pela razão

entre a fluorescência vermelha/verde (590/530). O experimento foi feito em triplicata (média±SD) e o gráfico obtido no programa de computador *Graphpad Prism 5*. Teste estatístico One-Way ANOVA e pós-teste de Dunnett's, \* P<0,05 e \*\*\* P<0,001 em relação ao controle.

A LQB-118 induz a perda do  $\Delta\Psi_m$  de *L. amazonensis* de maneira seletiva. Análises realizadas com rodamina123 por citometria de fluxo em macrófagos peritoneais de camundongos mostraram que a LQB-118 não induziu alterações no  $\Delta\Psi_m$  das células hospedeiras (Fig. 4.18).



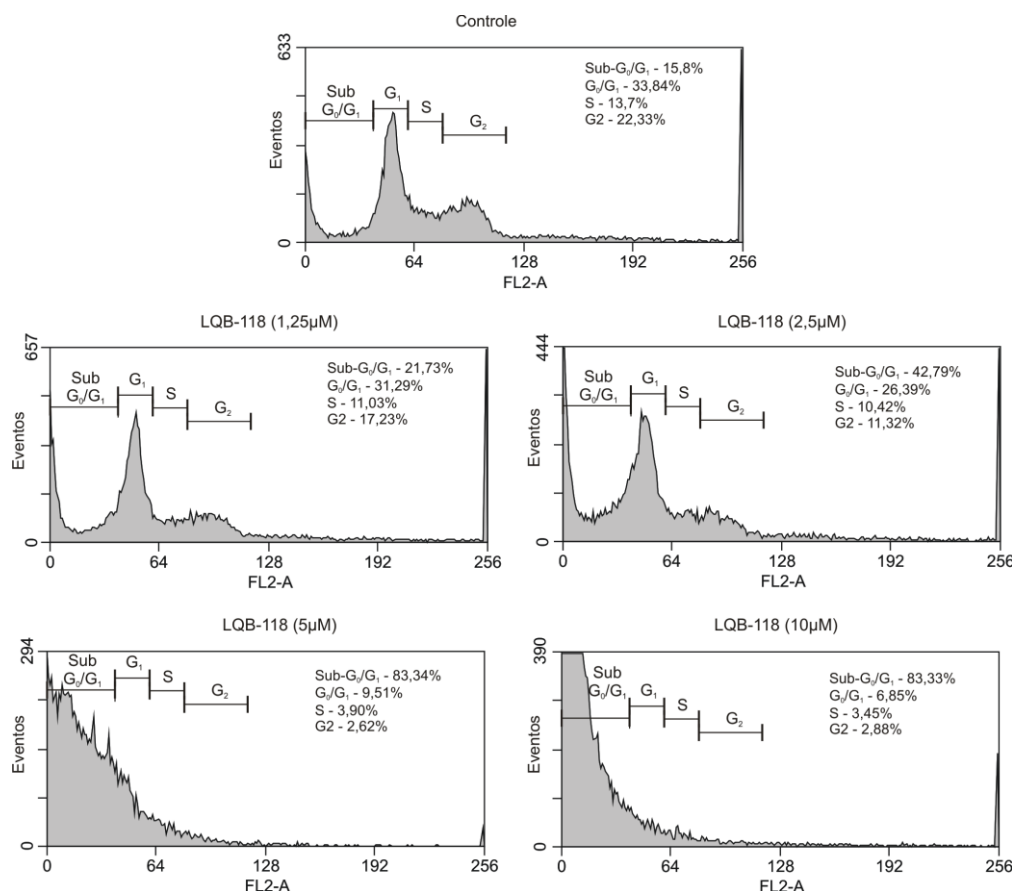
**Figura 4.18 – LQB-118 não altera o  $\Delta\Psi_m$  de macrófagos tratados.** Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com 2,5 e 5 $\mu$ M de LQB-118 por 24 horas. Após o tratamento, as células foram coradas com rodamina 123 e analisadas por citometria de fluxo.

### **O tratamento com LQB-118 interfere com o ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis***

A função do ciclo celular é duplicar o conteúdo de DNA nos cromossomos e segregá-los dentro das células-filhas geneticamente idênticas. O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases sequenciais: G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. O conjunto das fases G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> é chamado interfase. As fases G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>, consideradas fases de intervalo, preparam as células para a divisão celular e são importantes porque fornecem tempo para a célula monitorar o ambiente interno e externo para ter certeza de que as condições são apropriadas e de que a preparação está completa. Quando as condições não são favoráveis as células podem entrar em um estado de inativação especializado conhecido como G<sub>0</sub>. Durante a fase S (síntese) ocorre a duplicação do DNA celular. A segregação dos cromossomos e a divisão celular ocorrem na fase M (mitose).

A quantidade de DNA em cada uma dessas fases pode ser detectada por citometria de fluxo através da marcação com corantes que se intercalam aos ácidos nucleicos, como o iodeto de propídeo. Na fase  $G_0/G_1$  as células ainda não tiveram seus cromossomos duplicados e apresentam-se com uma quantidade 1x de DNA ( $2n$ ). Na fase  $G_2/M$  as células já tiveram seu DNA duplicado e apresentam-se com uma quantidade 2x de DNA ( $4n$ ). 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  $G_0/G_1$  e encontradas na região sub- $G_0/G_1$  (Nicoletti e cols, 1991).

A porcentagem de promastigotas com conteúdo de DNA menor do que o equivalente a  $2n$  após o tratamento com LQB-118 foi avaliada por citometria de fluxo após a permeabilização e marcação das promastigotas com PI. Após 24 horas de incubação das promastigotas com 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de LQB-118 21,7%, 42,7%, 83,3% e 83,3% as células apresentaram-se na região Sub- $G_0/G_1$ , enquanto que apenas 15,8% das células controle apresentaram-se dessa maneira. O aumento do número de células na fase Sub- $G_0/G_1$  foi acompanhado por uma diminuição no número de células da fase M e  $G_2$ . 36% das promastigotas do grupo controle apresentaram-se na fase M e  $G_2$ , enquanto que nas promastigotas tratadas com 1,25 $\mu$ M, 2,5 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M de LQB-118 esses valores foram reduzidos para 28%, 22%, 6,5%, 6,3, respectivamente (Fig. 4.19). O aumento da proporção de células na fase Sub- $G_0/G_1$  indica que o processo apoptótico induzido pela LQB-118 resulta na fragmentação do DNA dos parasitos.

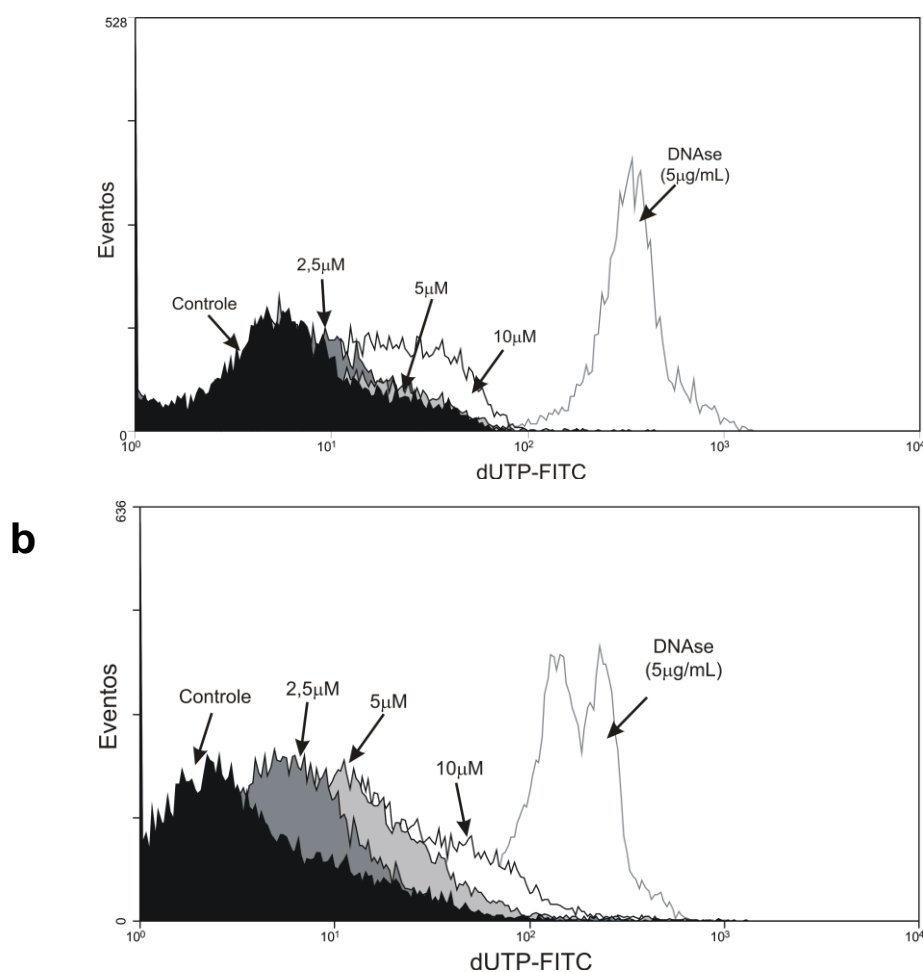


**Figura 4.19 – Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118.** Os parasitos foram incubados com diferentes concentrações de LQB-118 por 24 horas. A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular foi calculada para cada histograma. O experimento foi repetido pelo menos três vezes e a figura apresenta um resultado representativo. Os histogramas foram obtidos usando-se o programa de computador *Summit v4.3*.

### **LQB-118 induz fragmentação no DNA de promastigotas de *L. amazonensis***

Para confirmar a ocorrência de apoptose, a fragmentação do DNA de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 foi avaliada a partir do ensaio de TUNEL, utilizando-se um kit comercial (DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System / Promega). A técnica de TUNEL utiliza a enzima TdT (transferase deoxynucleotidil 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 nas células apoptóticas. Dessa forma, a quantidade de fragmentos de DNA é diretamente proporcional à fluorescência obtida. Após 24 horas de tratamento apenas a concentração 10µM de LQB-118, induziu fragmentação de DNA em uma quantidade significativa de células. Quando tratadas com a concentração mais alta de LQB-118, 35% das promastigotas apresentaram-se TUNEL positivas quando comparadas ao grupo controle (Fig. 4.20a). Porém, após 48 horas, o tratamento com 2,5, 5 e

10 $\mu$ M de LQB-118 induziu fragmentação no DNA de 37%, 67% e 81% das promastigotas (Fig. 4.20b). Esses resultados indicam que a LQB-118 induz fragmentação no DNA de promastigotas de *L. amazonensis* de maneira dose e tempo dependentes, como mostrado na tabela 4.4.



**Figura 4.20 - Análise por citometria de fluxo da fragmentação do DNA em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118.** Os parasitos foram incubados com diferentes concentrações de LQB-118 (2,5; 5 e 10 $\mu$ M) por 24 (a) e 48 horas (b). Promastigotas incubadas com 5 $\mu$ g/ml de DNase foram usadas como controle positivo. Após a incubação a ocorrência de fragmentação de DNA dos parasitos foi avaliada pelo ensaio de TUNEL. O experimento foi repetido pelo menos três vezes e a figura apresenta um resultado representativo. Os histogramas foram obtidos usando-se o programa de computador *Summit v4.3*.

### **LQB-118 induz fragmentação no DNA de amastigotas intracelulares sem afetar a célula hospedeira**

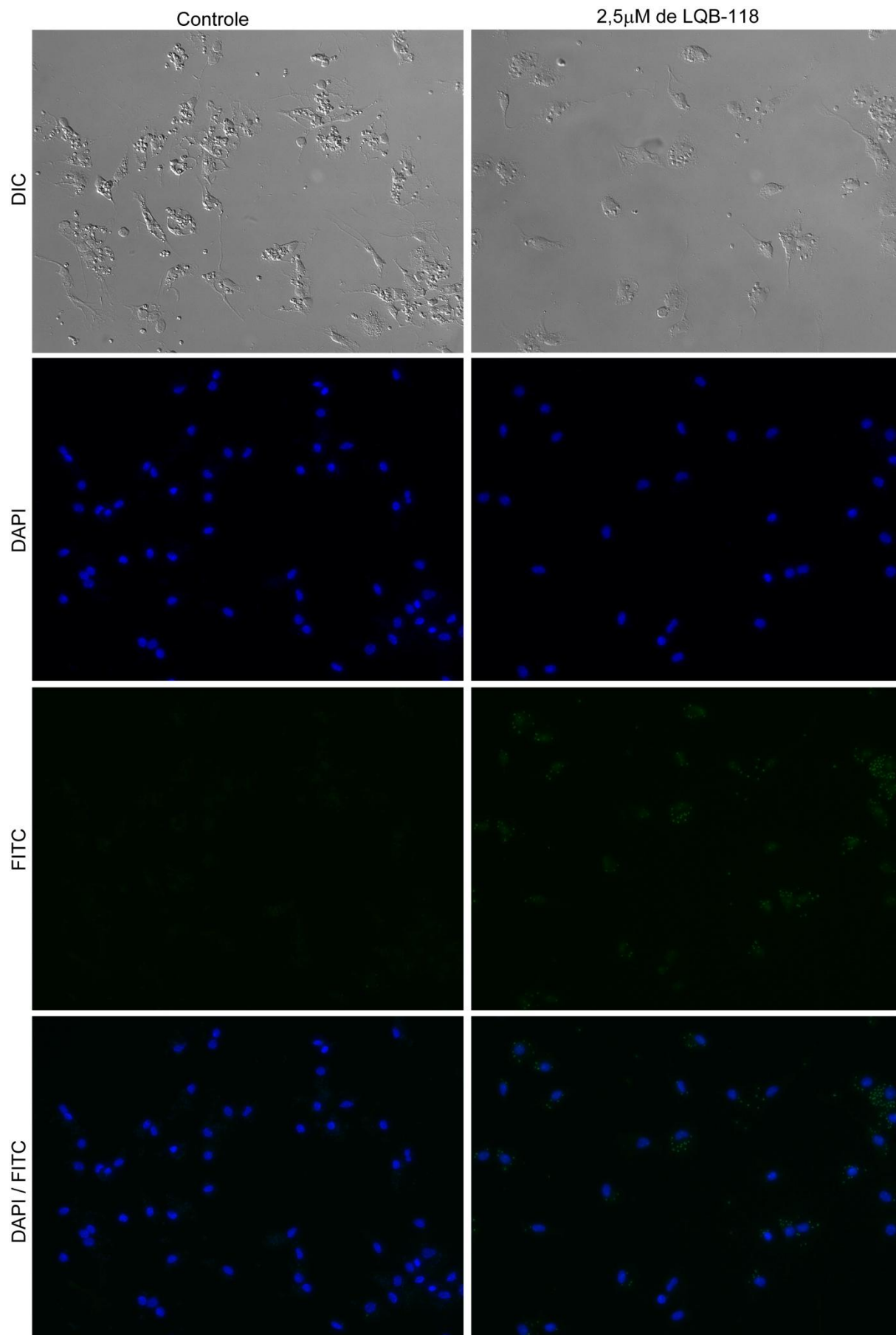
Após determinar características do processo apoptótico em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118, os estudos para identificação destes marcadores foram estendidos para as formas amastigotas dos parasitos. As formas promastigotas, que se desenvolvem no trato digestivo do inseto vetor, apesar de serem as formas infectivas, não se

constituem como o alvo clínico da LQB-118. Dessa forma, a extensão desses estudos para as formas amastigotas dos parasitos torna os resultados obtidos mais relevantes. Macrófagos peritoneais de camundongos foram retirados e infectados *in vitro* com *L. amazonensis*. O efeito da LQB-118 sobre as amastigotas intracelulares e sobre os macrófagos infectados foi então avaliado pelo ensaio com TUNEL.

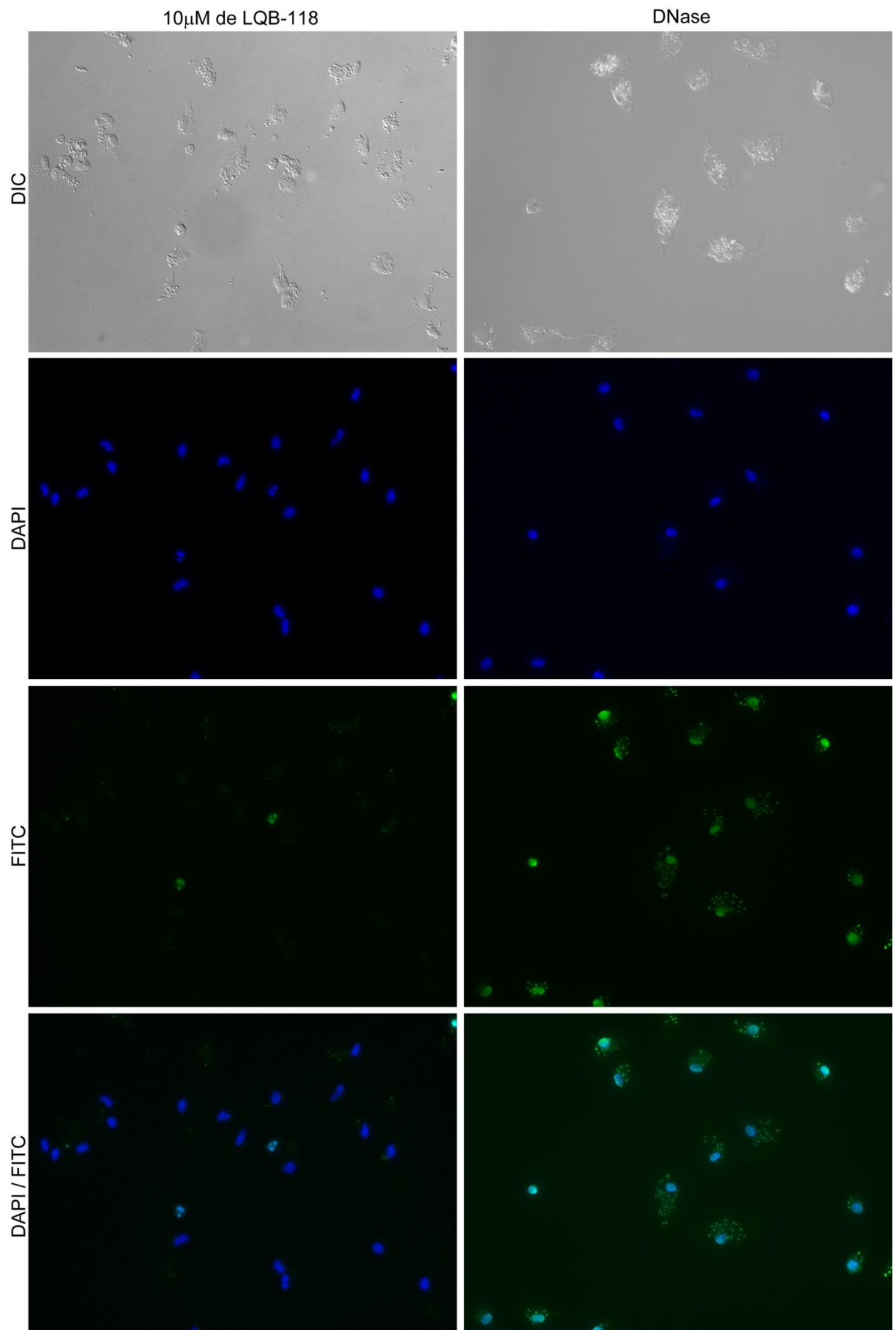
Análises realizadas por microscopia de fluorescência revelaram que a LQB-118 induziu fragmentação no DNA das formas amastigotas intracelulares do parasito sem induzir degradação do DNA da célula hospedeira. A fragmentação do DNA nuclear de amastigotas intracelulares, como determinado pela marcação em verde, foi claramente visualizada no interior dos macrófagos tratados com LQB-118. As amastigotas não tratadas, por sua vez, não apresentaram marcação (Fig. 4.20). Quando tratadas com 2,5µM de LQB-118 as amastigotas intracelulares apresentaram-se TUNEL positivas, com uma intensa marcação em verde indicando que o tratamento induziu fragmentação em seu DNA (Fig. 4.21).

Macrófagos infectados tratados com 10µM apresentaram um número extremamente reduzido de amastigotas em seu interior, devido a atividade leishmanicida da LQB-118. Além disso, a maioria dessas células se mantiveram íntegras e não apresentaram marcação em verde indicativa de fragmentação de DNA (Fig. 4.20). Apenas poucos núcleos dos macrófagos foram marcados com TUNEL, como pode ser observado na Fig. 4.20. Esse experimento demonstra que a LQB-118 atua de maneira seletiva sobre os parasitos *Leishmania*, sem provocar fragmentação no DNA das células hospedeiras. Como controle positivo do experimento, macrófagos infectados e não tratados com LQB-118 foram incubados com DNase (10µg/ml). O tratamento com DNase fragmentou tanto o DNA da célula hospedeira quanto das amastigotas intracelulares, que apresentaram intensa marcação em verde (Fig. 4.21).

Na Figura 4.21 as imagens DAPI/FITC, correspondentes aos grupos controle, 2,5µM e 10µM de LQB-118 e DNase foram aumentadas para uma melhor visualização da marcação seletiva da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.







**Figura 4.21 – LQB-118 induz fragmentação seletiva do DNA de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.** Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com *L. amazonensis* e incubados com 2,5, 5 e 10  $\mu$ M de LQB-118. Após 48 horas, as lâminas foram marcadas com TUNEL e DAPI e analisadas em microscópio de fluorescência. O tratamento com 2,5  $\mu$ M de LQB-118 induziu fragmentação no DNA das amastigotas intracelulares, que apresentaram intensa marcação em verde, quando comparadas com o grupo controle. O tratamento com a concentração mais alta de LQB-118, 10 $\mu$ M, não induziu fragmentação no DNA da célula hospedeira. Células tratadas com DNase foram usadas como controle positivo. As imagens foram editadas uniformemente no programa de computador *Adobe Photoshop CS2*.

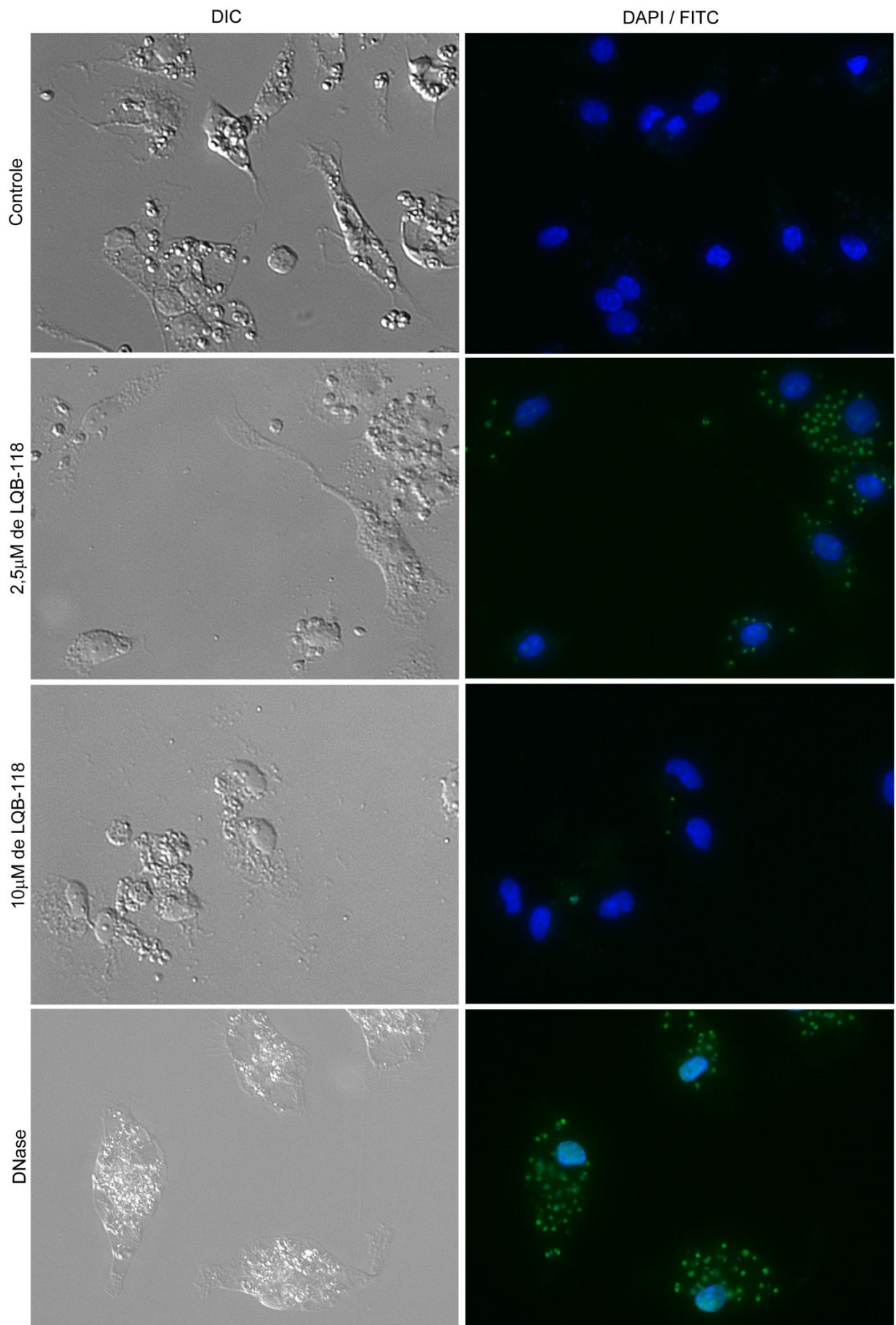


Figura 4.22 – Maior aumento das imagens DIC e DAPI/FITC da Figura 4.21.

## 5 - DISCUSSÃO

As naftoquinonas são moléculas que apresentam interessantes propriedades antitumorais (Morello e cols, 1995; Kapadia e cols, 1997; Aziz e cols, 2008; Bringmann e cols, 2008) e antiparasitárias contra diferentes patógenos, como *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (Morello e cols, 1995; Likhitwitayawuid e cols, 1998; Bringmann e cols, 2008). A naftopterocarpanoquinona LQB-118, estruturalmente relacionada ao lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone], teve suas propriedades antitumorais e seu potencial indutor de apoptose em células leucêmicas descritas recentemente (Maia e cols, 2010). Além disso, a atividade leishmanicida dessa molécula foi paralelamente demonstrada, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cunha-Júnior e cols – submetido).

Assim como a LQB-118, várias outras moléculas com atividade antitumoral apresentam também potencial leishmanicida. A miltefosina, por exemplo, inicialmente descrita como um medicamento antineoplásico (Unger e cols, 1990) capaz de induzir apoptose em linhagens de células tumorais (Unger e cols, 1990; Henke e cols, 1999; Rybczynska e cols, 2001), também é efetiva contra *Leishmania* (Jha e cols, 1999) e induz apoptose nesses parasitos (Paris e cols, 2004). De maneira similar, o composto DIM (3,3'-Diindolilmetano) que possui atividade antitumoral, induzindo apoptose em células mamárias humanas cancerosas (Gong e cols, 2006) também apresenta atividade leishmanicida e induz apoptose em promastigotas de *L. donovani* (Roy e cols, 2008).

Tendo em vista a atividade leishmanicida da LQB-118 e suas propriedades indutoras de apoptose em células tumorais, este trabalho teve como objetivo avaliar se o mecanismo de morte celular induzido por este agente em *Leishmania amazonensis* também ocorre via apoptose. Os resultados obtidos demonstraram que essa substância induz em *L. amazonensis* várias características associadas à morte celular por apoptose em metazoários.

Alterações morfológicas ultraestruturais foram observadas em promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com LQB-118 (Figs. 4.3, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9). Características semelhantes também foram descritas após tratamento com indutores de apoptose, como choque térmico em *L. amazonensis* (Moreira e cols, 1996) e *L. donovani* (Raina e cols, 2006), inibidores da esqualeno-sintetase em *L. amazonensis* (Rodrigues e cols, 2005), penstostam e anfotericina B em *L. donovani* (Lee e cols, 2002). Em 2007, o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (CNMC) instituído pelos editores da revista *Cell Death and Differentiation* sugeriu que a classificação oficial das modalidades de morte celular deveria ser baseada exclusivamente em critérios morfológicos, devido à ausência de uma clara equivalência entre as alterações ultraestruturais e as características bioquímicas da morte celular (Galluzzi e cols,

2007). Desta forma, a microscopia eletrônica é uma técnica considerada como “padrão ouro” para a identificação de células apoptóticas (Taatjes e cols, 2008). As modificações ultraestruturais observadas nas promastigotas tratadas com LQB-118 englobam várias das características morfológicas apoptóticas (Elmore, 2007), como fragmentação nuclear, cromatina condensada e marginalizada, organelas citoplasmáticas desorganizadas, formação de vacúolos grandes e elétron-lúcidos, manutenção da integridade da membrana celular e formação de blebs na superfície das células.

LQB-118 induziu retração em algumas áreas da superfície dos parasitos, que se tornaram arredondados e significativamente menores. Essas características também são alterações frequentemente detectadas em células apoptóticas de organismos multicelulares (Jimenez-Ruiz e cols, 2010). As áreas de retração devem estar relacionadas à redução do volume celular (Fig. 4.3). Promastigotas de *L. donovani* arredondadas e menores também foram detectadas após o tratamento com os indutores de apoptose  $H_2O_2$  (Das e cols, 2001) e miltefosina (Paris e cols, 2004; Verma e cols, 2004).

As alterações provocadas por concentrações mais baixas de LQB-118 consistiram na desestruturação do complexo de Golgi e na presença de números vacúolos no citoplasma das promastigotas (Fig. 4.6). Durante a apoptose, o tráfego de vesículas é bloqueado e o complexo de Golgi torna-se desestruturado. Essa organela apresenta grande parte de suas características estruturais conservadas entre as espécies (Hicks e cols, 2005) e é essencial para o processamento de lipídeos e proteínas provenientes do retículo endoplasmático (RE) (Farquhar e cols, 1998). Um grande número de proteínas implicadas na estrutura desta organela e no tráfego vesicular são clivadas por caspases durante a apoptose. Alguns estudos demonstram que o complexo de Golgi não apenas sofre as conseqüências do processo apoptótico, como também apresenta um papel ativo no desencadeamento deste tipo de morte celular (Machamer, 2003). Assim como o RE, o complexo de Golgi pode disparar o processo apoptótico em resposta a situações de estresse (excesso de proteínas desdobradas do RE, alterações no tráfego de membrana ou em sua estrutura). A descoberta da ocorrência de caspase-2 na face citoplasmática do complexo de Golgi indica que esta enzima deve exercer um papel importante na sinalização apoptótica desta organela. Moléculas regulatórias do processo apoptótico, como uma IAP chamada Apollon, também localizam-se na região do Golgi e devem atuar como um regulador da ativação da caspase-2 (Machamer, 2003; Hicks e cols, 2005). Assim como demonstrado após o tratamento com LQB-118, promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com inibidores da esqualeno-sintetase também apresentaram alterações no complexo de Golgi. O tipo de morte celular desencadeado por essa molécula não foi

determinado, mas os autores sugerem que a morte do parasito possa ser ou apoptótica (Fernandes Rodrigues e cols, 2008).

Além das modificações observadas na estrutura do complexo de Golgi, as promastigotas apresentaram alterações no retículo endoplasmático, que foi raramente observado na maioria das células tratadas, indicando que esta organela possa estar sofrendo processo de atrofia ou desintegração. O estresse do retículo endoplasmático também pode ser um fator determinante da morte celular. Dados existentes na literatura sugerem que, dependendo da célula sob investigação, as alterações nos níveis de cálcio no citoplasma e mitocôndria, provocadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) ou outros agentes, podem ser componentes críticos de sinalização, levando à ativação da apoptose (Mukherjee e cols, 2002). Estudos recém realizados mostraram que a LQB-118 induz apoptose através do aumento de íons cálcio em linhagens leucêmicas (Bacelar, T. S. – comunicação pessoal). Alguns trabalhos descrevem a participação de íons cálcio ( $Ca^{2++}$ ) na modulação do processo apoptótico de parasitos *Leishmania* (Moreira e cols, 1996; Raina e cols, 2006; Das e cols, 2008; Kulkarni e cols, 2009). Dessa forma, é possível que a LQB-118 induza um aumento nos níveis de cálcio intracelular dos parasitos decorrente da desestruturação do RE, intensificando o processo apoptótico em *L. amazonensis*.

Algumas quinonas exercem sua atividade antiparasitária a partir da alteração da função mitocondrial do parasito, como as naftofuranoquinonas (Menna-Barreto e cols, 2009) e a atovaquona, uma hidroxinaftoquinona que já tem seu uso licenciado para *P. carinii* (Baggish e cols, 2002). Nos parasitos cinetoplastídeos, como *Leishmania*, o funcionamento adequado de sua única mitocôndria é extremamente vital quando comparado a organismos que possuem numerosas mitocôndrias. Nos metazoários, mitocôndrias viáveis podem compensar o mau funcionamento daquelas que foram danificadas. Entretanto, em *Leishmania*, o processo de sobrevivência está diretamente relacionado ao funcionamento correto desta única organela e em última instância, de sua cadeia respiratória (Shaha, 2006).

Análises das micrografias eletrônicas demonstraram que a LQB-118 induziu nítidas alterações na mitocôndria do parasito, que se apresentou dilatada, com cristas desestruturadas e matriz elétron-densa (Fig. 4.3.4). Além das alterações diretamente observadas por MET na morfologia mitocondrial, a LQB-118 induziu também uma redução substancial no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos, característica típica da apoptose de metazoários. A despolarização do  $\Delta\Psi_m$  ocorre devido à permeabilização da membrana mitocondrial, que afeta a membrana interna e externa dessa organela. A permeabilização da membrana externa culmina na liberação de proteínas que normalmente se mantêm confinadas no espaço intermembranar da mitocôndria, como os ativadores das caspases (citocromo c, por

exemplo). A permeabilização da membrana interna desregula a homeostasia iônica e volumétrica da organela e dissipa o  $\Delta\Psi_m$  (Das e cols, 2008). Em *Leishmania spp.*, a despolarização da membrana mitocondrial é um evento que ocorre anteriormente ao aumento do número de células apoptóticas (Roy e cols, 2008), sugerindo que este seja um evento pró-apoptótico.

Um evento bem estabelecido na maioria das células apoptóticas é a geração de ROS (Mehta e cols, 2004; Chipuk e cols, 2005). Experimentos realizados paralelamente pelo nosso grupo mostraram que a LQB-118 induz a geração de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* (Ribeiro e cols – em preparação). A produção de ROS desencadeia alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (Roy e cols, 2008), como detectado, por exemplo, em *L. donovani* tratadas com curcumina (Das e cols, 2008). Estudos que avaliaram o mecanismo de morte celular induzido por determinadas substâncias mostraram o papel determinante da formação de ROS (Roy e cols, 2008) e da despolarização do potencial de membrana mitocondrial (Sen e cols, 2004a; Sen e cols, 2004b; Roy e cols, 2008) durante esse evento.

No presente estudo, a redução do  $\Delta\Psi_m$  também foi observada após o tratamento dos parasitos com miltefosina, estaurosporina, camptotecina e curcumina (Arnoult e cols, 2002; Paris e cols, 2004; Sen e cols, 2004b; Das e cols, 2008). Quando se avalia o Índice de Variação (IV) relacionado ao potencial de membrana mitocondrial observa-se que a miltefosina e a estaurosporina tem valores de IV menos negativos do que aqueles obtidos com a LQB-118. Esses resultados indicam que apesar dessas moléculas serem indutoras de apoptose, elas provavelmente não têm a mitocôndria como alvo primário de seu mecanismo de ação. Dessa forma, o colapso do potencial mitocondrial do parasita, mediado pelo aumento da formação de ROS pode ser um mecanismo plausível para a atividade leishmanicida da LQB-118, a partir do qual o processo de morte celular programada seria disparado.

Em metazoários, a liberação de citocromo C para o citosol desencadeia a ativação de caspases, as principais moléculas efetoras da apoptose (Debrabant e cols, 2003). Alguns estudos têm detectado a presença de citocromo C no citoplasma de promastigotas de *Leishmania* após tratamento com determinados agentes, como artemisinina (Sen e cols, 2007a), miltefosina (Verma e cols, 2007) e novobiocina (Singh e cols, 2005). Vários estudos realizados em *Leishmania* também têm estabelecido o envolvimento de atividade de caspases nesses parasitos após a indução por diferentes estímulos como miltefosina (Paris e cols, 2004; Verma e cols, 2007), novobiocina (Singh e cols, 2005), witaferina A (Sen e cols, 2007b), peróxido de hidrogênio (Das e cols, 2001) e AMP (Kulkarni e cols, 2009). Interessantemente, estudos recentes sobre o genoma de *Leishmania* não identificaram nenhum gene codificador

análogo às caspases de metazoários no genoma desses parasitos. Esses estudos, por sua vez, identificaram o envolvimento de duas metacaspases endógenas na morte celular dos parasitos (Lee e cols, 2007). Dessa forma, o envolvimento de caspases na morte celular apoptótica de *Leishmania* é ainda controverso, e autores descrevem que nesses parasitos o processo de apoptose ocorre de maneira independente de caspases (Dutta e cols, 2007a; Sen e cols, 2010). Um estudo publicado recentemente com artemisinina mostrou que a morte celular de promastigotas de *L. donovani* ocorre independentemente da ativação de caspases, sendo intensificada pelo aumento da produção de ROS, que por sua vez é o desencadeador de apoptose nos parasitos (Sen e cols, 2010). Estudos adicionais serão realizados para determinar se a morte celular apoptótica induzida pela LQB-118 em *L. amazonensis* é desencadeada pela liberação de citocromo C e conseqüentemente pela ativação de caspases nessas células. Entretanto, é possível que o mecanismo desencadeado por esta naftopterocarpanoquinona ocorra a partir da produção de ROS, assim como descrito em *L. donovani* tratada com artemisinina (Sen e cols, 2010).

Em organismos multicelulares, a apoptose é caracterizada por duas alterações proeminentes no núcleo celular: destruição da organização estrutural do próprio núcleo pelo colapso da cromatina em massas elétron-densas condensadas e fragmentação do DNA nuclear (Das e cols, 2001). A maioria das promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 apresentou essas características morfológicas nucleares típicas de apoptose (Fig. 4.8). As promastigotas tratadas com LQB-118 exibiram fragmentação em seu DNA, como demonstrado previamente em experimentos com outros fármacos, como anfotericina B (Debrabant e cols, 2003), camptotecina (Sen e cols, 2004b), miltefosina (Paris e cols, 2004) e curcumina (Das e cols, 2008). Estudos recentes têm descrito que o tratamento com alguns fármacos induz a liberação de endonucleases, responsáveis pela fragmentação de DNA em parasitos *Leishmania* (Gannavaram e cols, 2008). A fragmentação de DNA por endonucleases liberadas da mitocôndria pode representar um mecanismo de morte celular independente de caspases em tripanossomatídeos (Gannavaram e cols, 2008).

A demonstração de que a LQB-118 induz fragmentação de DNA seletivamente em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sem afetar o DNA da célula hospedeira, reforça os indícios de que esse seja de fato o mecanismo de ação na infecção. Esse resultado também sugere que o mecanismo de morte celular desencadeado pela LQB-118 seja o mesmo tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas do parasito. Como o IC<sub>50</sub> da LQB-118 em promastigotas (IC<sub>50</sub>=1,73µM) e amastigotas (IC<sub>50</sub>=1,45µM) apresenta valores bastante próximos é possível que o mecanismo de ação da LQB-118 não dependa diretamente da imunomodulação da célula hospedeira. Ao contrário do observado para a LQB-118, alguns



agentes leishmanicidas têm sua atividade aumentada pela imunomodulação macrofágica. Estudos realizados com artemisinina, por exemplo, mostraram que seu IC<sub>50</sub> em amastigotas é sete vezes menor do que o IC<sub>50</sub> detectado nas formas promastigotas de *Leishmania*, sugerindo a modulação da atividade deste composto pela célula hospedeira (Sen e cols, 2007b). Ainda não foram realizados outros ensaios para corroborar a ocorrência de apoptose em amastigotas tratadas com LQB-118. Entretanto, é bastante provável que os demais marcadores apoptóticos observados nas promastigotas também sejam detectados nas amastigotas intracelulares.

A exposição de fosfatidilserina (PS) no lado externo da membrana plasmática também consitui um dos marcadores característicos do processo apoptótico em metazoários. Em amastigotas, a externalização deste fosfolípídeo está associada ao chamado mimetismo, não significando necessariamente a morte do parasito. Em promastigotas, entretanto, a externalização de fosfatidilserina relaciona-se diretamente ao processo de morte celular desses parasitos (Wanderley e cols, 2005; Wanderley e cols, 2010). Vários estudos têm documentado a ocorrência desse fenômeno após estímulos apoptóticos nesses parasitos (Dutta e cols, 2007a; Roy e cols, 2008; Kulkarni e cols, 2009; Mukherjee e cols, 2009). A porcentagem de células PS positivas varia bastante conforme o indutor utilizado e o tempo de tratamento ao qual são submetidos os parasitos. Após 24 horas de tratamento com 5 e 10µM de LQB-118, 28% e 25% respectivamente, das promastigotas de *L. amazonensis* apresentaram marcação para PS (Tabela 5.1). Esses valores, embora não tenham sido tão altos quanto os valores obtidos com outros marcadores apoptóticos, estão em concordância com os percentuais encontrados na literatura. Recentemente, estudos realizados com curcumina em *L. donovani* demonstraram a atividade apoptótica deste indutor, que provocou externalização de PS em cerca de 27% dos parasitos após determinado período (Das e cols, 2008). Após tratamento com o indutor de apoptose *Aloe vera* a porcentagem de células PS positivas foi de aproximadamente 39% (Dutta e cols, 2007a). No caso do tratamento com artemisinina, apenas 7% das células apresentaram-se marcadas para PS após 24 horas, percentual que aumenta para 39% após 48 horas de tratamento (Sen e cols, 2007a).

Apesar das características apoptóticas típicas induzidas pelo tratamento com LQB-118, corpos apoptóticos característicos completamente formados não foram visualizados nos tempos observados. Essa peculiaridade também foi observada em *L. amazonensis* submetidas ao choque térmico (Moreira e cols, 1996). Provavelmente isso se deve à preservação, durante o tratamento, do arranjo de microtúbulos subpeliculares dos parasitos. Essa estrutura do citoesqueleto é extremamente estável e permanece intacta mesmo após a remoção da membrana por detergentes, em contraste com a estrutura instável de microtúbulos das células de mamíferos, que se despolimerizam facilmente após a ruptura celular (Moreira e cols,

1996). Entretanto, diferentemente do que foi descrito por Moreira e colaboradores em *L. amazonensis* submetidas ao choque térmico (Moreira e cols, 1996), protuberâncias na superfície de membrana (blebs) foram observados em alguns parasitos tratados com LQB-118 (Fig. 4.9).

A Tabela 1.5 resume os principais eventos apoptóticos desencadeados pela LQB-118 e a porcentagem de células que apresenta cada alteração de acordo com a concentração utilizada e o tempo de tratamento. Análises comparativas da porcentagem de células que apresentou cada característica apoptótica indicam que a LQB-118 afeta as promastigotas de *L. amazonensis* de maneira concentração-dependente, após o tratamento com 2,5 e 5 $\mu$ M do agente. O tratamento com 10 $\mu$ M de LQB-118 nem sempre induz aumento no número de células alteradas, quando comparado ao tratamento com 5 $\mu$ M. Isso indica que o platô do efeito da LQB-118 ocorre quando são empregadas concentrações até 5 $\mu$ M. A porcentagem de células apresentando cada característica também varia de acordo com a técnica utilizada, possivelmente devido a sensibilidade de cada método empregado no estudo.

**Tabela 5.1 - Análise comparativa dos métodos utilizados para o estudo da apoptose**

<b>Característica avaliada</b>	<b>2,5<math>\mu</math>M de LQB-118</b>	<b>5<math>\mu</math>M de LQB-118</b>	<b>10<math>\mu</math>M de LQB-118</b>
<b>Exposição de PS (Anexina – 24 horas)</b>	16,6	27,19	23,81
<b>Perda do <math>\Delta\Psi_m</math> (Rodamina 123 – 24 horas)</b>	15,72	60,73	67,68
<b>Perda do <math>\Delta\Psi_m</math> (JC-1 – 24 horas)</b>	10,45	55,48	80,06
<b>Perda do <math>\Delta\Psi_m</math> (Mitocapture – 24 horas)</b>	-	48,6	-
<b>Fragmentação de DNA (Tunel – 24 horas)</b>	9,86	6,74	31,35
<b>Fragmentação de DNA (Tunel – 48 horas)</b>	12,95	42,73	56,69
<b>Redução do tamanho celular (citometria de fluxo – 48 horas)</b>	35,11	51,94	37,06

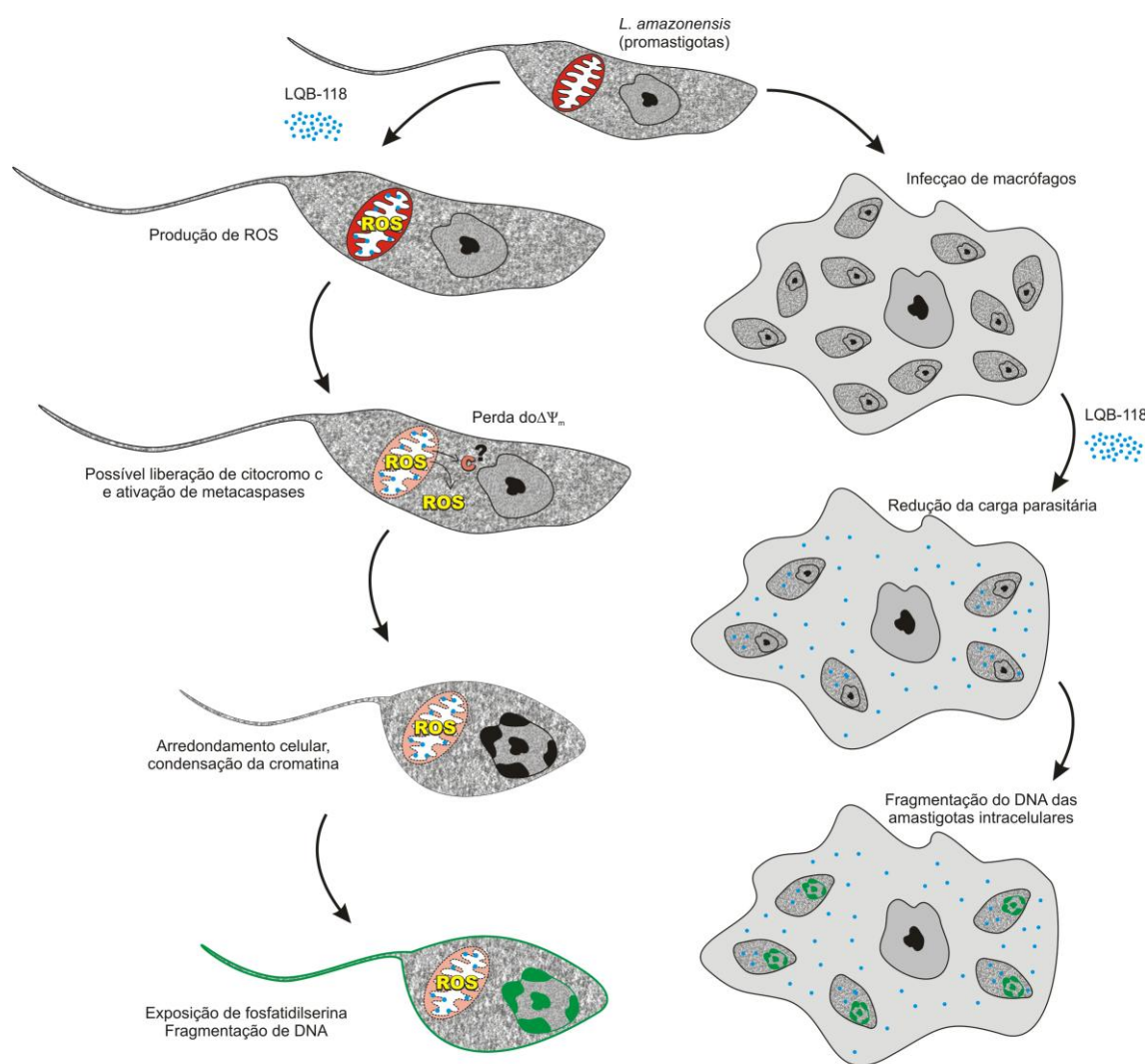
\*Os valores representam o percentual de células apresentando determinada alteração subtraindo-se os valores obtidos em cada controle.

Alterações morfológicas e características apoptóticas como exposição de fosfatidilserina, perda do potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA não foram observadas em macrófagos tratados com concentrações eficazes de LQB-118 contra *L. amazonensis*. Esse resultado indica que a LQB-118 atua de maneira seletiva sobre o parasito e reforça a possibilidade de sua utilização como uma forma de intervenção terapêutica.

É extremamente importante elucidar os caminhos bioquímicos que desencadeiam a morte celular de *Leishmania*, a regulação gênica deste processo e como esse fenômeno se

sobrepõe aos processos dos mamíferos. É necessário determinar se esses organismos compartilham com os organismos multicelulares alguns ou todos os efetores e reguladores da apoptose ou se possuem um caminho próprio divergente (Verma e cols, 2007). A indução seletiva de apoptose pela LQB-118 aqui apresentada sugere que os mecanismos de controle desse processo no parasito e na célula hospedeira sejam divergentes.

A Fig. 5.1 apresenta esquematicamente o mecanismo de ação leishmanicida proposto para a LQB-118, que é um importante passo para a evolução desse protótipo a um real candidato a fármaco. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a LQB-118, promove sua atividade leishmanicida através da morte celular programada e que a mitocôndria constitui uma organela importante na regulação da cascata de morte celular em *L. amazonensis*.



#### APOPTOSE EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS INTRACELULARES

**Figura 5.1 – Mecanismo de ação proposto para LQB-118 sobre *L. amazonensis*.** A naftopterocarpanoquinona LQB-118 induz a produção de espécies reativas de oxigênio sobre promastigotas de *L. amazonensis*, tendo a mitocôndria como seu alvo mais provável. A produção de ROS induz a despolarização do potencial de membrana mitocondrial dos parasitos e a possível liberação de citocromo c e ativação de caspases no citoplasma. As promastigotas tratadas com LQB-118 apresentam-se arredondadas, menores e exibem condensação da cromatina nuclear. O tratamento com LQB-118 induz nos parasitos a exposição de fosfatidilserina no lado externo da membrana plasmática e fragmentação no DNA. Em macrófagos infectados a LQB-118 reduz significativamente a carga parasitária, possivelmente desencadeando nas amastigotas o processo de morte celular por apoptose, tendo sido observada a fragmentação do DNA dessas formas de *Leishmania*.

## 6. CONCLUSÃO

- As concentrações de LQB-118 efetivas contra *Leishmania* não induzem alterações morfológicas e bioquímicas nas células hospedeiras. Essa característica é extremamente importante, pois indica que a LQB-118 atua sobre os parasitos de maneira seletiva, podendo ser considerada para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas contra leishmanioses.
- LQB-118 induz nos parasitos tratados diversas alterações morfológicas características das alterações apoptóticas de células de metazoários. Essas alterações incluem arredondamento, retração celular, desestruturação de organelas citoplasmáticas como mitocôndria, complexo de Golgi e retículo endoplasmático (RE), condensação da cromatina nuclear, formação de vacúolos e rarefação do citoplasma.
- As promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com LQB-118 apresentam-se significativamente menores quando comparadas aos parasitos controle, morfolologicamente alongados. O tratamento com LQB-118 não altera a integridade de membrana dos parasitos, que permanece morfolologicamente inalterada, com microtúbulos subpeliculares bem organizados.
- Os indicadores apoptóticos clássicos observados em organismos multicelulares também foram detectados em *L. amazonensis*. Formas promastigotas desses parasitos exibiram externalização de fosfatidilserina na face externa de suas membranas plasmáticas, perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e fragmentação de DNA, sugerindo que o mecanismo de morte celular desencadeado pela LQB-118 ocorra através da apoptose. Esse tipo de morte celular também deve ser induzido pela LQB-118 sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, que também apresentaram-se com DNA fragmentado após o tratamento com este agente.
- As vias pelas quais o mecanismo apoptótico é desencadeado em *L. amazonensis* pela LQB-118 ainda precisam ser estabelecidas. Nossos dados nos possibilitam postular hipóteses sobre algumas das possíveis vias disparadas por essa substância.

- Uma das vias pelas quais a apoptose pode estar sendo desencadeada nesses parasitos pela LQB-118 pode ser através da mitocôndria única desses organismos, intensamente afetada durante o tratamento. O colapso do potencial mitocondrial do parasito, mediado pelo aumento da formação de ROS (evento detectado em experimentos realizados paralelamente) pode ser um mecanismo plausível responsável pelo desencadeamento da apoptose, induzindo a liberação de fatores pró-apoptóticos mitocondriais para o citoplasma das células.
  
- As alterações iniciais observadas na estrutura do complexo de Golgi também levantam a hipótese de uma participação mais ativa desta organela no processo apoptótico a partir da liberação de caspase-2.
  
- Além disso, a desestruturação do RE visulizada nas células tratadas também pode ser o evento responsável pelo disparo da morte celular nos parasitos, devido a alterações desencadeadas na homeostasia do cálcio intracelular.
  
- Juntos, esses dados sugerem que a LQB-118 induz seletivamente muitas das alterações clássicas associadas à apoptose, e o colapso do potencial mitocondrial parece ser o responsável por disparar o processo de morte celular programada no parasito.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* 2006 22 (12), 552-557.

Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis* 2006 11 (2), 161-171.

Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, de la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 52 (10), 3779-3782.

Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 2002 9 (1), 65-81.

Azeredo-Coutinho RB, Conceicao-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonca SC. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007 101 (7), 735-737.

Aziz MH, Dreckschmidt NE, Verma AK. Plumbagin, a medicinal plant-derived naphthoquinone, is a novel inhibitor of the growth and invasion of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res* 2008 68 (21), 9024-9032.

Baggish AL, Hill DR. Antiparasitic agent atovaquone. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 46 (5), 1163-1173.

Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007 25 (2), 203-211.

Barcinski MA, Moreira ME, Balanco JM, Wanderley JL, Bonomo AC. The role of apoptotic mimicry in host-parasite interplay: is death the only alternative for altruistic behavior? *Kinetoplastid Biol Dis* 2003 2 (1), 6.

Beyrer C, Villar JC, Suwanvanichkij V, Singh S, Baral SD, Mills EJ. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet* 2007 370 (9587), 619-627.

Blum JA, Hatz CF. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. *J Travel Med* 2009 16 (2), 123-131.

Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003 5 (12), 1051-1061.

BoseDasgupta S, Das BB, Sengupta S, Ganguly A, Roy A, Dey S, Tripathi G, Dinda B, Majumder HK. The caspase-independent algorithm of programmed cell death in *Leishmania* induced by baicalein: the role of LdEndoG, LdFEN-1 and LdTatD as a DNA 'degradesome'. *Cell Death Differ* 2008 15 (10), 1629-1640.

Brandao AA, Miranda A, Degraeve WM, Sousa MA. The heterogeneity of choanomastigote-shaped trypanosomatids as analyzed by their kDNA minicircle size: taxonomic implications. *Parasitol Res* 2000 86 (10), 809-812.

Bray PG, Barrett MP, Ward SA, de Koning HP. Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends Parasitol* 2003 19 (5), 232-239.

Bringmann G, Rudenauer S, Irmer A, Bruhn T, Brun R, Heimberger T, Stuhmer T, Bargou R, Chatterjee M. Antitumoral and antileishmanial dioncoquinones and ancistroquinones from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae). *Phytochemistry* 2008 69 (13), 2501-2509.

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.

Chen LB, Summerhayes IC, Johnson LV, Walsh ML, Bernal SD, Lampidis TJ. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1982 46 Pt 1, 141-155.



Cheng SY, Huang KJ, Wang SK, Wen ZH, Chen PW, Duh CY. Antiviral and anti-inflammatory metabolites from the soft coral *Sinularia capillosa*. *J Nat Prod* 2010 73 (4), 771-775.

Chipuk JE, Green DR. Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 6 (3), 268-275.

Clarke PG, Clarke S. Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 1996 193 (2), 81-99.

Cornillon S, Foa C, Davoust J, Buonavista N, Gross JD, Golstein P. Programmed cell death in *Dictyostelium*. *J Cell Sci* 1994 107 ( Pt 10), 2691-2704.

Crosby IT, Bourke DG, Jones ED, de Bruyn PJ, Rhodes D, Vandegraaff N, Cox S, Coates JA, Robertson AD. Antiviral agents 2. Synthesis of trimeric naphthoquinone analogues of conocurvone and their antiviral evaluation against HIV. *Bioorg Med Chem* 2010 18 (17), 6442-6450.

Cupolillo E, Aguiar Alves F, Brahim LR, Naiff MF, Pereira LO, Oliveira-Neto MP, Falqueto A, Grimaldi G, Jr. Recent advances in the taxonomy of the New World leishmanial parasites. *Med Microbiol Immunol* 2001 190 (1-2), 57-60.

da Silva AJ, Buarque CD, Brito FV, Aurelian L, Macedo LF, Malkas LH, Hickey RJ, Lopes DV, Noel F, Murakami YL, Silva NM, Melo PA, Caruso RR, Castro NG, Costa PR. Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of new (+/-) 1,4-naphthoquinones structurally related to lapachol. *Bioorg Med Chem* 2002 10 (8), 2731-2738.

da Silva AJM, Netto, C. D., Pacienza-Lima, W., Torres-Santos, E. C., Rossi-Bergmann, B., Maurel, S., Valentin, A., Costa, P. R. R. Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives. *J Braz Chem Soc* 2002 20, 176-182.

da Silva EN, Jr., Guimaraes TT, Menna-Barreto RF, Pinto Mdo C, de Simone CA, Pessoa C, Cavalcanti BC, Sabino JR, Andrade CK, Goulart MO, de Castro SL, Pinto AV. The evaluation of quinonoid compounds against *Trypanosoma cruzi*: synthesis of imidazolic

anthraquinones, nor-beta-lapachone derivatives and beta-lapachone-based 1,2,3-triazoles. *Bioorg Med Chem* 2010 18 (9), 3224-3230.

Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 2001 114 (Pt 13), 2461-2469.

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.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2009 22 (6), 491-502.

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

Deponte M. Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* 2008 1783 (7), 1396-1405.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2004 27 (5), 305-318.

Dias ES, Regina-Silva S, Franca-Silva JC, Paz GF, Michalsky EM, Araujo SC, Valadao JL, de Oliveira Lara-Silva F, de Oliveira FS, Pacheco RS, Fortes-Dias CL. Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol* 2010.

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* 2007a 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* 2007b 56 (Pt 9), 1196-1204.

El-On J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Isr Med Assoc J* 2009 11 (10), 623-628.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007 35 (4), 495-516.

Esteves-Souza A, Lucio KA, Da Cunha AS, Da Cunha Pinto A, Da Silva Lima EL, Camara CA, Vargas MD, Gattass CR. Antitumoral activity of new polyamine-naphthoquinone conjugates. *Oncol Rep* 2008 20 (1), 225-231.

Farquhar MG, Palade GE. The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol* 1998 8 (1), 2-10.

Faucher B, Piarroux R. [Visceral leishmaniasis: An update.]. *Rev Med Interne* 2010.

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

Fieser LF, Berliner E, et al. Naphthoquinone antimalarials; general survey. *J Am Chem Soc* 1948 70 (10), 3151-3155.

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.

Gannavaram S, Vedvyas C, Debrabant A. Conservation of the pro-apoptotic nuclease activity of endonuclease G in unicellular trypanosomatid parasites. *J Cell Sci* 2008 121 (Pt 1), 99-109.

Garnier T, Mantyla A, Jarvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *J Antimicrob Chemother* 2007 60 (4), 802-810.

Gong Y, Sohn H, Xue L, Firestone GL, Bjeldanes LF. 3,3'-Diindolylmethane is a novel mitochondrial H(+)-ATP synthase inhibitor that can induce p21(Cip1/Waf1) expression by induction of oxidative stress in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2006 66 (9), 4880-4887.

Goodwin LG. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 89 (3), 339-341.

Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8 (4), 419-433.

Grivicich I, Regner A, da Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2007 53 (3), 335-343.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000 407 (6805), 770-776.

Henke J, Engelmann J, Kutscher B, Nssner G, Engel J, Voegeli R, Leibfritz D. Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine-induced apoptosis monitored by fluorescence- and <sup>13</sup>C NMR-spectroscopy. *Anticancer Res* 1999 19 (5B), 4027-4032.

Hicks SW, Machamer CE. Golgi structure in stress sensing and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2005 1744 (3), 406-414.

Holzmueller P, Sereno D, Cavaleyra M, Mangot I, Daulouede S, Vincendeau P, Lemesre JL. Nitric oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. *Infect Immun* 2002 70 (7), 3727-3735.

Hussain SG, Ramaiah KVA. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *Current Science* 2007 93 (12), 1684-1696.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 1999 341 (24), 1795-1800.

Jimenez-Ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Luder CG, Fasel N, Hurd H. Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasit Vectors* 2010 3, 104.

Kapadia GJ, Balasubramanian V, Tokuda H, Konoshima T, Takasaki M, Koyama J, Tagahaya K, Nishino H. Anti-tumor promoting effects of naphthoquinone derivatives on short term Epstein-Barr early antigen activation assay and in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Lett* 1997 113 (1-2), 47-53.

Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 1965 27, 137A–138A.

Kaur J, Singh BK, Tripathi RP, Singh P, Singh N. *Leishmania donovani*: a glycosyl dihydropyridine analogue induces apoptosis like cell death via targeting pteridine reductase 1 in promastigotes. *Exp Parasitol* 2009 123 (3), 258-264.

Kaur J, Singh N, Singh BK, Dube A, Tripathi RP, Singh P, Singh N. *Leishmania donovani*: oral therapy with glycosyl 1,4-dihydropyridine analogue showing apoptosis like phenotypes targeting pteridine reductase 1 in intracellular amastigotes. *Exp Parasitol* 2010 125 (3), 310-314.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 26 (4), 239-257.

Kim MH, Jo SH, Ha KS, Song JH, Jang HD, Kwon YI. Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. *J Microbiol Biotechnol* 2010 20 (8), 1204-1209.

Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz W, McGwire BS. Antimicrobial peptide-induced apoptotic death of *Leishmania* results from calcium-dependent, caspase-independent mitochondrial toxicity. *J Biol Chem* 2009 284 (23), 15496-15504.

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.

Lee N, Gannavaram S, Selvapandiyar A, Debrabant A. Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 2007 6 (10), 1745-1757.

Leon LL, Machado GM, Paes LE, Grimaldi Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990 84 (5), 678-680.

Likhitwitayawuid K, Kaewamatawong R, Ruangrunsi N, Krungkrai J. Antimalarial naphthoquinones from *Nepenthes thorelii*. *Planta Med* 1998 64 (3), 237-241.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009 51 (5), 247-253.

Luder CG, Campos-Salinas J, Gonzalez-Rey E, van Zandbergen G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasit Vectors* 2010 3 (1), 116.

Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi_m$ ) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003 8, 115–128.

Machamer CE. Golgi disassembly in apoptosis: cause or effect? *Trends Cell Biol* 2003 13 (6), 279-281.

Maia RC, Vasconcelos FC, de Sa Bacelar T, Salustiano EJ, da Silva LF, Pereira DL, Moellman-Coelho A, Netto CD, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs* 2010.

Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol* 2010 2010, 617521.

Martinez MM, Reif RD, Pappas D. Detection of apoptosis: A review of conventional and novel techniques. *Analytical Methods* 2010 2, 996–1004.

- Mattson MP, Chan SL. Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 2003 5 (12), 1041-1043.
- Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004 279 (12), 11798-11813.
- Melo RC. Depletion of immune effector cells induces myocardial damage in the acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: ultrastructural study in rats. *Tissue Cell* 1999 31 (3), 281-290.
- Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Ghiran I, Dvorak AM, Weller PF. Human eosinophils secrete preformed, granule-stored interleukin-4 through distinct vesicular compartments. *Traffic* 2005 6 (11), 1047-1057.
- Melo RC, Spencer LA, Perez SA, Neves JS, Bafford SP, Morgan ES, Dvorak AM, Weller PF. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. *Lab Invest* 2009 89 (7), 769-781.
- 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), 644-653.
- Menna-Barreto RF, Henriques-Pons A, Pinto AV, Morgado-Diaz JA, Soares MJ, De Castro SL. Effect of a beta-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. *J Antimicrob Chemother* 2005 56 (6), 1034-1041.
- Ministério da Saúde. Diagnóstico Clínico e Diferencial. Atlas de Leishmaniose Tegumentar americana. 2006 1 (1), 1-119.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2. ed. atual. 2007 1 (1), 1-140.
- 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), 107-123.

Misra P, Khaliq T, Dixit A, SenGupta S, Samant M, Kumari S, Kumar A, Kushawaha PK, Majumder HK, Saxena AK, Narender T, Dube A. Antileishmanial activity mediated by apoptosis and structure-based target study of peganine hydrochloride dihydrate: an approach for rational drug design. *J Antimicrob Chemother* 2008 62 (5), 998-1002.

Moreira ME, Del Portillo HA, Milder RV, Balanco JM, Barcinski MA. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol* 1996 167 (2), 305-313.

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

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.

Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 2002 277 (27), 24717-24727.

Murray HW, Hariprasad J. Activity of oral atovaquone alone and in combination with antimony in experimental visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 40 (3), 586-587.

Netto CD, da Silva AJ, Salustiano EJ, Bacelar TS, Rica IG, Cavalcante MC, Rumjanek VM, Costa PR. New pterocarpanquinones: synthesis, antineoplastic activity on cultured human malignant cell lines and TNF- $\alpha$  modulation in human PBMC cells. *Bioorg Med Chem* 2010 18 (4), 1610-1616.



Netto CD, Santos ES, Castro CP, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR. (+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *Eur J Med Chem* 2009 44 (2), 920-925.

Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008 6 (9), 754-765.

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), 271-279.

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

Peres CM, Curi R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A 2005, 283 p.

Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 2008 321 (5891), 970-974.

Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* 2006 82 (972), 649-657.

Podlipaev SA, Frolov AO. The phylogeny of the Trypanosomatidae: the molecular and morphological approaches. *Parazitologiya* 2000 34 (3), 169-182.

Raina P, Kaur S. Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* 2006 289 (1-2), 83-90.

Ready PD. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* 2010 15 (10), 19505.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007 7 (9), 581-596.

Rodrigues JC, Urbina JA, de Souza W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 2005 111 (4), 230-238.

Ross AE, Emadi A, Marchionni L, Hurley PJ, Simons BW, Schaeffer EM, Vuica-Ross M. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. *BJU Int* 2010.

Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol* 2008 74 (5), 1292-1307.

Rybczynska M, Spitaler M, Knebel NG, Boeck G, Grunicke H, Hofmann J. Effects of miltefosine on various biochemical parameters in a panel of tumor cell lines with different sensitivities. *Biochem Pharmacol* 2001 62 (6), 765-772.

Saha P, Sen R, Hariharan C, Kumar D, Das P, Chatterjee M. Berberine chloride causes a caspase-independent, apoptotic-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Free Radic Res* 2009 43 (11), 1101-1110.

Sairafianpour M, Christensen J, Staerk D, Budnik BA, Kharazmi A, Bagherzadeh K, Jaroszewski JW. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. *J Nat Prod* 2001 64 (11), 1398-1403.

Santoro GF, das Gracas Cardoso M, Guimaraes LG, Salgado AP, Menna-Barreto RF, Soares MJ. Effect of oregano (*Origanum vulgare L.*) and thyme (*Thymus vulgaris L.*) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. *Parasitol Res* 2007 100 (4), 783-790.

Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 2008 103 (1), 1-10.

Sen N, Banerjee B, Das BB, Ganguly A, Sen T, Pramanik S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. 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* 2007b 14 (2), 358-367.

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* 2004a 279 (50), 52366-52375.

Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, Rakshit S, Sen T, Majumder HK. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ* 2004b 11 (8), 924-936.

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* 2007a 56 (Pt 9), 1213-1218.

Sen R, Saha P, Sarkar A, Ganguly S, Chatterjee M. Iron enhances generation of free radicals by Artemisinin causing a caspase-independent, apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Free Radic Res* 2010 44 (11), 1289-1295.

Sereno D, Holzmuller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 45 (7), 2064-2069.

Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* 2006 123 (3), 233-244.

Shemarova IV. Signaling mechanisms of apoptosis-like programmed cell death in unicellular eukaryotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2010 155 (4), 341-353.

Shukla AK, Singh BK, Patra S, Dubey VK. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Appl Biochem Biotechnol* 2010 160 (8), 2208-2218.

Silva MN, Ferreira VF, Souza MCBV. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na  $\beta$ -lapachona e derivados. *Quim. Nova* 2003 26 (3), 407-416.

Silva MT. Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 2010 584 (22), 4491-4499.

Silva TL, Reis A, Hewitt C, Roseiro JC. Citometria de fluxo: funcionalidade celular online em bioprocessos. *Boletim Biotecnologia* 2001, 32-40.

Singh G, Jayanarayan KG, Dey CS. Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2005 141 (1), 57-69.

Singh N, Kaur J, Kumar P, Gupta S, Singh N, Ghosal A, Dutta A, Kumar A, Tripathi R, Siddiqi MI, Mandal C, Dube A. An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. *Parasitol Res* 2009 105 (5), 1317-1325.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004 10 (6), 307-315.

Srivastava P, Dayama A, Mehrotra S, Sundar S. Diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2010.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 2008 118 (4), 1301-1310.

Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem* 2003 278 (27), 25120-25132.

Szabadkai G, Rizzuto R. Participation of endoplasmic reticulum and mitochondrial calcium handling in apoptosis: more than just neighborhood? *FEBS Lett* 2004 567 (1), 111-115.

Taatjes DJ, Sobel BE, Budd RC. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. *Histochem Cell Biol* 2008 129 (1), 33-43.

Tapia RA, Alegria L, Pessoa CD, Salas C, Cortes MJ, Valderrama JA, Sarciron ME, Pautet F, Walchshofer N, Fillion H. Synthesis and antiprotozoal activity of naphthofuranquinones and naphthothiophenequinones containing a fused thiazole ring. *Bioorg Med Chem* 2003 11 (10), 2175-2182.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 9 (3), 231-241.

Tolezano JE, Uliana SR, Taniguchi HH, Araujo MF, Barbosa JA, Barbosa JE, Floeter-Winter LM, Shaw JJ. The first records of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in dogs (*Canis familiaris*) diagnosed clinically as having canine visceral leishmaniasis from Aracatuba County, Sao Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol* 2007 149 (3-4), 280-284.

Unger C, Peukert M, Sindermann H, Hilgard P, Nagel G, Eibl H. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Cancer Treat Rev* 1990 17 (2-3), 243-246.

Valderrama JA, Zamorano C, Gonzalez MF, Prina E, Fournet A. Studies on quinones. Part 39: Synthesis and leishmanicidal activity of acylchloroquinones and hydroquinones. *Bioorg Med Chem* 2005 13 (13), 4153-4159.

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), 6521-6525.

Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 48 (8), 3010-3015.

Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007 116 (1), 1-13.

Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Bol. Soc. Brasil. Dermat 1912 1, 36-38.

Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. Cell Mol Life Sci 67 (10), 1653-1659.

Wanderley JL, Benjamin A, Real F, Bonomo A, Moreira ME, Barcinski MA. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. Braz J Med Biol Res 2005 38 (6), 807-812.

Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, de Souza AP, Barral A, Balanco JM, do Nascimento MT, Saraiva EM, Barcinski MA. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. PLoS One 2009 4 (5), e5733.

Williams DA. Foye's Principles of Medicinal Chemistry 3th Ed. In. Lemke, T. L., Ed. 2002 Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.

Wyllie AH. "Where, O death, is thy sting?" A brief review of apoptosis biology. Mol Neurobiol 2010 42 (1), 4-9.

Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. Bmj 2002 325 (7357), 176-177.

WHO. <http://www.who.int/tdroid/diseases/leish/leish.htm>. Acessado em 1 de fevereiro de 2010.

WHO. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061043>. Acessado em 28 de novembro de 2010. 2009a.

WHO. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061046>. Acessado em 28 de novembro de 2010. 2009b.

WHO. <http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=9706927>. Acessado em 30 de novembro de 2010. 2009c.

WHO. Magnitude of the problem. [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/index.html). Acessado em 28 de novembro de 2010.

Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002 9 (10), 1126-1139.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 2004 19, 124-128.

Zong WX, Thompson CB. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev* 2006 20 (1), 1-15.