

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrícia de Almeida Machado

**EFEITO DE BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL COMPLEXADOS A
METAL EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ASSOCIADAS À
LEISHMANIOSE CUTÂNEA E ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE
DO PARASITO**

Juiz de Fora

2017

PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO

**EFEITO DE BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL COMPLEXADOS A
METAL EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ASSOCIADAS À
LEISHMANIOSE CUTÂNEA E ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE
DO PARASITO**

Tese de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra
Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva**

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Machado, Patrícia de Almeida. Efeito de bioisósteros do resveratrol complexados a metal em espécies de Leishmania associadas à leishmaniose cutânea e estudo do mecanismo de morte do parasito / Patrícia de Almeida Machado. -- 2017. 162 p. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David da Silva

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2017.

1. Leishmania. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Resveratrol. 4. Complexos metálicos.
I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. Silva, Adilson David da, coorient. III. Título.

Patrícia de Almeida Machado

**EFEITO DE BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL COMPLEXADOS A METAL EM
ESPÉCIES DE *LEISHMANIA* ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE CUTÂNEA E
ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE DO PARASITO**

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas
Tese de Doutorado em Imunologia e Doenças Infecto-parasitárias

Data de aprovação: ___/___/_____

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Eveline Gomes Vasconcelos - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof^a. Dr^a. Patrícia Elaine de Almeida - Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto - FIOCRUZ-RJ

Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Dias – Centro Universitário Estácio de Sá

*Dedico este trabalho aos meus pais Rita e José Roberto,
que muito me apoiaram e incentivaram.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças para chegar até o final do Doutorado e por todas as Graças que me concedeu durante este período.

Aos meus pais Rita e José Roberto, e ao Luiz Gustavo, pelo apoio, carinho, força e orações.

A todos os meus amigos e familiares que rezaram e torceram por mim.

À Elaine, pela orientação desde 2007 e em especial pela amizade. Obrigada por tudo!!

Ao Adilson, pela co-orientação e pela participação na síntese dos compostos. Ao Prof. Dr. Alexandre Cuiin e aos alunos Vinícius e Gustavo pela síntese dos compostos utilizados neste trabalho.

Às professoras do Departamento de Parasitologia, pelos ensinamentos.

A todos os amigos do Laboratório de Parasitologia, pelas ajudas, empréstimos, risadas e grandes momentos compartilhados.

Às técnicas Cristina e Ivone, pelas ajudas e pela convivência.

À Prof. Dr. Patrícia Elaine, pela doação das células Vero.

Aos professores Jacy e Gilson pelas ajudas nas leituras de citometria de fluxo.

Ao Prof. Dr. Celso Nakamura e sua aluna Elizandra, pela ajuda com a Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

À Prof. Dra. Silvia Dias pelos ensinamentos e ajuda com o teste *in vivo*.

Ao Prof. Dr. Wallace Lima, pela contribuição com os experimentos de toxicidade *in vivo*.

À Gabriane, pela ajuda com as fotos de microscopia de fluorescência; à Alyssa, pela ajuda com o PhotoShop e à Dani pela ajuda com a coleta de sangue dos camundongos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e DIP).

À UFJF, Capes, FAPEMIG, CNPq pelo financiamento.

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, causando grande impacto na saúde pública mundial. O tratamento é limitado por uma série de fatores e a necessidade de alternativas para a quimioterapia é urgente. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos e estudar o mecanismo de morte do parasito associado ao tratamento. Foram testados doze bioisómeros do resveratrol, sendo cinco não complexados a metais, quatro complexados a ouro e três complexados a vanádio, em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* e em macrófagos peritoneais. Para o teste em promastigotas e em macrófagos peritoneais, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT, enquanto no teste em amastigotas, o efeito dos compostos foi avaliado pela contagem das formas intracelulares. Foi ainda avaliada a seletividade e a especificidade dos compostos, através do cálculo do índice de seletividade e do índice de especificidade de cada composto. Os compostos complexados a metais, comparados aos não complexados, apresentaram significativo efeito em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp., e ainda foram seletivos ao parasito, em comparação com a célula hospedeira. Posteriormente, baseado na síntese, efetividade e seletividade, o composto **11 (VOSalophen)**, um complexo de vanádio, foi selecionado para estudos sobre mecanismos de morte e atividade em modelo de leishmaniose cutânea murina. Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen** apresentam alterações mitocondriais, observados por meio das marcações com JC-1, Mitotracker® Red CM-H2XROS e rodamina 123 e da microscopia eletrônica de transmissão (MET); aumentam a produção de EROs (utilizando H₂DCFDA), acumulam corpos lipídicos (marcação com Nile Red), apresentam alterações morfológicas, mas não alteram a integridade da membrana plasmática, visto não haver marcação com iodeto de propídeo. Além disto, os parasitos apresentam redução no tamanho celular e volume celular; externalização de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática do parasito (usando marcação com anexina V-FITC) e utilizando a técnica do TUNEL foi observada a fragmentação do DNA. Em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, também foi verificada fragmentação do DNA (técnica TUNEL). O conjunto destes resultados sugere morte por apoptose-like. Além disso, foi verificado um aumento de formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (marcação com MDC e MET), sugerindo a ocorrência de autofagia. Em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, **VOSalophen** induz um aumento de produção de ON e EROs, indicando modulação celular do composto em células infectadas. Em modelo de leishmaniose cutânea murina, o tratamento com o **VOSalophen** causou significativa redução da carga parasitária nas patas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, quando comparado ao controle e além disso, não mostrou toxicidade renal e hepática aos animais tratados, o que foi avaliado através das dosagens de AST, ALT, GGT e creatinina. Esses resultados, em conjunto, mostram o significativo efeito *in vitro* e *in vivo* de bioisómeros do resveratrol complexados a metais.

Palavras-chave: *Leishmania*, quimioterapia das leishmanioses, resveratrol, complexos metálicos, apoptose-like, autofagia.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, causing significant impact on global public health. The treatment is limited by a number of factors, and the need for alternatives to chemotherapy is urgent. Thus, this study aimed to evaluate the leishmanicidal activity of bioisosters of resveratrol and its metal complexes and to study the mechanism of parasite death associated with the treatment. Twelve bioisosters of resveratrol were tested, five not complexed to metals, four complexed to gold and three complexed to vanadium, in promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. major* and in peritoneal macrophages. In promastigotes and peritoneal macrophages, the cell viability was assessed by the MTT colorimetric method, while in amastigotes, the effect of the compounds was evaluated by counting the intracellular forms. It was also assessed the selectivity and specificity of the compounds, by calculating the selectivity index and the specificity index of each compound. The compounds complexed to metals, compared to non-complexed, showed a significant effect on promastigotes and amastigotes of *Leishmania* sp., and were further selective to the parasite compared to the host cell. Subsequently, based on the synthesis, effectiveness and selectivity, the compound **11 (VOSalophen)**, a vanadium complex, was selected for studies on the mechanisms of death and activity in the murine model of cutaneous leishmaniasis. *L. amazonensis* promastigotes treated with **VOSalophen** exhibit mitochondrial alterations, which was observed by JC-1, Mitotracker® Red CM-H2XROS e rhodamina 123 staining and transmission electronic microscopy (TEM); increased ROS production (using H₂DCFDA); accumulate lipid bodies (Nile Red staining), exhibit morphological changes, but did not alter the integrity of the plasma membrane since no staining with propidium iodide. In addition, the parasites had a reduction in cell volume and size; phosphatidylserine externalization on the outer face of parasite's plasma membrane (annexin V-FITC staining) and using the TUNEL technique, DNA fragmentation was observed. In *L. amazonensis* intracellular amastigotes, DNA fragmentation was also observed (TUNEL technique). This set of results suggests death by apoptosis-like. Furthermore, there was an increase of autophagic vacuole formation in *L. amazonensis* promastigotes treated with **VOSalophen** (MDC staining and TEM), suggesting the occurrence of autophagy. In macrophages infected with *L. amazonensis*, **VOSalophen** induces an increase of nitric oxide and reactive oxygen species production, indicating a modulatory effect in infected cells. In the murine model of cutaneous leishmaniasis, the treatment with **VOSalophen** caused a significant reduction in the parasite load in the paws of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*, when compared to control and furthermore not showed renal and hepatic toxicity to the treated animals, which was evaluated by the AST, ALT, GGT and creatinine dosages. These results, taken together, show the significant effect of bioisosters of resveratrol complexed to metals.

Keywords: *Leishmania*, chemotherapy of leishmaniasis, resveratrol, metal complexes, apoptosis-like, autophagy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: (A) Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> . (B) Macrófago infectado com amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	18
Figura 2: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i>	20
Figura 3: Distribuição mundial da LC nos últimos 10 anos.....	22
Figura 4: Estrutura química e alguns nomes comerciais das principais drogas usadas para o tratamento da LC	30
Figura 5: Estrutura química do resveratrol	36
Figura 6: Delineamento experimental do trabalho.....	41
Figura 7: Efeito hemolítico induzido pelo composto VOSalophen , resveratrol 1 e anfotericina B.....	88
Figura 8: Efeito de VOSalophen no crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 72 horas de tratamento.....	89
Figura 9: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas através de marcação com JC-1.....	90
Figura 10: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas através de marcação com Mitotracker® Red CM-H2XROS.....	91
Figura 11: Produção de EROs em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas e posteriormente marcados com H ₂ DCFDA.	93
Figura 12: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento de 3 e 6 horas com VOSalophen (27 e 53 μM) e avaliadas através de marcação com JC-1.	94
Figura 13: Produção de EROs em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μM) por 3 e 6 horas e posteriormente marcados com H ₂ DCFDA.	95
Figura 14: Acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas e posteriormente marcados com Nile Red.....	96
Figura 15: Fotomicrografia ilustrativa do efeito de VOSalophen (27 e 53 μM) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , após 24 horas de tratamento.....	97
Figura 16: Volume dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas.....	98
Figura 17: Tamanho (corpo + flagelo) dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas.....	99
Figura 18: Integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas, marcados com PI e avaliados por citometria de fluxo.....	100
Figura 19: Integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o VOSalophen (27, 53, 106 e 160 μM) por 24 horas, marcados com PI e avaliados por fluorimetria.....	101

Figura 20: Externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μ M) por 24 horas.....	103
Figura 21: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da fragmentação do DNA de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μ M) por 24 horas	105
Figura 22: Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (27 e 53 μ M) por 24 horas	107
Figura 23: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da ocorrência de autofagia em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen por 24 horas	108
Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com VOSalophen (13 μ M) por 24 horas	110
Figura 25: Análise da reversibilidade do efeito de VOSalophen (27 e 53 μ M) no crescimento de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura fresco	111
Figura 26: Análise da infectividade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o VOSalophen (27 e 53 μ M) e recuperados em meio de cultura sem droga	113
Figura 27: Efeito de VOSalophen no crescimento de amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> durante 72 horas de tratamento.	114
Figura 28: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da fragmentação do DNA de macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com VOSalophen (14 μ M) por 24 horas	117
Figura 29: Produção de EROs por macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> (A) e por macrófagos não infectados (B), tratados com VOSalophen por 24 horas e posteriormente marcados com H ₂ DCFDA.	119
Figura 30: Avaliação dos níveis de ON produzidos por macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> (A) e por macrófagos não infectados (B) e tratados com VOSalophen por 48 horas.	121
Figura 31: Avaliação do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> ao longo do tratamento com VOSalophen	124
Figura 32: Avaliação do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> , 3 dias após o fim do tratamento com VOSalophen	125
Figura 33: Avaliação do peso das patas de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> , 3 dias após o fim do tratamento com VOSalophen	126
Figura 34: Avaliação da carga parasitária nas patas de camundongos BALB/c infectados com <i>L. amazonensis</i> , 3 dias após o fim do tratamento com VOSalophen	127
Figura 35: Avaliação dos parâmetros de toxicidade hepática e renal após o tratamento com o VOSalophen	128
Figura 36: Proposta de mecanismo de ação de VOSalophen em formas promastigotas e amastigotas intracelulares e extracelulares de <i>L. amazonensis</i>	139

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química e nome dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos.	44
Tabela 2: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	71
Tabela 3: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	76
Tabela 4: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	78
Tabela 5: InSe dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	82
Tabela 6: InSe dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	83
Tabela 7: InEs dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	84
Tabela 8: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com VOSalophen (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas por meio da marcação com rodamina 123.....	92
Tabela 9: Efeito de VOSalophen , resveratrol 1 , miltefosina e anfotericina B sobre amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i>	115

LISTA DE ABREVIATURAS

LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
OMS	Organização Mundial da Saúde
LPG	Lipofosfoglicano
GIPLs	Glicosil inositol fosfolipídeos
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-13	Interleucina-13
IFN-γ	Interferon- γ
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α
IL-2	Interleucina-2
EROs	Espécies reativas do oxigênio
ON	Óxido Nítrico
Sb³⁺	Antimônio trivalente
Sb⁵⁺	Antimônio pentavalente
TR	Tripanotiona redutase
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	Ligantes Indutores de Apoptose Relacionados ao TNF
DISC	Complexo sinalizador e indutor de morte
Apaf-1	Fator 1 ativador de protease apoptótica
IAPs	Proteínas Inibidoras de Apoptose
AIF	Fator Indutor de Apoptose
CAD	DNase Ativada por Caspase

InSe	Índice de Seletividade
InEs	Índice de Especificidade
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de coração e cérebro)
SBF	Soro Bovino Fetal
°C	Graus Celsius
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
DMSO	Dimetilsulfóxido
HCl	Ácido Clorídrico
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (meio de cultura)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina tampão fosfato)
rpm	Rotações por minuto
CO₂	Dióxido de carbono
CI₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento do parasito
CC₅₀	Concentração que mata 50% das células
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (meio de cultura)
g	Força G
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone</i>
IV	Índice de Variação
H₂DCFDA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
FSC	<i>Forward Scatter</i>
PI	Iodeto de propídeo
MDC	Monodansilcadaverina
PA	Paraformaldeído
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
NO₂⁻	Nitrito
LPS	Lipopolissacarídeo
LDA	Ensaio de Diluição Limitante
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 O parasito <i>Leishmania</i>	17
1.2 Leishmaniose cutânea (LC)	21
1.3 Tratamento da LC	24
1.4 Mecanismos de morte celular em organismos multicelulares e em <i>Leishmania</i>	31
1.5 Resveratrol e complexos metálicos	35
2 OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Reagentes e Equipamentos	42
3.2 Compostos Sintéticos	43
3.3 Cultivo e manutenção da infectividade das cepas de <i>Leishmania</i> sp.....	46
3.4 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	47
3.5 Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.....	48
3.6 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp	49
3.7 Determinação do índice de seletividade (InSe) e do índice de especificidade (InEs) dos compostos.....	50
3.8 Avaliação da toxicidade do composto 11 (VOSalophen) em eritrócitos humanos.....	50
3.9 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	51
3.10 Determinação dos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROS) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	53
3.11 Avaliação do acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	53
3.12 Avaliação da morfologia e do tamanho de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	54
3.13 Avaliação do volume de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	54
3.14 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	55
3.15 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	56

3.16 Avaliação da fragmentação do DNA em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	56
3.17 Avaliação do ciclo celular de promastigotas em <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	58
3.18 Avaliação da formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	59
3.19 Avaliação ultraestrutural de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen)	59
3.20 Avaliação da reversibilidade do efeito do composto 11 (VOSalophen) na proliferação de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	60
3.21 Avaliação da infectividade de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto 11 (VOSalophen) e recuperados em meio de cultura fresco	60
3.22 Avaliação da toxicidade do composto 11 (VOSalophen) em amastigotas axênicos de <i>L. amazonensis</i>	61
3.23 Avaliação da fragmentação do DNA em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto 11 (VOSalophen)	62
3.24 Determinação dos níveis de EROs em macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com o composto 11 (VOSalophen)	63
3.25 Determinação dos níveis de óxido nítrico (ON) produzidos por macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratados com o composto 11 (VOSalophen)	64
3.26 Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> do composto 11 (VOSalophen)	65
3.27 Avaliação da toxicidade <i>in vivo</i> do composto 11 (VOSalophen)	67
3.28 Análise Estatística	67
3.29 Considerações Éticas	68
4 RESULTADOS	69
4.1 Parte I – Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> e da citotoxicidade em células de mamíferos de compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos	70
4.1.1 Efeito <i>in vitro</i> de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	70
4.1.2 Efeito <i>in vitro</i> de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	75
4.1.3 Efeito <i>in vitro</i> de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	76
4.1.4 Seletividade dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	81
4.1.5 Especificidade dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em <i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> e <i>L. major</i>	83

4.2 Parte II – Estudos complementares do efeito do VOSalophen em células de mamíferos e em formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	87
4.2.1 Efeito <i>in vitro</i> do composto VOSalophen em outras células de mamíferos: eritrócitos humanos e células Vero.....	87
4.2.2 Estudo <i>in vitro</i> do mecanismo de ação do composto VOSalophen em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	88
4.2.3 Estudo <i>in vitro</i> do mecanismo de ação do composto VOSalophen em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	113
4.3 Parte III – Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vivo</i> de VOSalophen em modelo de LC murina, causada por <i>L. amazonensis</i>	123
5 DISCUSSÃO	130
6 CONCLUSÕES	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
ANEXO I	159
APÊNDICE I	160
APÊNDICE II	161
APÊNDICE III	162

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um conjunto de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (OKWOR e UZONNA, 2016). Aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* são capazes de causar a doença em humanos (HASHIGUCHI et al., 2016), sendo que as manifestações clínicas dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como da resposta imune do hospedeiro, podendo variar desde infecções assintomáticas até duas principais síndromes clínicas, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV) (FEIJÓ et al., 2016).

A transmissão de ambas as manifestações clínicas ocorre por meio da picada de insetos vetores, genericamente denominados flebotomíneos, sendo que dois gêneros podem transmitir a doença para humanos, *Phlebotomus* no “Velho Mundo” e *Lutzomyia* no “Novo Mundo” (HASHIGUCHI et al., 2016). Esses insetos apresentam hábitos noturnos e são encontrados em regiões tropicais e subtropicais. As fêmeas são as responsáveis pela transmissão dessas doenças, pois se alimentam de sangue. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais dos parasitos *Leishmania* (STEBUT, 2015), entretanto esses protozoários apresentam diversos hospedeiros vertebrados reservatórios na natureza, como raposas, cães e roedores (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as leishmanioses como uma das doenças mais negligenciadas do mundo, afetando principalmente os países em desenvolvimento (WHO, 2010; DE MENEZES et al., 2015). Atualmente, acredita-se que essas doenças sejam encontradas em 98 países e territórios (RODRIGUES et al., 2015) e mais de um bilhão de pessoas vivam em áreas endêmicas. Nos últimos cinco anos, foram confirmados em todo o mundo um milhão de casos de LC. Com relação à LV, estima-se que ocorram 300.000 novos casos anuais e mais de 20.000 mortes a cada ano (WHO, 2017). Dentre as doenças parasitárias, as leishmanioses possuem o segundo maior índice de mortalidade, ficando atrás somente da malária (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011; SAVOIA, 2015).

1.1 O parasito *Leishmania*

Parasitas *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastidae, que compreende organismos que possuem uma única mitocôndria (FIDALGO e GILLE, 2011; FLORENTINO et al., 2014) e esta organela possui uma região dilatada, chamada cinetoplasto, onde está presente o kDNA (FIDALGO e GILLE, 2011). Além disso, estão inseridos na família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania*, o qual é dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*. Ainda, em virtude da complexidade do gênero *Leishmania*, cada subgênero é subdividido em complexos, e dentro de cada complexo, encontram-se várias espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem (WHO, 2010; CHOUHAN et al., 2015).

Durante o ciclo biológico, os parasitos do gênero *Leishmania* alternam entre duas formas evolutivas: os promastigotas e os amastigotas (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014; CARLSEN et al., 2015). Os promastigotas (Figura 1A) medem cerca de 10-20 μm de comprimento e possuem um flagelo externalizado, o que possibilita a motilidade dessas formas (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014). São extracelulares (CECÍLIO et al., 2014), possuem o corpo alongado (TRIPATHI e GUPTA, 2003) e habitam o trato digestivo dos insetos vetores (CECÍLIO et al., 2014). As formas amastigotas (Figura 1B) medem aproximadamente 3-7 μm de comprimento (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014), possuem flagelo não externalizado (NASCIMENTO, 2011) e apresentam corpo de formato esférico (TRIPATHI e GUPTA, 2003). São formas intracelulares obrigatórias (RODRÍGUEZ e WILSON, 2014), que estão presentes no hospedeiro vertebrado, vivendo no interior de vesículas fagolisossomais de macrófagos hospedeiros (VAN ASSCHE et al., 2011).

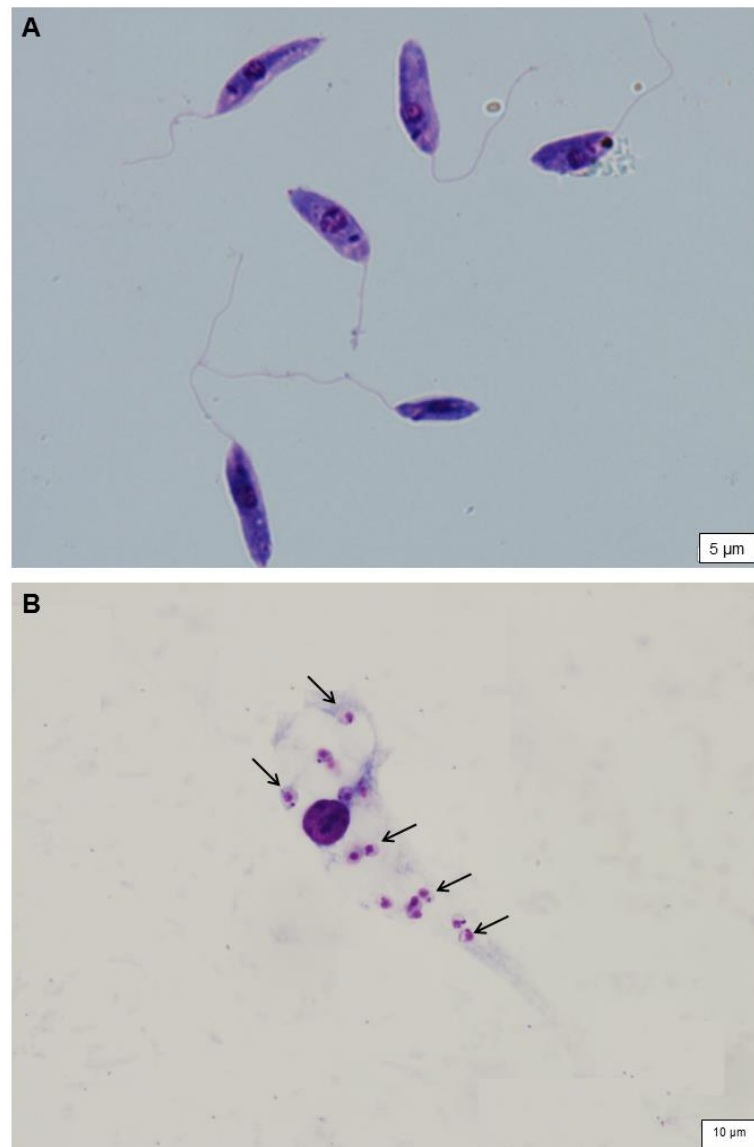


Figura 1: (A) Promastigotas de *Leishmania amazonensis*. (B) Macrófago infectado com amastigotas de *Leishmania amazonensis*. As setas indicam os amastigotas. Fonte: Do Autor.

Para qualquer espécie de *Leishmania* o ciclo biológico (Figura 2) ocorre de maneira similar, em que fêmeas de flebotomíneos infectadas com o parasito, ao picarem um hospedeiro vertebrado, injetam formas promastigotas na pele desses indivíduos (SCOTT e NOVAIS, 2016). Essas formas parasitárias são rapidamente internalizadas por células residentes no local da picada e por células recrutadas para este mesmo local, entretanto, os macrófagos constituem a população celular de maior importância para o desenvolvimento deste protozoário (CARLSEN et al., 2015).

O processo de internalização dos promastigotas pelos macrófagos ocorre por fagocitose (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015), sendo receptores para componentes do sistema complemento, receptores Fc, receptores de lectina e moléculas da família das integrinas, as principais estruturas presentes na membrana plasmática dos macrófagos que estão envolvidas na fagocitose desses parasitos. Para que o processo ocorra, essas estruturas interagem com moléculas presentes na superfície dos promastigotas, como gp63, lipofosfoglicano (LPG) e glicosil inositol fosfolipídeos (GIPLs). Nesse momento, o LPG é transferido para a membrana plasmática do macrófago, o que parece bloquear o processo de ativação desta célula hospedeira e conseqüentemente favorecer a entrada do parasito (DE MORAIS et al., 2015).

No interior dos fagolisossomos dos macrófagos, os promastigotas se diferenciam em amastigotas (DE MENEZES, SARAIVA e ROCHA-AZEVEDO, 2016; SCOTT e NOVAIS, 2016), sendo que após 24 horas de infecção, os parasitos estão completamente transformados em formas amastigotas (ZHANG e KIMA, 2016). Essas formas se multiplicam por divisão binária, até que o macrófago se rompa, liberando os amastigotas para infectar outras células (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015). Esses macrófagos infectados podem ser ingeridos por um inseto vetor, que se tornará, a partir de então, infectado. No trato digestivo dos flebotomíneos, os macrófagos se rompem liberando os amastigotas, que se transformam em promastigotas procíclicos. Estes se multiplicam, também por divisão binária, e passam por um processo de diferenciação denominado metaciclogênese. Este processo culmina com a formação de formas infectivas para o hospedeiro vertebrado, os promastigotas metacíclicos (LIÉVIN-LE MOAL e LOISEAU, 2016). O desenvolvimento do parasito no trato digestivo do inseto vetor tem duração média de 5 a 7 dias (NASCIMENTO, 2011), até que os promastigotas infectivos migram para a porção anterior do trato digestivo do inseto vetor e a partir daí podem ser inoculados em um hospedeiro mamífero, reiniciando o ciclo biológico do parasito (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015; LIÉVIN-LE MOAL e LOISEAU, 2016).

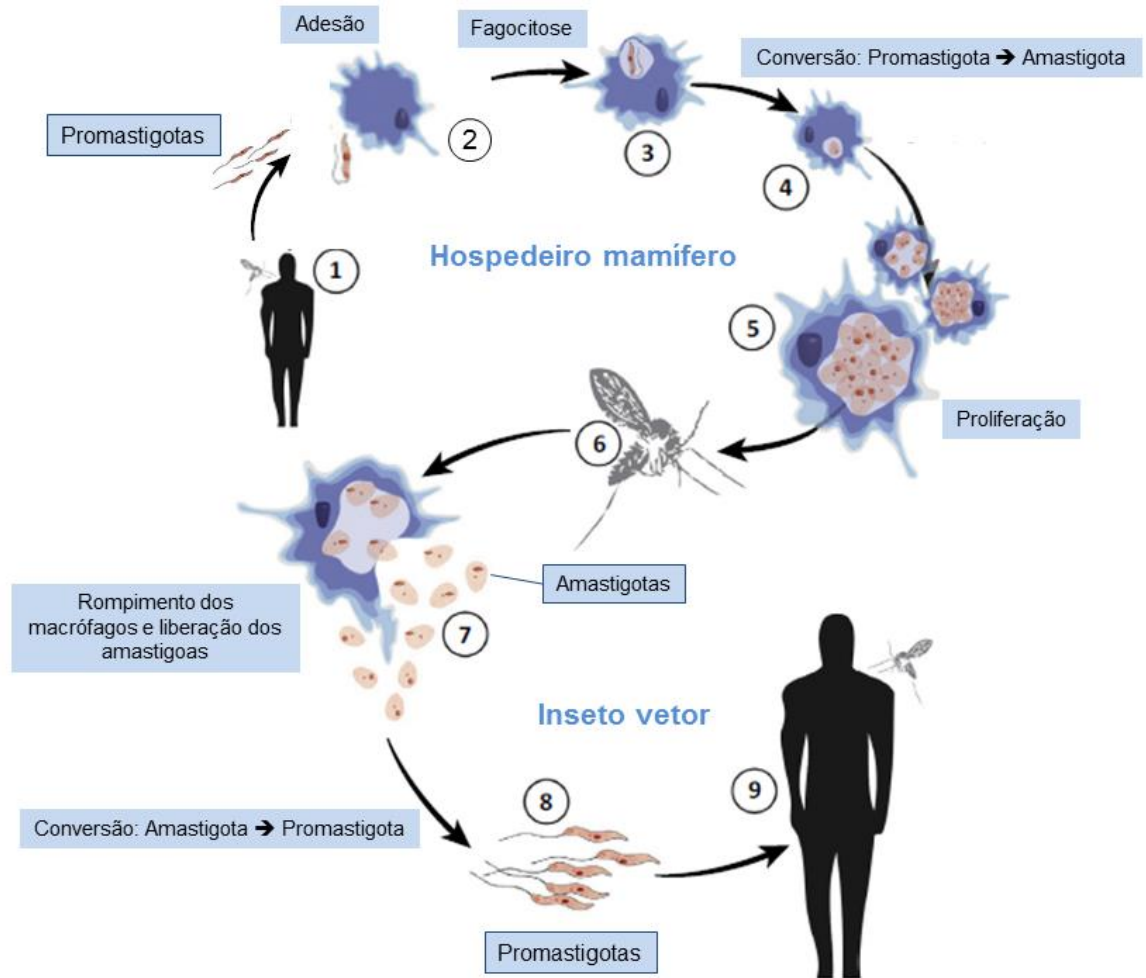


Figura 2: Ciclo biológico do parasito *Leishmania*. (1) um inseto vetor infectado realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado não infectado (como o homem, por exemplo) e inocula promastigotas de *Leishmania* na pele deste indivíduo; (2) os promastigotas são fagocitados por macrófagos; (3 e 4) os promastigotas se convertem em amastigotas; (5) os amastigotas se dividem, os macrófagos se rompem e os amastigotas infectam outros macrófagos; (6) um inseto vetor não infectado realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado e ingere os macrófagos contendo amastigotas; (7) no trato digestivo do inseto os macrófagos se rompem e liberam os amastigotas; (8) os amastigotas se transformam em promastigotas; (9) os promastigotas são inoculados em um mamífero, durante um novo repasto sanguíneo. Fonte: CANTACESSI et al., 2015 (adaptado).

A resposta imunológica durante as leishmanioses tem sido extensivamente estudada em modelo murino, utilizando-se principalmente a infecção por *Leishmania major*. Camundongos suscetíveis desenvolvem lesões progressivas e apresentam predominância de uma resposta imune do tipo Th2, com produção das citocinas interleucina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13. Camundongos resistentes desenvolvem lesões pequenas e com poucos parasitos, possuindo predominância de uma resposta imune do tipo Th1, com produção de interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α

(TNF- α) e IL-2 (SANTOS e BRODSKYN, 2014). As citocinas IFN- γ e TNF- α atuam sinergicamente para promover a ativação de macrófagos infectados (SCOTT e NOVAIS, 2016), estimulando a produção de óxido nítrico (ON) e de espécies reativas do oxigênio (EROs) (SANTOS e BRODSKYN, 2014), que são substâncias extremamente tóxicas e causam danos à biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, podendo ocasionar a morte dos parasitos intracelulares (KIMA, 2014). Inclusive, já foi anteriormente relatado a suscetibilidade de parasitos *Leishmania* a compostos doadores de ON e a diferentes EROs (VAN ASSCHE et al., 2011). Entretanto, vale destacar ainda que a resposta de *Leishmania* à presença de ON e EROs é variável e dependente da espécie envolvida. Além disso, o parasito já desenvolveu uma série de mecanismos que os permite escapar das propriedades microbicidas dos macrófagos (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015).

1.2 Leishmaniose cutânea (LC)

A LC é considerada pela OMS como “doença emergente e não controlada” (SAVOIA, 2015; VRIES, REEDIJK e SCHALLIG, 2015), que ocorre principalmente no litoral Mediterrâneo, nas Américas e na Ásia Ocidental (SAVOIA, 2015) (Figura 3). Mais de 70% do total de casos de LC ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria. No Brasil, em 2014 foram notificados 19.402 casos de LC e 70% da população brasileira encontrava-se em risco de infecção (WHO, 2016).

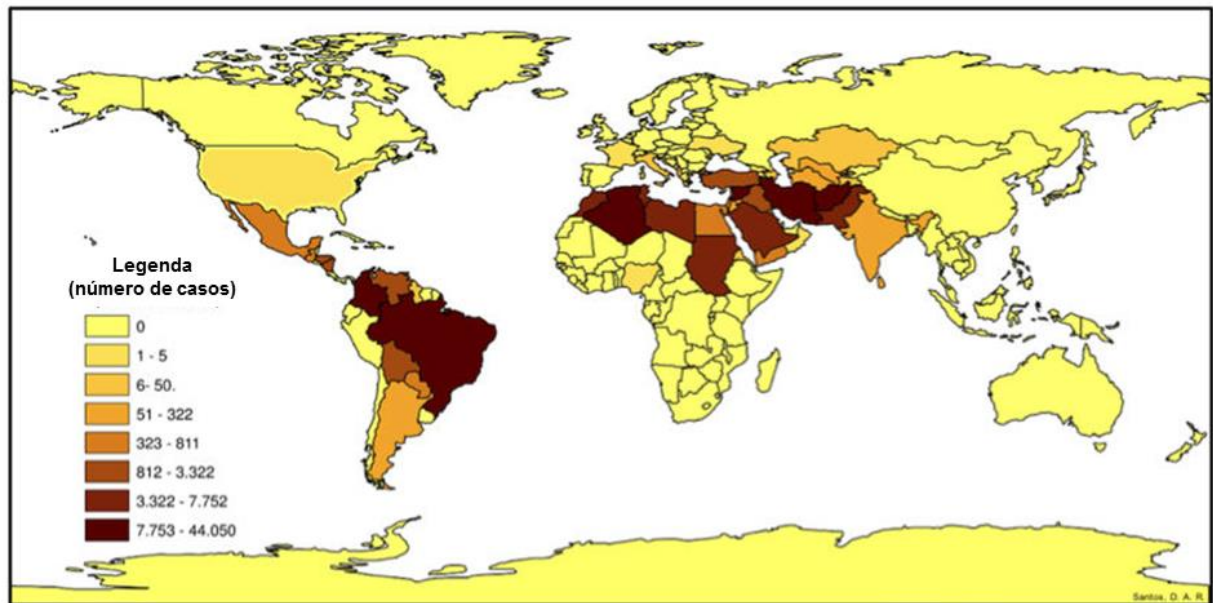


Figura 3: Distribuição mundial da LC nos últimos 10 anos. Fonte: AVERSI-FERREIRA et al., 2015 (adaptado).

A LC engloba um conjunto de enfermidades que acometem a pele e/ou mucosas do homem e de diferentes espécies de animais domésticos e silvestres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). É caracterizada por uma ampla variedade de manifestações clínicas, podendo ser dividida em: LC localizada, LC disseminada, LC difusa e LC mucosa (SANTOS e BRODSKYN, 2014; FEIJÓ et al., 2016; HASHIGUCHI et al., 2016).

A LC localizada é a forma mais comum, ocorrendo em cerca de 90% dos pacientes (STEBUT, 2015). Inicia-se com o desenvolvimento de um eritema no local da picada do inseto vetor, que evolui para o aparecimento de uma pápula e subsequente um nódulo. Esse nódulo pode sofrer um processo de ulceração, dando origem a uma lesão ulcerada clássica (MEARS et al., 2015). A lesão característica da LC apresenta pequeno número de parasitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) e ao longo do tempo pode evoluir para cura espontânea ou se desenvolver em diferentes graus de gravidade de ulceração (FEIJÓ et al., 2016). Pode haver o surgimento de uma única lesão ou várias lesões, dependendo do número de picadas infectantes do inseto vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O período de incubação varia, em média, de duas semanas a três meses (FEIJÓ et al., 2016).

A LC disseminada é caracterizada pela presença de numerosas e pequenas lesões acneiformes típicas, que frequentemente sofrem ulceração. Essas lesões parecem surgir simultaneamente ou secundariamente a uma lesão ulcerada de LC localizada (HASHIGUCHI et al., 2016), a partir de disseminação linfática ou hematogênica do parasito presente no local da picada do inseto vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O número de parasitos presentes nessas lesões é escasso (HASHIGUCHI et al., 2016). Acredita-se que menos de 2% dos pacientes com LC localizada desenvolvam a forma disseminada da doença (TURETZ et al., 2002; HASHIGUCHI et al., 2016). O número de lesões é variável, onde já foram relatados 0-300 lesões (TURETZ et al., 2002), 308 lesões (LAZO e HASHIGUCHI, 1994), 425 lesões (COUPPIE et al., 2004) e 749 lesões (SOUSA et al., 2006).

Com relação à LC difusa, pode-se dizer que se caracteriza pela presença de pápulas ou nódulos não ulcerados (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015), contendo um elevado número de parasitos (HANDLER et al., 2015). Usualmente, a doença começa com uma lesão primária e posteriormente dissemina, por via linfática ou hematogênica, para envolver outras áreas da pele (CHOI e LERNER, 2001). Eventualmente, os nódulos podem afetar quase toda a superfície cutânea do indivíduo, embora tenha uma predileção pela face, orelhas, cotovelos e joelhos (HANDLER et al., 2015). Pacientes com LC difusa apresentam uma anergia imunológica aos antígenos de *Leishmania* (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015), ou seja, não possuem resposta imune celular frente aos antígenos deste protozoário (SCOTT e NOVAIS, 2016) e, além disso, a resistência às terapias convencionais é extremamente comum (HANDLER et al., 2015). É uma doença rara (HASHIGUCHI et al., 2016), sendo que no Brasil, a incidência de LC difusa é de 2,4% (JIRMANUS et al, 2012).

A LC mucosa ocorre em cerca de 3-5% dos pacientes com LC e é associada com destruição da cavidade nasal e de tecidos orofaríngeanos (STEBUT, 2015; FEIJÓ et al., 2016). Existem evidências de uma associação entre a LC mucosa e um tratamento inadequado ou inexistente de lesão cutânea primária. Após dois a dez anos da ocorrência da infecção primária (STEBUT, 2015) ocorre migração do parasito, por via hematogênica ou linfática, da pele para as mucosas nasal e oral, o que ocasiona destruição de estruturas ali presentes e, conseqüentemente, completa desfiguração dos indivíduos infectados (HANDLER et al., 2015). O número de parasitos nos tecidos lesados é baixo (STEBUT, 2015), entretanto, ocorre o

desenvolvimento de uma resposta imune exacerbada, sendo este o fator que mais contribui para a patologia desta doença (SANTOS e BRODSKYN, 2014; SCOTT e NOVAIS, 2016). A LC mucosa pode inclusive levar à morte dos indivíduos infectados, pois causa dificuldades de deglutição e consequente caquexia (STEBUT, 2015).

É importante destacar que todas as formas clínicas da LC estão associadas ao surgimento de cicatrizes e/ou ao aparecimento de lesões desfigurantes, o que causam um sério estigma social aos indivíduos infectados (WHO, 2015).

Neste trabalho foram utilizadas três espécies de *Leishmania*, relacionadas à LC, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. As duas primeiras são consideradas as principais espécies patogênicas que causam a LC no Brasil (CARVALHO et al., 2012). A espécie *L. amazonensis* é agente etiológico da LC localizada, LC difusa (WHO, 2010; CARVALHO et al., 2012) e LC disseminada (WHO, 2010), podendo ser encontrada na América do Sul (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015), enquanto *L. braziliensis* está associada à ocorrência de LC localizada, LC mucosa (WHO, 2010; HANDLER et al., 2015; VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015) e LC disseminada (WHO, 2010), sendo encontrada na América do Sul e parte da América Central (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015). A espécie *L. major* está presente na Ásia Central, norte e leste da África e Oriente Médio (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015), podendo causar LC localizada, LC mucosa (WHO, 2010) e LC difusa (STEBUT, 2015).

1.3 Tratamento da LC

Atualmente, a quimioterapia é um dos tratamentos mais eficazes para a LC (RODRIGUES et al., 2014). É recomendado ser implantada em todas as formas desta doença, mesmo naquelas relacionadas à cura espontânea, pois tem o objetivo de acelerar a cura, reduzir o risco de formação de cicatrizes e prevenir a progressão da doença (AMEEN, 2010). Entretanto, a maioria dos medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento da LC está associada com significativa toxicidade e diversos efeitos colaterais. Além disso, a resistência dos parasitos às drogas disponíveis é um problema emergente no controle da LC (VRIES, REEDIJK e SCHALLIG, 2015).

Terapias locais e sistêmicas estão disponíveis para o tratamento da LC (STEBUT, 2015; DA SILVA et al., 2016). Entretanto, a escolha do tratamento

adequado deve ser feito com cautela e analisando-se a espécie de *Leishmania* envolvida e as características das lesões presentes. A terapia sistêmica é recomendada em casos complexos, que apresentam, pelo menos, uma das características a seguir: aparecimento de mais de três lesões; lesão única medindo mais de 40 mm de diâmetro; acometimento de áreas cosmeticamente e funcionalmente delicadas, como face, articulações e zonas muco-cutâneas; presença de inflamação dos vasos linfáticos e/ou dos linfonodos; ocorrência de lesões satélites ou presença de lesões recorrentes. Além disso, pacientes com LC disseminada, difusa e mucosa e indivíduos imunocomprometidos devem receber terapia sistêmica. Nos demais casos, considerados simples, bem como gestantes e indivíduos com contraindicações para o tratamento sistêmico, podem ser tratados com a quimioterapia local (STEBUT, 2015).

A quimioterapia de primeira escolha para tratar a maioria dos casos de LC se baseia na administração parenteral (intravenosa ou intramuscular) dos antimoniais pentavalentes, sendo que duas formulações estão disponíveis, antimoniato de meglumine, Glucantime[®] ou estibogluconato de sódio, Pentostam[®] (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; VRIES, REEDIJK e SCHALLIG, 2015). Estas drogas apresentam eficácia de cerca de 90%, entretanto, tem surgido evidências crescentes de eficácia variável, que depende da espécie de *Leishmania*, da região geográfica, da presença de cepas resistentes e dos esquemas terapêuticos empregados. Além disso, o longo tempo de tratamento e a alta frequência dos efeitos colaterais (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015), tais como cardiotoxicidade (arritmias, prolongamento do intervalo Q-T e morte súbita) (MCGWIRE e SATOSKAR, 2014), artralgia, anorexia, febre, urticária, e a significativa toxicidade para o fígado, os rins e o baço, têm contribuído para o uso limitado destes medicamentos na prática clínica (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). É válido ainda destacar que é necessária hospitalização e constante monitoramento dos pacientes em tratamento com estes compostos (DE MENEZES et al., 2015). A dose recomendada é de 15-20 mg/Kg/dia durante um período de 20 dias, para LC localizada e disseminada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; DE MENEZES et al., 2015; RAJASEKARAN e CHEN, 2015), 20 mg/Kg/dia por 20 dias para LC difusa e 20 mg/Kg/dia por 30 dias para LC mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), pelas vias intravenosa ou intramuscular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; DE MENEZES et al., 2015; RAJASEKARAN e CHEN, 2015). Entretanto, também tem sido demonstrada a eficácia da

administração intralesional de compostos a base de antimônio pentavalente (DA SILVA et al., 2016), principalmente em infecções causadas por *L. major*, *L. tropica* e *L. braziliensis*. Nesse caso, a dose recomendada é de 0,5 a 3 mL, 1-3 vezes por semana, durante 4-5 semanas (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

Apesar da antiga utilização dos antimoniais pentavalentes para o tratamento da LC, o mecanismo de ação destes compostos em *Leishmania* ainda não foi completamente esclarecido. Na realidade, ainda não se sabe se a forma ativa é o antimônio pentavalente (Sb^{+5}) ou o antimônio trivalente (Sb^{+3}), e por esse motivo, três modelos de mecanismo de ação são propostos: (1) modelo de pró-droga, (2) modelo de atividade leishmanicida intrínseca e (3) modelo de ativação do sistema imune do hospedeiro (HALDAR, SEN e ROY, 2011). O primeiro modelo está relacionado ao fato de que compostos a base de Sb^{+5} funcionam como pró-droga, em que o Sb^{+5} sofre redução a uma forma mais ativa contra o parasito, o Sb^{+3} (HALDAR, SEN e ROY, 2011; DE MORAIS et al., 2015), sendo que esta redução parece acontecer dentro dos macrófagos (DE MORAIS et al., 2015). Tal fato explica porque amastigotas são suscetíveis à ação do Sb^{+5} , enquanto promastigotas possuem baixa suscetibilidade (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Este modelo de pró-droga tem sido reforçado por estudos em que foi constatada a presença de compostos de Sb^{+3} em soros de pacientes tratados com Glucantime® (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004). Parece que o Sb^{+3} atua inibindo a enzima tripanotiona redutase (TR), o que acarretará um estresse oxidativo e consequente morte dos parasitos (SINGH e SUNDAR, 2014; DE MORAIS et al., 2015). De acordo com a segunda hipótese relacionada ao efeito dos antimoniais em *Leishmania*, o Sb^{+5} possui uma atividade leishmanicida própria, por meio da inibição da glicólise e da betaoxidação de ácidos graxos. Além disso, acredita-se que Sb^{+5} inibe especificamente a enzima DNA topoisomerase tipo I, impedindo a replicação do DNA dos parasitos. O terceiro modelo de mecanismo de ação dos antimoniais em *Leishmania* consiste na ativação do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado e consequente morte dos parasitos (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Neste último modelo, acredita-se que os antimoniais possam ativar tanto mecanismos da imunidade inata, como da resposta imune adaptativa (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Com relação à imunidade inata, foi demonstrado que os antimoniais podem induzir a produção de ON e EROs por macrófagos murinos infectados com amastigotas de *L. donovani* e consequentemente promover a morte desses parasitos (MOOKERJEE

BASU et al., 2006). Quanto à imunidade adaptativa, estudos em modelo murino de LV têm mostrado que uma população de células Th1 é requerida para que os antimoniais exerçam efeito leishmanicida curativo (MURRAY et al., 1989).

Na impossibilidade de utilização dos compostos a base de antimônio, drogas de segunda escolha podem ser utilizadas, como anfotericina B, pentamidina, paromomicina e miltefosina (DE MORAIS et al., 2015). A estrutura química desses compostos, bem como dos antimoniais pentavalentes estão apresentadas na Figura 4.

A anfotericina B é um antifúngico poliênico (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015) que pode ser usado, por via parenteral, para o tratamento da LC (BARBOSA et al., 2015; VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015), pois é efetiva em diferentes espécies de *Leishmania*. Este medicamento apresenta eficácia acima de 90% (DE MENEZES et al., 2015), entretanto, assim como os antimoniais, a anfotericina B possui elevada toxicidade, podendo causar nefrotoxicidade, alterações cardíacas, hemólise, danos hepáticos, náuseas e febre (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015), o que requer hospitalização do paciente (RAJASEKARAN e CHEN, 2015). A dose recomendada é de 1 mg/Kg/dia, durante 15 a 20 dias, diariamente ou em dias alternados, por via intravenosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014; DE MENEZES et al., 2015; RAJASEKARAN e CHEN, 2015), podendo se estender um pouco mais em casos de LC mucosa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O efeito leishmanicida da anfotericina B é atribuído à sua ligação ao ergosterol presente na membrana plasmática do parasito, causando uma desorganização estrutural e criando poros na membrana celular, o que ocasiona um desequilíbrio iônico e a consequente morte dos protozoários (BARBOSA et al., 2015; DE MORAIS et al., 2015).

No intuito de reduzir a toxicidade da anfotericina B, foram desenvolvidas formulações lipídicas desses medicamentos, como, AmBisome®, uma formulação lipossomal; Amphocil®, uma dispersão coloidal e Abelcet®, um complexo lipídico. Essas formulações podem ser utilizadas para o tratamento da LC e apresentam menor toxicidade ao indivíduo, quando comparado à anfotericina B não lipossomal, entretanto, possuem custo elevado, o que limita a utilização (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015).

A pentamidina, outra droga leishmanicida de administração intravenosa ou intramuscular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014), tem apresentado resultados favoráveis no índice de cura da LC, entretanto, esta eficácia tem se apresentado

variável, de acordo com a localização geográfica e as espécies envolvidas (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Além disso, a utilização da pentamidina também é inadequada como tratamento de primeira linha devido à sua elevada toxicidade (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015), podendo causar hiperglicemia, como resultado de dano pancreático e ainda, hipotensão, taquicardia (DE MENEZES et al., 2015), nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015). A dose recomendada é de 4 mg/Kg/dia, em dias alternados, com um total de 3 a 10 doses, o que varia de acordo com a espécie envolvida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Acredita-se que a pentamidina atue causando danos irreversíveis à mitocôndria, ao cinetoplasto e ao DNA dos parasitos (BARBOSA et al., 2015).

A paromomicina, em sua forma injetável, foi registrada em 2006 para tratar a LV na Índia (SINHA et al., 2011). No Brasil, a administração intramuscular de paromomicina, durante 14 dias, atingiu um índice de cura de mais de 90% no tratamento de LC, entretanto, em outras regiões a utilização deste medicamento tem apresentado baixa eficácia para tratar a LC, por isso é necessário a realização de mais estudos no intuito de determinar, com precisão, a eficácia da paromomicina e avaliar a sua utilização como uma alternativa de tratamento dessas doenças (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Além disso, este medicamento pode causar nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e ototoxicidade (DE MENEZES et al., 2015). A dose recomendada de paromomicina é de 15 mg/Kg/dia, durante 21 dias, pela via intramuscular (RAJASEKARAN e CHEN, 2015), entretanto, para casos menos complicados de LC, pode-se utilizar formulações contendo 15% de paromomicina, pela via tópica (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015). Acredita-se que a paromomicina atue inibindo a síntese de proteínas e alterando a permeabilidade da membrana plasmática do parasito. Além disso, tem-se mostrado que a mitocôndria também constitui um importante alvo desta droga (MALTEZOU, 2010), visto que a paromomicina causou diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de *L. donovani* (SINGH e SUNDAR, 2014).

A miltefosina, um composto com propriedade antitumoral (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015), foi a primeira medicação oral disponível para o tratamento das leishmanioses (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015). Foi primeiramente aprovada na Índia para o tratamento da LV, no ano de 2002 (DORLO et al., 2012) e durante a década passada até os dias atuais, tem sido utilizada em 14 países para o tratamento da LV e LC (VAKIL, FUJINAMI e SHAH, 2015). Entretanto, a eficácia da

miltefosina no tratamento de LC parece ser dependente da espécie de *Leishmania* envolvida, e inclusive apresenta variações dentro de uma mesma espécie (COELHO et al., 2016a). Em modelo murino, por exemplo, ocorreu recidiva da doença após o tratamento, com miltefosina, de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (COELHO et al., 2016b) e *L. braziliensis* (COELHO et al., 2016a). Morais-Teixeira et al. (2011) mostraram que para *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. chagasi*, espécies de *Leishmania* presentes no Brasil, a miltefosina tem apresentado baixo efeito, podendo-se esperar que altas doses deste composto seriam necessárias para tratar pacientes infectados com essas espécies, quando comparado ao efeito da miltefosina em *L. donovani*, espécie encontrada no “Velho Mundo”. Além disso, a miltefosina possui uma série de efeitos adversos gastrintestinais, como enjôo, náuseas, vômitos, diarreia (KEVRIC, CAPPEL e KEELING, 2015) e tem mostrado ser teratogênica, não sendo, portanto recomendada a sua utilização por mulheres grávidas ou em idade fértil (GODINHO et al., 2012). A dose recomendada de miltefosina é de 100 a 150 mg/dia, durante 28 dias, pela via oral (DE MENEZES et al., 2015). Parece que a miltefosina causa perturbações no metabolismo lipídico de *Leishmania*, inibe a enzima citocromo C-oxidase deste parasito, causando danos mitocondriais, exerce um efeito imunomodulatório em células infectadas com amastigotas do protozoário (DORLO et al., 2012) e induz morte celular por apoptose-like em promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (MARINHO et al., 2011; DORLO et al., 2012).

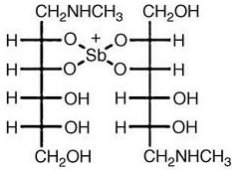
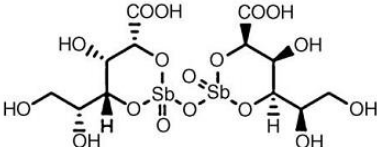
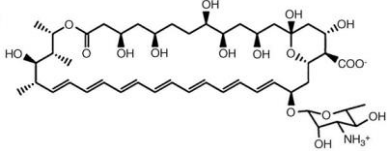
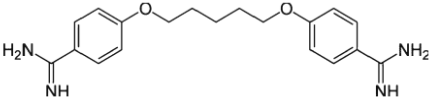
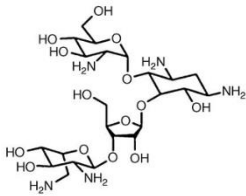
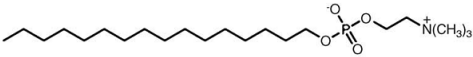
Nome	Estrutura
<p align="center">Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)</p>	
<p align="center">Estibogluconato de sódio (Pentostam®)</p>	
<p align="center">Anfotericina B (Anforicin B®, Fungizon®, Funtex B®, AmBisome®, Amphocil®, Abelcet®)</p>	
<p align="center">Pentamidina (Pentacarinat®, Fauldpenta®, NebuPent®, Pentam-300®)</p>	
<p align="center">Paromomicina (Humatin®)</p>	
<p align="center">Miltefosina (Impavido®, Miltex®, Milteforan®)</p>	

Figura 4: Estrutura química e alguns nomes comerciais das principais drogas usadas para o tratamento da LC. Fonte: NAVARRO et al., 2010 (adaptado).

1.4 Mecanismos de morte celular em organismos multicelulares e em *Leishmania*

Em organismos multicelulares existem três tipos principais de morte celular, necrose, autofagia e apoptose, sendo que cada um desses tipos possui características morfológicas e bioquímicas distintas (RIBEIRO, 2011). Todos estes processos são muito melhor descritos em metazoários do que em protozoários.

A necrose é um tipo de morte celular classicamente considerada como não regulada e definida como uma morte celular prematura, sem a ocorrência de marcadores morfológicos e moleculares de autofagia ou apoptose (GALLUZZI et al., 2012; PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Acredita-se que este tipo de morte celular possa ocorrer em todos os tipos celulares (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Este processo é caracterizado pela ocorrência de inchaço da célula e das organelas celulares, como o retículo endoplasmático, lisossomos e mitocôndria (ELMORE, 2007), disfunção mitocondrial (JAIN et al., 2013), ruptura da mitocôndria, dos lisossomos e da membrana plasmática da célula. Esta perda de integridade da membrana plasmática resulta em liberação do conteúdo citoplasmático, enviando sinais quimiostáticos, com recrutamento de células inflamatórias (ELMORE, 2007), e por este motivo esta forma de morte celular resulta em resposta inflamatória com injúria tecidual aguda (SMIRLIS et al., 2010). Contudo, hoje já se sabe que a necrose também pode ocorrer de maneira regulada, sendo, portanto chamada de necrose regulada ou necroptose (GALLUZZI et al., 2012). Este processo envolve sinalização através de receptor de morte e inibição de caspases, culminando na morte celular com a presença de características de células necróticas (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Este tipo de morte celular também já foi descrito em *Leishmania*, por exemplo, Ardestani et al. (2012) mostraram que compostos derivados de tiadiazóis causaram morte celular característica de necrose em formas promastigotas de *L. major*. Entretanto, poucos trabalhos têm mostrado este tipo de morte celular em *Leishmania*.

A autofagia constitui um tipo de morte celular regulada, entretanto, na maioria dos casos, este processo é uma resposta cito protetiva, ativada em células que estão sofrendo algum estresse, ou seja, é uma forma de autoproteção celular (GALLUZZI et al., 2012; PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Durante este processo, a célula recicla os seus componentes intracelulares. Quando a autofagia é

induzida, ocorre a formação de uma dupla membrana ao redor do conteúdo celular que se deseja reciclar, resultando na formação de uma estrutura denominada autofagossomo. Em seguida, ocorre a fusão do autofagossomo ao lisossomo, originando o autofagolisossomo, e no interior desta estrutura, o conteúdo celular é reciclado em componentes reutilizáveis, através da ação de hidrolases ácidas lisossomais (KIEL, 2010; JAIN et al., 2013). Os metabólitos gerados por este processo de degradação são liberados no citosol para que entrem novamente no processo metabólico celular (JAIN et al., 2013). Uma característica deste tipo de morte celular é a ocorrência de maciça vacuolização autofágica no citoplasma da célula (SMIRLIS et al., 2010; GALLUZZI et al., 2012). Em *Leishmania*, já foi descrito que este processo não somente pode acontecer, como também é essencial durante a diferenciação de promastigotas procíclicos em metacíclicos, no inseto vetor, assim como no processo de conversão de promastigotas metacíclicos em amastigotas, no hospedeiro mamífero (BESTEIRO et al., 2006; KIEL, 2010). Foi também demonstrado que o composto partenolide, um sesquiterpeno purificado da planta *Tanacetum parthenium*, induziu morte celular autofágica em amastigotas axênicos de *L. amazonensis* (TIUMAN et al., 2014) e Bera et al. (2003) mostraram que peptídeos antimicrobianos causaram morte por autofagia em *L. donovani*.

A apoptose é um tipo de morte celular regulada, pois as células morrem através de um processo de morte programada e com gasto de energia (ELMORE, 2007). Existem duas principais vias apoptóticas: via extrínseca ou mediada por receptor e via intrínseca ou mitocondrial (CARMEN e SINAI, 2007).

A via extrínseca, para que ocorra, exige o engajamento entre receptores de morte encontrados na superfície das membranas celulares e seus respectivos ligantes (INDRAN et al., 2011). Esses receptores de morte pertencem à família do receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF) como, Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral (TNFR1), CD95 (Fas) e receptores de Ligantes Indutores de Apoptose Relacionados ao TNF (TRAIL) (ANDERA, 2009; INDRAN et al., 2011). Esses receptores possuem um domínio extracelular, que interage com os ligantes e um domínio intracelular, também denominado domínio de morte, que é responsável pela transmissão dos sinais de morte da superfície da célula para o meio intracelular. A ativação de qualquer um desses receptores leva ao recrutamento de proteínas para dentro de um complexo sinalizador e indutor de morte (DISC) e este ativa uma caspase iniciadora, a caspase 8. Esta protease, uma vez ativada, desencadeia a

fase de execução de apoptose, através da ativação da caspase 3, uma caspase executora (INDRAN et al., 2011).

A via intrínseca ocorre de maneira independente de receptor, mas pode ser ativado por uma variedade de estímulos, que provocam alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial interna, o que ocasiona a perda do $\Delta\Psi_m$ e liberação de proteínas pró-apoptóticas a partir da mitocôndria. Essas proteínas que são liberadas da mitocôndria podem pertencer a dois grupos. O primeiro grupo consiste em Citocromo C, Smac/DIABLO e HtrA2/Omi. Citocromo C liga e ativa o Fator 1 ativador de protease apoptótica (Apaf-1) e se liga também à procaspase 9, formando um complexo chamado “apoptossomo”. A formação do mesmo leva à ativação da procaspase 9 em caspase 9, o que desencadeia a ativação da caspase 3. As proteínas Smac/DIABLO e HtrA2/Omi inibem as Proteínas Inibidoras de Apoptose (IAPs) e com isso permitem a continuação de tal processo. O segundo grupo de proteínas consiste em Fator Indutor de Apoptose (AIF), endonuclease G e DNase Ativada por Caspase (CAD), que são proteínas pró-apoptóticas e são liberadas como parte de um evento final de apoptose. AIF e endonuclease G se translocam para o núcleo e causam fragmentação de DNA. CAD também se transloca para o núcleo, onde é clivada pela caspase 3 e com isso, também se torna capaz de causar fragmentação de DNA (ELMORE, 2007).

As vias extrínseca e intrínseca diferem entre si, mas culminam em um mesmo ponto, que é a ativação de caspases executoras (caspases 3, 6 e 7) por caspases iniciadoras (caspases 8 e 9). A caspase 3 é considerada a caspase executora de maior importância e a ativação da mesma desencadeia a ativação de endonucleases e proteases, responsáveis pelo processo de degradação observado durante a apoptose. É ainda a caspase 3 responsável pela desintegração da célula em corpos apoptóticos (ELMORE, 2007). As caspases, uma vez ativadas, clivam filamentos de actina, o que causa rompimento do citoesqueleto. Tal fato pode contribuir com o processo de arredondamento e retração celular observados durante a apoptose (ELMORE, 2007; RIBEIRO, 2011).

De maneira geral, várias horas são necessárias desde o início do processo de morte celular até a fragmentação final da célula, sendo que a ordem de ocorrência dos eventos varia de acordo com o tipo celular, com o estímulo desencadeador e com a via apoptótica desencadeada (ZIEGLER e GROSCURTH, 2004; RIBEIRO, 2011).

Em organismos multicelulares, a apoptose é um processo essencial, pois o seu desenvolvimento e homeostase são dependentes de extensa renovação celular (WANDERLEY et al., 2005). Em meados da década de 1990 foi descoberto que parasitos protozoários, como *Leishmania* e *Trypanosoma* podem sofrer morte celular caracterizada pela ocorrência de fatores que acontecem durante a apoptose em células de mamíferos (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Nesses parasitos, assim como ocorre em mamíferos, a apoptose é caracterizada pela geração de EROs, alteração no $\Delta\Psi_m$, exposição de fosfatidilserina na parte externa da membrana plasmática, fragmentação do DNA (GANNAVARAM e DEBRABANT, 2012), diminuição do volume da célula (retração celular), arredondamento celular e manutenção da integridade da membrana plasmática da célula (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013).

A morte por apoptose em *Leishmania* tem sido associada a vários eventos relacionados ao parasito ou à interação-parasito hospedeiro. É curioso ressaltar, por exemplo, que tem sido detectada a ocorrência de externalização de fosfatidilserina em neutrófilos infectados com *Leishmania*, o que sinaliza para fagócitos a necessidade de ser fagocitado e com isso evita a ativação de uma resposta inflamatória (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013).

Alguns trabalhos também tem associado morte por apoptose em *Leishmania* após tratamento com diferentes compostos. Por exemplo, foi demonstrado que miltefosina induz morte por apoptose em promastigotas de *L. amazonensis* (MARINHO et al., 2011) e em promastigotas e amastigotas derivados de lesão de *L. donovani* (VERMA e DEY, 2004). Sen et al. (2007) demonstraram que a artemisinina causou morte celular apoptótica de promastigotas de *L. donovani*. Sardar et al. (2013) mostraram que a Spinigerina induziu apoptose em promastigotas de *L. donovani* e Dutta et al. (2007) descreveram que o efeito do racemosídeo A, uma saponina esteroideal natural, em promastigotas de *L. donovani* foi mediado por apoptose.

Apesar da apoptose em organismos unicelulares poder ser iniciada por uma variedade de condições de estresse e as características morfológicas serem similares às que ocorrem em organismos multicelulares, a maior parte da maquinaria molecular de unicelulares parece diferir da maquinaria de multicelulares. Por exemplo, os genes para codificar as caspases só estão presentes em metazoários. Portanto, sabe-se que *Leishmania* não é capaz de produzir caspases, entretanto,

sabe-se que codificam familiares próximos dessas proteases, as metacaspases, assim como outros eucariotas não mamíferos. Além disso, tem sido sugerido que as metacaspases podem realizar papéis biológicos funcionalmente análogos àqueles exercidos pelas caspases em metazoários (KACZANOWSKI, SAJID e REECE, 2011). Em virtude dessas possíveis diferenças entre o processo apoptótico em metazoários e protozoários, Kaczanowski, Sajid e Reece (2011) sugeriram um mecanismo putativo para a ocorrência de apoptose na maioria dos protozoários parasitas. De acordo com os autores, nesses organismos a apoptose é induzida por proteases da família das caspases e a execução do processo exige a liberação de endonuclease G e AIF da mitocôndria. As proteases de cisteína, semelhantes às caspases, cortam moléculas e a fragmentação do DNA é provocada pelas DNases, Zen1 e endonuclease G. Além disto, discute-se a presença de fosfatidilserina na membrana plasmática de *Leishmania* e, com isto, o uso clássico de marcadores deste fosfolípídeo, como a anexina (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013). Devido à estas diferenças, alguns autores têm preferido usar, em *Leishmania*, a terminologia "apoptose-like", e esta será a adotada neste trabalho.

1.5 Resveratrol e complexos metálicos

O resveratrol, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (Figura 5), é um composto polifenólico encontrado principalmente nas cascas de uvas vermelhas, amendoim e amoras (DIAZ et al., 2016), e apresenta-se em concentrações relativamente elevadas no vinho tinto (0,1-14,3 mg/L) (SHANG *et al.*, 2009). Esta substância tem recebido considerável destaque na última década, em virtude das suas múltiplas atividades biológicas (DIAZ et al., 2016), dentre as quais pode-se destacar a atividade antioxidante (LEONARD et al., 2003; DIAZ et al., 2016), anti-inflamatória (DIAZ et al., 2016) e cardioprotetora (FRANKEL, WATERHOUSE e KINSELLA, 1993; LU e SERRERO, 1999). Além disso, este composto tem também apresentado efeito antitumoral, pois possui a habilidade de suprimir a proliferação de uma ampla variedade de células tumorais, incluindo tumores de mama, próstata, estômago, cólon, pâncreas, tireóide, melanoma, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, carcinoma de ovário e carcinoma cervical (AGGARWAL et al., 2004). Tem sido também atribuído ao resveratrol o papel antimetastático, inibindo a migração e invasão de células tumorais (DERMANI et al., 2016; KIM, HWANG e CHOI, 2016).

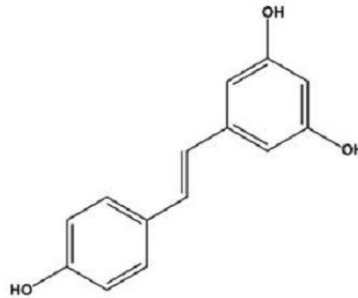


Figura 5: Estrutura química do resveratrol. Fonte: SON et al., 2007

Além dessas propriedades farmacológicas, o resveratrol tem mostrado atividade em diferentes microorganismos, incluindo fungos (JUNG et al., 2005), bactérias (CHAN, 2002) e vírus (DOCHERTY et al., 1999). Além disso, apresentou efeito antiparasitário em *Trichinella spiralis* (OZKOC et al., 2009), *Trypanosoma evansi* (NYUNT et al., 2012) e *Plasmodium falciparum* (SON et al., 2007).

O resveratrol também tem se mostrado efetivo em diferentes espécies de *Leishmania*. Kedzierski et al. (2007) demonstraram o efeito do resveratrol em *L. major*. Para promastigotas, foi obtida uma concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI_{50}) de 45 $\mu\text{g/ml}$ (196,9 μM), após 48 horas de tratamento. Para formas amastigotas houve redução do número de macrófagos infectados com *L. major* após o mesmo tempo de tratamento, nas concentrações de 20, 40 e 45 $\mu\text{g/mL}$. Ainda com relação à *L. major*, Lucas e Kolodziej (2013) mostraram que o resveratrol apresentou moderada atividade em formas promastigotas e significativo efeito em amastigotas intracelulares. Em *L. amazonensis*, foi demonstrado que o resveratrol foi efetivo tanto em formas promastigotas, quanto em amastigotas intracelulares (FERREIRA et al., 2014; MONZOTE et al., 2016). Em *L. tarentolae* o resveratrol foi efetivo em promastigotas, com CI_{50} de 79,8 μM (MONZOTE et al., 2016). Além disso, Tolomeo et al. (2013) avaliaram o mecanismo de ação de um derivado de estilbeno em *L. infantum* e verificaram que a morte dos parasitos foi compatível com apoptose-like.

Com relação à toxicidade do resveratrol, Kedzierski et al. (2007) mostraram que este composto não apresentou toxicidade em macrófagos não infectados até a concentração de 45 $\mu\text{g/mL}$ (196,9 μM), após 48 horas de tratamento. De acordo com

esses dados, Ferreira et al. (2014) verificaram que, o tratamento de 24 horas com 100 e 600 μM de resveratrol, não causou alterações em macrófagos peritoneais murinos. Além disso, foi mostrado que o resveratrol é seguro e bem tolerado, em doses de até 5 g/dia em seres humanos (PATEL et al., 2011; CARUANA, CAUCHI e VASSALLO, 2016). Em contraste, Lucas e Kolodziej (2013) demonstraram que o resveratrol foi tóxico para macrófagos, com um CI_{50} de 16,3 $\mu\text{g/mL}$ (71,6 μM) após 48 horas de incubação.

Além do resveratrol, compostos contendo íons metálicos também tem atraído especial interesse. Esses compostos têm sido utilizados na medicina desde tempos antigos, entretanto, o uso era restrito à quimioterapia antitumoral, com a utilização de compostos contendo platina (BENÍTEZ et al., 2011, CRAIG et al., 2012). Atualmente, já se sabe que compostos contendo diferentes metais também apresentam efeito antitumoral, como complexos de cobre (SAINI et al., 2016; ZHANG et al., 2016), de níquel (RAUF et al., 2015), de rutênio (MORRIS et al., 2001), dentre outros.

Mais recentemente, os complexos metálicos têm sido explorados para diversos fins terapêuticos, incluindo a terapia antiparasitária (CABALLERO et al., 2014). Saad et al. (2015) demonstraram que nanopartículas de cobre causaram significativa redução da viabilidade de cistos de *Entamoeba histolytica* e nanopartículas contendo prata reduziram significativamente a viabilidade de oocistos de *Cryptosporidium parvum*. Com relação ao efeito de complexos metálicos em *Leishmania*, foi demonstrado que complexos de platina possuem atividade leishmanicida (NAVARRO et al., 2010; CARMO et al. 2011).

Compostos contendo ouro apresentaram significativa atividade antitumoral em linhagens celulares de câncer de cólon e de melanoma metastático (CHAVES et al., 2016). Em *Leishmania*, complexos de ouro apresentaram significante efeito em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum* (PALOQUE et al., 2015; CHAVES et al., 2016), bem como em promastigotas de *L. braziliensis* (CHAVES et al., 2016). Além disso, foi mostrado por Colotti et al. (2013) que compostos com ouro são potentes inibidores da enzima tripanotiona redutase de *L. infantum*.

Moléculas complexadas a vanádio também tem apresentado efeito antitumoral em linhagem celular de câncer de pulmão, sendo que este efeito está relacionado à indução de estresse oxidativo (MEDINA et al., 2017). Compostos

contendo o metal vanádio apresentaram efeito leishmanicida em *L. tarentolae*, espécie de *Leishmania* que infecta répteis (CHRISTENSEN et al., 2016). Em espécies de *Leishmania* capazes de infectar o homem, também já foi demonstrado o efeito de complexos de vanádio. Adriazola et al. (2014), por exemplo, mostraram que um complexo de vanádio apresentou significativo efeito em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, enquanto Benítez et al. (2013) verificaram a efetividade de um composto contendo vanádio em promastigotas de *L. major*, e associaram este efeito à capacidade de interação desta molécula com o DNA do parasito. Além disso, também foi demonstrado significativo efeito do tratamento, com complexos de vanádio, de camundongos infectados com *L. major* e *L. donovani*. Foi relatado que esses tratamentos reduziram a carga parasitária dos animais infectados, bem como reduziram o processo patológico relacionado às leishmanioses (MATTE et al., 2000).

Finalizando, é possível perceber que a LC é um complexo de doenças de importância clínica e epidemiológica e o tratamento da mesma é marcado por uma série de dificuldades. Tendo isto em vista e considerando as importantes atividades biológicas apresentadas pelo resveratrol, bem como por compostos complexados a metais, este trabalho avaliou o efeito leishmanicida de doze compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos (complexos de ouro e vanádio) em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, além de ter sido avaliada a toxicidade em células de mamíferos. Em seguida, foi selecionado um composto efetivo e seletivo em ambas as formas do parasito, no intuito de estudar *in vitro* o mecanismo de morte causado pelo tratamento, bem como avaliar sua atividade leishmanicida *in vivo* em modelo experimental murino de LC.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos citotóxicos, *in vitro*, de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos, em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp. e em células de mamíferos. Selecionar o composto mais efetivo e seletivo em *Leishmania* sp, para avaliar seu mecanismo de ação anti-protozoária *in vitro* e seu efeito leishmanicida *in vivo*.

2.2 Objetivos específicos

Em relação aos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos:

- Avaliar o efeito de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, bem como em células de mamíferos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Avaliar a relação entre estrutura e atividade dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos;
- Determinar a seletividade dos compostos sobre promastigotas e amastigotas intracelulares em relação à célula hospedeira, bem como a especificidade dos compostos sobre os diferentes estágios do parasito;
- Selecionar um composto efetivo e seletivo em *Leishmania* sp. e que possua síntese financeiramente acessível.

Em relação ao composto selecionado:

- Complementar os estudos de toxicidade em células de mamíferos, utilizando outra linhagem celular, eritrócitos humanos;
- Avaliar o mecanismo envolvido na morte de promastigotas de *Leishmania*: (1) apoptose-like, (2) necrose ou (3) autofagia; por meio da análise dos seguintes

parâmetros: ultraestrutura, $\Delta\Psi_m$, produção de EROs, acúmulo de corpos lipídicos, aspecto morfológico, volume celular, tamanho das células, integridade da membrana plasmática, externalização de resíduos de fosfatidilserina, fragmentação do DNA, ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos;

- Avaliar se o efeito do composto em promastigotas de *Leishmania* é reversível ou irreversível;
- Avaliar o efeito em amastigotas extracelulares de *Leishmania*;
- Verificar a ocorrência de apoptose-like em amastigotas intracelulares de *Leishmania*, por meio da avaliação da fragmentação do DNA;
- Avaliar o efeito modulador de resposta celular, por meio da determinação dos níveis de EROs e de ON em macrófagos infectados com *Leishmania* e em macrófagos não infectados;
- Avaliar o efeito leishmanicida *in vivo*, sobre a LC murina experimental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

No intuito de facilitar o entendimento deste trabalho foi feito um delineamento experimental, o qual está representado na Figura 6.

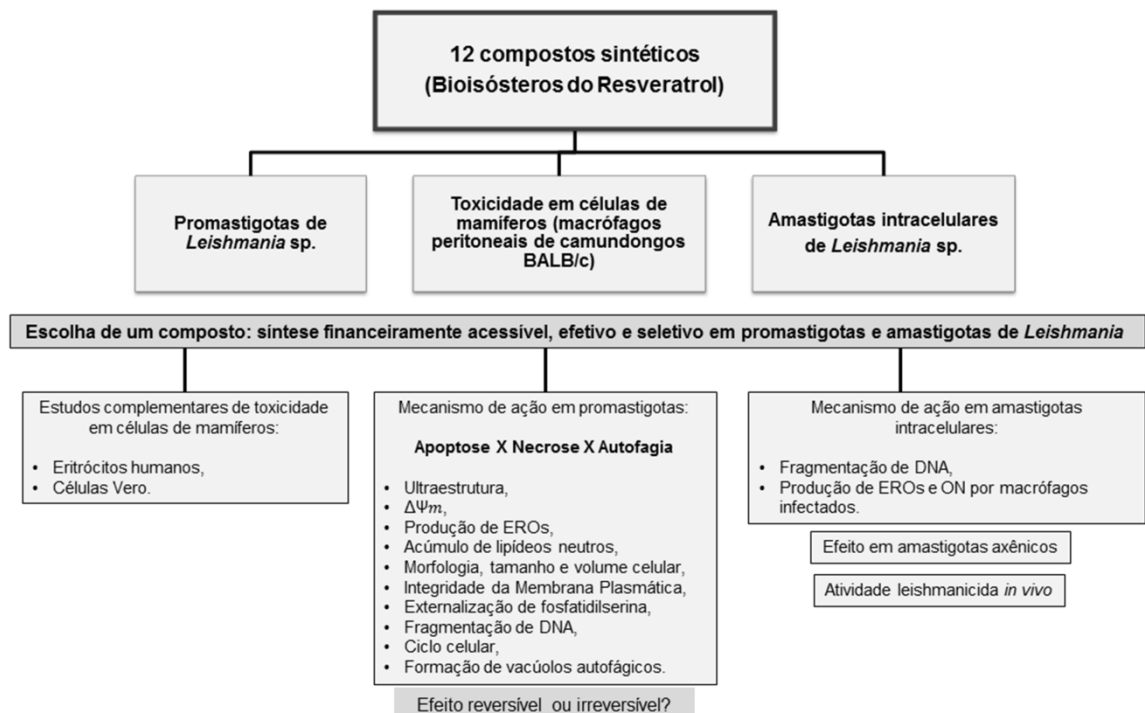


Figura 6: Delineamento experimental do trabalho. Doze compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol foram testados em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp. e em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. Em seguida, foi selecionado um composto de síntese financeiramente acessível, efetivo e seletivo em ambas as formas do parasito. Este composto teve sua toxicidade avaliada em eritrócitos humanos, no intuito de complementar seus dados de toxicidade em células de mamíferos. Além disso, este composto teve seu mecanismo de ação avaliado em promastigotas de *Leishmania*, com avaliação da ultraestrutura, $\Delta\Psi_m$, produção de EROs, acúmulo de lipídeos neutros, morfologia, tamanho e volume celular, integridade da membrana plasmática, fragmentação de DNA, externalização de fosfatidilserina, ciclo celular e formação de vacúolos autofágicos, com o objetivo de definir o mecanismo de morte celular (apoptose, necrose ou autofagia). Ainda em formas promastigotas, foi avaliado se o efeito do composto foi reversível ou irreversível. Em amastigotas intracelulares de *Leishmania*, foi avaliada a fragmentação de DNA e a produção de EROs e ON por macrófagos infectados e ainda foi avaliado o efeito deste composto em amastigotas axênicos. Finalmente, foi determinado o efeito do composto selecionado em modelo de LC murina (teste *in vivo*).

3.1 Reagentes e Equipamentos

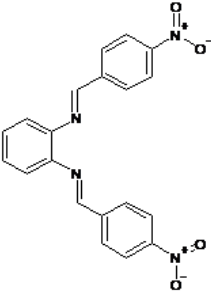
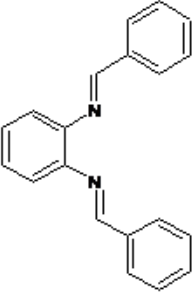
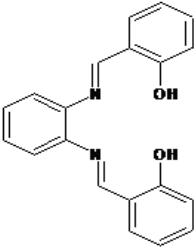
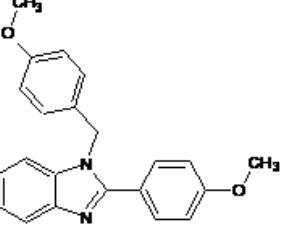
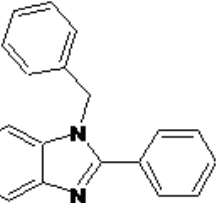
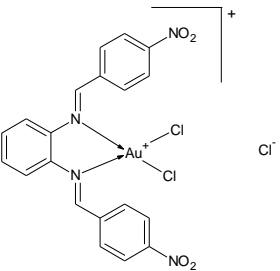
Hemina bovina (código H9039), ácido fólico (F7876), solução de Penicilina 10.000 U.I./mL + Estreptomicina 10 mg/mL (P4333), MTT (M5655), DMSO (D5879), JC-1 (T4069), rodamina 123 (R8004), FCCP (C2920), Nile Red (19123), iodeto de propídeo (PI) (P4864), poli-L-lisina (P9155), ribonuclease (R6513), monodansilcadaverina (MDC) (30432), lipopolissacarídeo (LPS) (L2654) e N-1-diidrocloreto de naftiletilenodiamina (N9125) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA). L-glutamina (365), isopropanol (139), ácido clorídrico (HCl) (154), D-glicose (221), hepes ácido (1577), sulfanilamida (216) e o ácido fosfórico (1529) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Meio BHI (M210), meio tioglicolato (M009) e meio 199 (AT014) foram adquiridos da Himedia (Mumbai, Maharashtra, Índia). Soro bovino fetal (SBF) (000063), RPMI-1640 (0010) e tripsina (001057) foram obtidos da Cultilab (Campinas, SP, Brasil). Alcool etílico absoluto (3345-64), paraformaldeído (PA) (1837) e Triton X 100 (1000) foram adquiridos da Dinâmica (Diadema, SP, Brasil). H₂DCFDA (D399), anexina V-FITC (A13199) e antifade (Prolong® Gold Antifade, código P36930) foram obtidos da Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA. Giemsa (000619) foi adquirido da Doles (Goiânia, GO, Brasil), acetona (02595) da Neon (São Paulo, SP, Brasil), xilol (4518) da Merck (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), tubos contendo EDTA (50081) da Labor Import (Osasco, SP, Brasil), DMEM (BR30003.05) da LGC Biotecnologia (Cotia, SP, Brasil), Mitotracker® Red CM-H2XROS (M7513) da Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), DAPI (sc-3598) da Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EUA), DNase (DNase I - Rnase free, código M0303S) da BioLabs (Ipswich, Massachusetts, EUA), azul de tripan (195532) da MP Biomedicals (São Caetano do Sul, SP, Brasil), L-cisteína (3020) da INLAB (São Paulo, SP, Brasil), bicarbonato de sódio (302) da ISOFAR (Campos Elíseos, RJ, Brasil) e citrato de sódio (C1033.01.AH) da LABSYNTH, (Diadema, SP, Brasil). Dois kits TUNEL foram utilizados: DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL System (G3250) obtido da Promega (Madison, Wisconsin, EUA) e kit comercial de Detecção de morte celular *in situ*, fluoresceína (código 11684795910) adquirido da Roche, (Basileia, Suíça). Os kits de diagnóstico colorimétrico laboratorial para dosagem de AST, ALT, GGT e creatinina foram obtidos da Labtest (Lagoa Santa, MG, Brasil).

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: espectrofotômetros (Multiskan EX –Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EUA e SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA); espectrofluorímetro FLx800 (BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA); citômetro de fluxo FACsCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, EUA), equipado com DIVA software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA); microscópio de fluorescência Olympus BX53 (Shinjuku, Tóquio, Japão); câmera fotográfica Olympus DP73 (Shinjuku, Tóquio, Japão); microseringa de vidro (modelo 705, Hamilton Company, Reno, Nevada, EUA); paquímetro digital (Digimess, São Paulo, SP, Brasil), microscópio invertido Eclipse TS 100 (Nikon, Minato, Tóquio, Japão) e microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1400, JEOL, Akishima, Tóquio, Japão).

3.2 Compostos Sintéticos

Neste trabalho foram testados 12 compostos sintéticos, bioisósteros do resveratrol, sendo que destes, cinco compostos não apresentam metais em sua estrutura (compostos de **1-5**), quatro compostos são complexados a átomos de ouro (compostos **6-9**) e três compostos são complexados a átomos de vanádio (compostos **10-12**). Todas as moléculas testadas foram sintetizadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adilson David da Silva e complexadas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Alexandre Cuim, ambos do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Foram ainda testados os metais, ouro e vanádio, utilizados na síntese dos complexos metálicos e o resveratrol procedente de três origens diferentes, denominados aqui neste trabalho de Resveratrol **1** (código R5010, pureza $\geq 99\%$, adquirido da Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), Resveratrol **2** (código 10991, pureza = 99%, obtido da Fagron, São Paulo, SP, Brasil) e Resveratrol **3** (código 501-36-0, extrato de resveratrol a 8%, adquirido da Galena, Campinas, SP, Brasil). Na Tabela 1 constam a estrutura química e o nome de cada composto testado neste trabalho. Miltefosina (código 0445218-7, obtida da Cayman Chemical Company, Ann Arbor, Michigan, EUA) e Anfotericina B (código 212290-I/11, obtida da Cristália, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados como fármacos de referência.

Tabela 1: Estrutura química e nome dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Composto	Estrutura Química	Nome
1		1,2- <i>N,N'</i> -bis[<i>p</i> -nitrobenzilideno]fenilenodiamina
2		1,2- <i>N,N'</i> -bis (benzilideno)fenilenodiamina
3		1,2- <i>N,N'</i> -bis [<i>o</i> -hidroxi-benzilideno]fenilenodiamina
4		2-(4-metoxifenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-1H-benzimidazol
5		2-fenil-1-(fenilmetil)-1H-benzimidazol
6		Cloreto de {[<i>o</i> - <i>N,N'</i> -bis [<i>p</i> -nitrobenzilideno] fenilenodiamina] bis (clorido) ouro(III)}

Continuação da tabela 1: Estrutura química e nome dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Composto	Estrutura Química	Nome
7		{Tris-clorido[2-(4-metoxifenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]benzimidazol]ouro(III)}
8		{Tris-clorido [2-fenil-1-(fenilmetil) benzimidazol] ouro(III)}
9		{clorido [2-fenil-1-(fenilmetil) benzimidazol] ouro(I)}
10		Sulfato de Bis [1,2- <i>N,N'</i> -Bis (benzilideno) fenilenodiamina] oxo- vanádio(VI)
	R=	
11		1,2- <i>N,N'</i> -bis [(<i>o</i> -hidroxi-benzilideno) fenilenodiamina]

Continuação da tabela 1: Estrutura química e nome dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Composto	Estrutura Química	Nome
12		Sulfato de [1,2- <i>N,N'</i> -bis [(<i>p</i> -nitrobenzilideno)] fenilenodiamina] oxovanádio(IV)

3.3 Cultivo e manutenção da infectividade das cepas de *Leishmania* sp.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio Warren (infusão de coração e cérebro bovino - meio BHI, acrescido de hemina e ácido fólico) e formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903) e *L. major* (MRHO/SU/59/P) foram cultivadas em meio BHI contendo L-glutamina e urina masculina estéril. Os meios foram suplementados com 10% SBF e 0,1% de solução de Penicilina/Estreptomicina e os parasitos foram mantidos a 25°C. Formas amastigotas de *Leishmania* sp. foram constantemente isoladas a partir de lesões de camundongos BALB/c e os promastigotas mantidos *in vitro* com repiques realizados 2 vezes por semana.

Para a manutenção da infectividade das cepas de *Leishmania* foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, com cerca de 4 a 6 semanas de idade. Para *L. amazonensis* e *L. major*, foram inoculados, na pata traseira direita de cada animal, 30 µl de uma solução de PBS contendo 2×10^6 formas promastigotas. Para *L. braziliensis* foram inoculados, na orelha direita de cada animal, 10 µl de uma solução de PBS contendo 10×10^6 formas promastigotas. A infecção dos camundongos foi realizada com os parasitos na fase estacionária da curva de crescimento, visto que nesta fase de cultura está estabelecido que existe maior número de parasitos infectivos (SACKS, HIENY e SHER, 1985; HOWARD SAYERS e MILES, 1987). A punção foi realizada nas lesões após aproximadamente seis semanas de infecção com a retirada de formas amastigotas, que em seguida foram

colocadas em seus respectivos meios de cultura, suplementados com 20% de SBF e 1% de penicilina/estreptomicina e mantidas a 25°C, para que houvesse a conversão das formas amastigotas em promastigotas. A partir de então, as formas promastigotas foram cultivadas em seus respectivos meios de cultura, como descrito anteriormente.

3.4 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas de *Leishmania* sp.

A atividade antipromastigota foi realizada de acordo com o método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), baseado na redução do tetrazólio sódico em formazan, pelas desidrogenases mitocondrais de células vivas (MOSSMAN, 1983).

O protocolo foi realizado de acordo com Machado et al. (2012). As formas promastigotas, em fase logarítmica de crescimento, após contagem em câmara de Neubauer, foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^6 células/mL para *L. amazonensis* e 3×10^6 células/mL para *L. braziliensis* e *L. major*. Os compostos foram adicionados em concentrações variadas (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M) após diluição em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a concentração máxima de DMSO usada foi de 0,03%, concentração esta que não se mostrou tóxica aos parasitos. Os testes foram realizados em duplicatas, no qual em alguns poços não houve adição de compostos (controle). Após 72 horas de incubação em estufa a 25°C, foram adicionados 10 μ L de MTT a 5 mg/mL em cada poço e as placas foram novamente incubadas durante 4 horas a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de isopropanol/HCl (solução a 0,7%) e lida em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição do crescimento dos promastigotas em relação ao controle. Foi então determinado o CI_{50} de cada molécula, que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento celular. O CI_{50} foi calculado com o auxílio do programa *GraFit5*. Miltefosina e Anfotericina B foram utilizadas como fármacos de referência.

3.5 Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Para a análise da toxicidade dos compostos em células de mamíferos, o protocolo foi baseado no descrito por Carmo et al. (2011). Foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos após prévia inoculação intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato 3%, 72 horas antes da eutanásia. Os camundongos foram eutanasiados para a realização do lavado peritoneal, onde foram injetados, no peritônio de cada animal, 6 mL de solução de Hank's estéril, sendo que em cada camundongo o processo foi repetido para recuperar um maior número de células. A solução obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) por 10 minutos, e as células foram ressuspendidas em meio RPMI-1640 e contadas em câmara de Neubauer. Após a contagem, as células foram suspensas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina, na concentração de 2×10^6 células/mL e foram transferidas para placas de 96 poços. As placas permaneceram por 16 horas em estufa com 5% de dióxido de carbono (CO_2) a 33°C , para a adesão dos macrófagos. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e os compostos, após diluição em DMSO, foram adicionados em diferentes concentrações (150; 75; 37,5; 18,75; 9,37; 4,69 e 2,34 μM) sendo que a máxima concentração utilizada deste solvente foi de 0,05%, que não se mostrou tóxica às células. As placas foram transferidas novamente para estufa com 5% de CO_2 a 33°C , onde permaneceram por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 10 μL de MTT (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/mL. Após 2 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de isopropanol/HCl (solução a 0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os testes foram realizados em duplicatas e em alguns poços não houve adição de compostos (controle). Os resultados foram calculados como porcentagem de morte dos macrófagos em relação ao controle. Foi então determinado o CC_{50} (concentração citotóxica que mata 50% das células) de cada composto com o auxílio do programa *GraFit5*. A miltefosina e a anfotericina B foram utilizadas como fármacos de referência.

3.6 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp.

Para a análise da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp., o protocolo foi baseado no descrito por Machado et al. (2012) e foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos como descrito anteriormente na seção 3.5. Após centrifugação da solução obtida do lavado peritoneal, as células foram contadas e distribuídas sobre lamínulas de vidro de 13 milímetros de diâmetro, em placas de 24 poços, onde em cada poço foram adicionados 300 μ L de suspensão celular, na concentração de 2×10^6 células/mL, em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. As placas foram transferidas para estufa com 5% de CO₂ a 33°C para que os macrófagos aderissem às lamínulas. Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril, para a retirada dos macrófagos não aderidos e foram infectadas com promastigotas de *Leishmania* sp., em fase estacionária de crescimento (razão de 10 promastigotas: 1 macrófago). As placas foram colocadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C e após 4 horas de interação, cada poço foi lavado com PBS estéril, para a retirada dos parasitos que não foram fagocitados. Os compostos, após diluição em DMSO, foram adicionados em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56 e 0,78 μ M). A concentração máxima de DMSO usada neste teste foi de 0,03%, que não se mostrou tóxica às células presentes. Após 72 horas de tratamento, em estufa com 5% de CO₂ a 33°C, as lamínulas foram retiradas, as células foram fixadas com álcool etílico absoluto, coradas com Giemsa e desidratadas em bateria de acetona/xilol, na seguinte sequência: acetona 100%; acetona 90%/xilol 10%; acetona 50%/xilol 50%; acetona 10%/xilol 90% e xilol 100%. Em seguida, as lamínulas foram colocadas sobre lâminas. Cada teste foi realizado em duplicata. A miltefosina e a anfotericina B foram utilizadas como fármacos de referência.

O efeito antiparasitário dos compostos em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi avaliado a partir da contagem dessas formas dentro dos macrófagos parasitados em relação ao controle (macrófagos infectados sem a adição de compostos). Foram contados um total de 100 macrófagos infectados em cada lamínula, bem como os amastigotas intracelulares e as células não infectadas presentes nos campos correspondentes. Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle. A

partir desse teste de viabilidade foi determinado o CI_{50} de cada molécula, com o auxílio do programa *Probit*.

3.7 Determinação do índice de seletividade (InSe) e do índice de especificidade (InEs) dos compostos

O InSe tem como objetivo determinar a seletividade de toxidez dos compostos sobre as formas parasitárias (promastigotas e amastigotas) quando comparadas às células de mamíferos (macrófagos peritoneais). O InSe é calculado pela razão entre o CC_{50} em macrófagos peritoneais e o CI_{50} em formas promastigotas ou amastigotas de *Leishmania* (MUYLDER et al., 2011).

O InEs tem como objetivo determinar a especificidade dos compostos nos dois estágios do parasito, promastigotas e amastigotas. O InEs é calculado pela razão entre o CI_{50} em formas promastigotas de *Leishmania* e o CI_{50} em formas amastigotas de *Leishmania* (MUYLDER et al., 2011).

3.8 Avaliação da toxicidade do composto 11 (VOSalophen) em eritrócitos humanos

A atividade hemolítica de **VOSalophen** foi realizada de acordo com Wang et al. (2010), com pequenas modificações. Inicialmente, foi coletado cerca de 6 mL de sangue total (grupo B, Rh-positivo) de um doador saudável, em tubo contendo EDTA. O sangue foi transferido para um tubo de centrifugação estéril e centrifugado a 1500 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 5 minutos. O plasma foi descartado, assim como a camada branca, correspondente aos leucócitos. Os eritrócitos foram lavados 4 vezes com PBS e foi realizada a diluição dessas células, originando uma solução de 50% de eritrócitos, que foi estocada em geladeira. A partir desta, foi preparada uma solução de 1% de células e esta foi distribuída em tubos cônicos de 1,5 mL, onde o composto **VOSalophen** foi adicionado, em diferentes concentrações. **VOSalophen** foi previamente diluído em DMSO, sendo que a máxima concentração utilizada desta substância foi de 0,05%, que não apresentou toxicidade para os eritrócitos. Após 24 horas de incubação, os tubos foram centrifugados a 2000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 1 minuto e 100 μ l do sobrenadante foram coletados e transferidos

para placas de 96 poços. A lise de hemácias foi determinada pela concentração de hemoglobina presente no sobrenadante das células. A absorbância do sobrenadante foi mensurada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 540 nm. Foram adicionados controles negativo e positivo, representados por PBS puro e saponina 0,2% em água deionizada, respectivamente. A porcentagem de hemólise foi calculada pela fórmula: % hemólise = (Média da absorbância dos tratados – Média da absorbância controle negativo/ Média da absorbância controle positivo) x 100. Em paralelo, foi também avaliada a atividade hemolítica do resveratrol 1 e da Anfotericina B.

3.9 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

O $\Delta\Psi_m$ de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen** foi avaliado utilizando três marcadores fluorescentes distintos, o JC-1, o Mitotracker® Red CM-H2XROS e a rodamina 123.

O JC-1 é um marcador fluorescente que penetra nas células e emite níveis variados de fluorescência vermelha ou verde, dependendo do estado funcional da mitocôndria. Em células com mitocôndrias normais, o JC-1 entra na mitocôndria e forma agregados, emitindo fluorescência vermelha. Já em células com o $\Delta\Psi_m$ alterado, o JC-1 permanece no citoplasma e emite fluorescência verde (RIBEIRO et al., 2013). O protocolo foi desenvolvido de acordo com Ribeiro et al. (2013) com pequenas modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 3, 6 e 24 horas, a 25°C. Essas concentrações utilizadas correspondem a 4 e 8 vezes o CI_{50} deste composto em promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento. As células foram lavadas com PBS, a concentração celular foi ajustada para 5×10^6 promastigotas em 1mL solução de Hank's e foram incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de JC-1 por 20 minutos a 37°C, no escuro. Após incubação, os promastigotas foram lavados três vezes com solução de Hank's e ressuspensos em 1mL desta mesma solução. Foram então transferidos, 200 μl da solução contendo os parasitos para placas negras de 96 poços, de fundo transparente. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro (FLx800) usando os comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm (fluorescência verde) and 485/600 nm

(fluorescência vermelha). A razão entre as fluorescências vermelha/verde representa o $\Delta\Psi_m$. Miltefosina foi utilizada como controle positivo.

O Mitotracker® Red CM-H2XROS é uma substância não fluorescente, que ao penetrar em células vivas, sofre oxidação e passa a emitir fluorescência vermelha. Este fluoróforo difunde-se através da membrana plasmática das células e se acumula em mitocôndrias ativas, sendo que este acúmulo é dependente do $\Delta\Psi_m$ (MESQUITA, 2013). O protocolo foi realizado de acordo com Mesquita (2013) com pequenas modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e 5×10^6 células foram transferidas para microtubos cônicos de 1,5 mL. Os promastigotas foram incubados com 500 nM de Mitotracker por 40 minutos a 25°C, no escuro. Após este período, os promastigotas foram lavados três vezes com PBS e ressuspensos em 1 mL desta mesma solução. Foram então transferidos, 200 μl da solução contendo os parasitos para placas negras de 96 poços, de fundo transparente. A intensidade de fluorescência foi mensurada usando um espectrofluorímetro (FLx800), a 540 nm de excitação e 600 nm de emissão. Miltefosina e FCCP foram utilizados como controle positivo.

A rodamina 123 é um marcador fluorescente que se acumula dentro de mitocôndrias (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013), sendo que este acúmulo é dependente do $\Delta\Psi_m$, ou seja, quanto maior a alteração do $\Delta\Psi_m$, menor é o acúmulo deste marcador na mitocôndria (RIBEIRO, 2011). O protocolo foi realizado de acordo com Ribeiro et al. (2013), com modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS e incubadas com 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de rodamina 123 por 20 minutos a temperatura ambiente e no escuro. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com DIVA software. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos usando canal FITC. Alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 foram quantificadas através do Índice de Variação (IV), que é obtido pela equação $(\text{MT-MC})/\text{MC}$, onde MT é a mediana de fluorescência dos parasitos tratados e MC é a mediana de parasitos não tratados (controle). De acordo com Menna-Barreto et al. (2009) e Ribeiro (2011), valores de IV negativos correspondem à despolarização da membrana mitocondrial. Miltefosina foi utilizada como controle positivo.

3.10 Determinação dos níveis de Espécies Reativas do Oxigênio (EROs) em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

Os níveis de EROs intracelular foram determinados usando 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), uma substância não fluorescente, porém quando oxidado, na presença de EROs, se converte em diclorofluoresceína, um composto altamente fluorescente (SARDAR et al., 2013). De acordo com Chandrasekaran et al. (2013) foi realizado o protocolo, com algumas modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 µM de **VOSalophen** por 3, 6 e 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS e a concentração dos parasitos foi ajustada para 20 x 10⁶ células em 200 µl de PBS, em placas negras de 96 poços, de fundo transparente. Em cada poço foram adicionados 4 µl de uma solução de H₂DCFDA a 1 mM e as células foram incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente, no escuro. A intensidade de fluorescência foi mensurada usando um espectrofluorímetro (FLx800) a 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Miltefosina foi utilizada como controle positivo.

3.11 Avaliação do acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

O acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** foi determinado por meio da marcação com Nile Red (9-dietilamino-5Hbenzo[*a*] phenoxazina-5-ona). O Nile Red é uma substância lipofílica, capaz de se ligar a lipídeos neutros intracelulares, e ocorre uma correlação linear entre a sua fluorescência e o conteúdo de lipídeos neutros no interior das células (ALEMÁN-NAVA et al., 2016).

O protocolo foi estabelecido de acordo com Godinho et al. (2013), com algumas modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 µM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS e a concentração de parasitos foi ajustada, em placas negras de 96 poços, com fundo transparente, para 10 x 10⁶ células/mL em 200 µl de PBS. Em seguida, as células foram marcadas com 10 µg/mL de Nile Red durante 20 minutos, a 25°C e foi a leitura foi realizada em

espectrofluorímetro (FLx800), nos comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. Miltefosina foi utilizada como controle positivo.

3.12 Avaliação da morfologia e do tamanho de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A avaliação morfológica foi feita de acordo com Ferreira et al. (2014), com pequenas modificações. Para avaliar possíveis alterações na morfologia dos parasitos tratados com **VOSalophen**, formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Após este período, alíquotas de 15 μl foram colocadas, em duplicata, em lâminas de vidro, devidamente identificadas. Após a secagem das amostras, foi realizada a fixação com etanol e a coloração com Giemsa. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio (Olympus BX53) e fotografadas (câmera Olympus DP73).

Nessas mesmas lâminas fotografadas, foi realizada a medida do comprimento dos promastigotas (corpo + flagelo), utilizando recursos de medidas do programa CellSens Dimension. Em cada lâmina, de cada grupo testado (controle sem tratamento, **VOSalophen** 27 μM e **VOSalophen** 53 μM) foram medidos um total de 100 parasitos e posteriormente foi calculado o tamanho médio dos promastigotas de cada grupo.

3.13 Avaliação do volume de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A avaliação quanto às alterações no volume dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** foi realizada através de citometria de fluxo. Para a realização deste teste, formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas. Em seguida, os parasitos foram lavados com PBS e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com DIVA software. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos, onde foi observado o parâmetro FSC (*Forward Scatter*), que tem correlação com o volume celular.

3.14 Avaliação da permeabilidade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

Para avaliar a permeabilidade da membrana plasmática de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**, foi realizada uma marcação com PI e a leitura foi feita através de duas técnicas distintas: citometria de fluxo e fluorimetria. O PI é uma substância fluorescente que marca o DNA de células com a membrana plasmática danificada, visto que nestas condições o mesmo tem a capacidade de penetrar (MASANGO, ELLIS e BOTHA, 2015). Os protocolos foram estabelecidos de acordo com Tiunan et al. (2014) com modificações.

Para avaliação da permeabilidade da membrana plasmática por citometria de fluxo, promastigotas desta mesma espécie de *Leishmania*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a concentração de parasitos foi ajustada para 5×10^6 células em 400 μl de PBS. Posteriormente, os promastigotas foram incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PI por 15 minutos, no escuro e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com DIVA software. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos usando o canal PE.

Para a avaliação por fluorimetria, promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27, 53, 106 e 160 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Essas concentrações utilizadas correspondem a 4, 8, 16 e 24 vezes o CI_{50} do composto **VOSalophen** em promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento. Após incubação, as células foram lavadas com PBS e a concentração dos parasitos foi ajustada para 10×10^6 células em 200 μl de PBS. Os promastigotas foram incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PI por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. A intensidade de fluorescência foi mensurada usando um espectrofluorímetro (FLx800), a 540 e 600 nm de excitação e emissão, respectivamente. Em ambas as metodologias, formas promastigotas de *L. amazonensis* aquecidas a 65°C por 10 minutos, em banho-maria, foram utilizadas como controle positivo.

3.15 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A fosfatidilserina é um fosfolípido presente na membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania* sp. (TRIPATHI e GUPTA, 2003). Após um estímulo para a ocorrência de apoptose, a fosfatidilserina presente na parte interna da membrana plasmática é translocada para a porção externa da membrana, assim, a externalização de fosfatidilserina é considerada um marcador de apoptose (SEN et al., 2007). Este fosfolípido é reconhecido por receptores específicos presentes na superfície de macrófagos e tem-se relatado que a externalização de fosfatidilserina na superfície de células envelhecidas ou apoptóticas é um pré-requisito para a sua fagocitose pelos macrófagos (TRIPATHI e GUPTA, 2003).

A externalização de resíduos de fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática de células apoptóticas pode ser avaliada através da marcação com anexina V-FITC (KUMAR et al., 2016). O protocolo foi estabelecido de acordo com Marinho et al. (2014) com modificações, em que formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS e a concentração de parasitos foi ajustada para 5×10^6 células em 100 μl de tampão de ligação. Foram então adicionados 2,5 μl de anexina V-FITC e as células foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Em seguida, os promastigotas foram incubados com 1 $\mu\text{g/mL}$ de PI em tampão de ligação por 15 minutos, no escuro e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com DIVA software. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos usando os canais FITC e PE, para anexina-FITC e PI, respectivamente. O tampão de ligação foi constituído por 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl_2 e 1,8 mM de CaCl_2 . Miltefosina foi utilizada como controle positivo.

3.16 Avaliação da fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A avaliação da fragmentação do DNA de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen** foi determinada através da técnica TUNEL

(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling), utilizando um kit comercial (DeadEnd™ Fluorimetric TUNEL System, Promega). O princípio desta técnica consiste na incorporação catalítica do nucleotídeo 12-dUTP, acoplado ao FITC, à extremidade 3'-OH do DNA, através da enzima rTdT (KLINGBEIL, 2010).

O protocolo foi estabelecido com base nas instruções do fabricante, com modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 µM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS e fixadas com solução de paraformaldeído (PA) 4%, por 20 minutos, no gelo. Após a fixação, os promastigotas foram lavados 2x com PBS para a completa retirada do fixador e em seguida colocadas sobre lamínulas de vidro pré-tratadas com poli-L-lisina. As células, já aderidas, foram permeabilizadas com Triton X-100 0,2%, por 5 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, os parasitos foram lavados 2x com PBS e as lamínulas foram cobertas com tampão de equilíbrio, fornecido pelo kit, por 7 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, este tampão foi removido e foram adicionados, em cada lamínula, 51 µl do tampão de marcação (45 µl do tampão de equilíbrio + 5 µl do nucleotídeo Mix acoplado ao FITC + 1 µl da enzima TdT), em que todos os reagentes foram fornecidos pelo kit. Para garantir a uniformidade de marcação das lamínulas, cada uma foi coberta com lamínulas plásticas, fornecidas pelo kit. Seguiu-se com a incubação das amostras por 1 hora, a 37°C, em câmara úmida, e protegidas da luz. Após este período, as lamínulas de plástico foram retiradas, as células foram lavadas com PBS e em seguida incubadas com SSC 20X (diluição de 1:10, em água deionizada), também fornecido pelo kit, por 15 minutos a temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas 3x com PBS e incubadas com solução de 1 µg/mL de DAPI por 30 minutos a 37°C, no escuro. Após a marcação com DAPI, as células foram lavadas 5x com PBS, foi retirado o excesso de líquido das lamínulas e cada uma foi depositada sobre lâminas de vidro, devidamente identificadas. Cada lamínula foi colocada sobre uma gota de antifade, e após a secagem, foram lacradas com esmalte incolor. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando os filtros de excitação e emissão de 345 e 460 nm, respectivamente, para o DAPI e de 485 e 528, respectivamente, para o FITC e fotografadas (câmera Olympus DP73). Promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 5 µg/mL de DNase por 10 minutos foram utilizados como controle positivo.

O preparo das lamínulas tratadas com poli-L-lisina ocorreu da seguinte maneira: inicialmente as lamínulas de vidro foram imersas em solução de detergente neutro por 10 minutos; em seguida foram lavadas em água corrente; posteriormente as lamínulas foram imersas em álcool 70% por 10 minutos e foram limpas com gaze; finalmente as lamínulas foram tratadas, por 20 minutos, com solução de poli-L-lisina 0,01% diluída em água deionizada e lavadas 3x com PBS.

3.17 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

O ciclo celular tem como função duplicar o conteúdo de DNA das células e separar, cada cópia de DNA, dentro de células-filhas geneticamente idênticas. Em eucariotos o ciclo celular é dividido em quatro fases: G_1 , S, G_2 e M. Durante a fase G_1 a célula-mãe se prepara para duplicar o seu DNA, o que ocorre na fase S. Na fase G_2 a célula se prepara para dividir-se em duas células-filhas idênticas e durante a fase M ocorre esta divisão celular. Portanto, em cada fase do ciclo celular, as células apresentarão conteúdos distintos de DNA. Na fase G_1 essa quantidade corresponde a 1 x DNA, na fase S entre 1 e 2 x DNA e na fase G_2 , 2 x DNA. De maneira interessante, o conteúdo de DNA celular pode ser estimado através da permeabilização da membrana plasmática das células, marcação com PI e posterior avaliação da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo (RIBEIRO, 2011). O protocolo foi realizado de acordo com Ribeiro (2011) com algumas modificações: promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. As células foram lavadas com PBS, ressuspensas em 1mL de etanol 70% e mantidas a -20°C por 1 hora. Em seguida, as células foram centrifugadas a 2500 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 15 minutos, ressuspensas em 280 μl de solução de ribonuclease a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e incubadas por 1 hora a 37°C, no escuro. Posteriormente, as células foram incubadas com 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI, por 20 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II equipado com DIVA software. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos usando canal PE.

3.18 Avaliação da formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

O protocolo para a avaliação da formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** foi estabelecido com base no que foi desenvolvido por Adade et al. (2013), com modificações, através da marcação com a substância auto fluorescente, monodansilcadaverina (MDC), que é um marcador de vacúolos autofágicos (BERA et al., 2003).

Promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS, a concentração celular foi ajustada para 10×10^6 células e os parasitos foram incubados com 100 μM de MDC por 60 minutos a 25°C. Em seguida, os promastigotas foram novamente lavados 2x com PBS e transferidos para lamínulas de vidro, pré-tratadas com poli-L-lisina, preparadas como descrito anteriormente no item **3.16**. Os promastigotas foram fixados com solução de PA 4%, cada lamínula foi colocada sobre uma gota de antifade, e após a secagem, foram lacradas com esmalte incolor. Posteriormente as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando os filtros de 345 de excitação e 460 de emissão, e fotografadas (câmera Olympus DP73). Promastigotas de *L. amazonensis* incubados por 24 horas em condições de privação de aminoácidos (incubação em PBS) foram utilizados como controle positivo.

3.19 Avaliação ultraestrutural de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

Para a realização da análise ultraestrutural, promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 13 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Após o tratamento os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4°C e pós-fixados com solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM. Em seguida, os parasitos foram desidratados em séries de acetona e incluídos em resina Epon a 60°C. Os cortes ultrafinos foram contrastados

com acetato de uranil e citrato de chumbo e examinados em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1400).

3.20 Avaliação da reversibilidade do efeito do composto 11 (VOSalophen) na proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*

A análise da reversibilidade do efeito de **VOSalophen** na proliferação de promastigotas de *L. amazonensis* foi realizada de acordo com Mesquita-Rodrigues et al. (2013), com algumas modificações. Formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e a concentração de parasitos foi ajustada, em placas de 96 poços, para 5×10^6 células/150 μl de meio Warren fresco, contendo 10% SBF e 0,1% de penicilina/estreptomicina. As placas foram então incubadas por 24, 48 e 72 horas a 25°C e a viabilidade celular foi avaliada usando o método colorimétrico do MTT.

3.21 Avaliação da infectividade de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen) e recuperados em meio de cultura fresco

A avaliação da infectividade de promastigotas tratados com **VOSalophen** e recuperados em meio Warren fresco foi realizada de acordo com Ezatpour et al. (2015), com algumas modificações. Formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram tratadas ou não com 27 e 53 μM de **VOSalophen** por 24 horas, a 25°C. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e reincubadas, em garrafas plásticas, em meio Warren fresco, contendo 10% SBF e 0,1% de penicilina/estreptomicina. Após 5 dias, tempo estabelecido, nas condições de cultura descritas, para que os parasitos entrem em fase estacionária, formas promastigotas tratadas ou não com **VOSalophen**, foram contadas em câmara de Neubauer e colocadas em contato com macrófagos peritoneais (razão 10 promastigotas: 1 macrófago) de camundongos BALB/c, obtidos de acordo com o que foi descrito no item 3.6 e aderidos em lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro, em placas plásticas de 24 poços. Após 4 horas de interação, as células foram lavadas com PBS estéril, para a retirada de promastigotas não fagocitados e foram incubadas por 72 horas. Após este período, as lamínulas foram coletadas, as células

foram fixadas com etanol, coradas com Giemsa e desidratadas em bateria de acetona/xilol, como já foi descrito no item **3.6**. O efeito do tratamento com **VOSalophen** sobre a infectividade de promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado através da contagem de formas amastigotas dentro dos macrófagos parasitados em relação ao controle. Foram contados um total de 100 macrófagos infectados em cada lamínula, os amastigotas intracelulares e as células não infectadas presentes nos campos correspondentes.

3.22 Avaliação da toxicidade do composto 11 (VOSalophen) em amastigotas axênicos de *L. amazonensis*

Os amastigotas axênicos de *L. amazonensis* foram obtidos por meio da utilização de células Vero. As células Vero foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento. Em cada garrafa plástica contendo células Vero aderidas, foi adicionada uma suspensão de 50×10^6 promastigotas/mL de meio DMEM contendo 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Após 24 horas de interação, a 33°C e 5% de CO₂, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas 2 vezes com PBS estéril e foram adicionados 5 mL de meio DMEM contendo 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Após 48 horas, os amastigotas axênicos foram recuperados a partir do sobrenadante das células Vero. O meio contendo os parasitos foi retirado, centrifugado a 2500 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520, ano 2011) por 10 minutos e os amastigotas foram contados em câmara de Neubauer, após diluição em solução de azul de tripan 0,4%, para verificar a viabilidade dos mesmos. Posteriormente, os amastigotas axênicos foram adicionados em placas plásticas de 96 poços, em meio MAA/20 modificado contendo 20% SBF, na concentração de 3×10^6 células/mL e o composto **VOSalophen** foi adicionado em diferentes concentrações, após diluição em DMSO. A concentração máxima de DMSO usada foi de 0,03%, que não se mostrou tóxica aos amastigotas. Após 72 horas de incubação a 33°C com 5% de CO₂, foram adicionados, em cada poço, 10 µL de MTT (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/mL. Após 4 horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/HCl a 0,7% e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX) a 570 nm. Os testes foram realizados em duplicatas e em alguns poços não houve adição de compostos

(controle). Os resultados foram calculados como porcentagem de morte dos amastigotas axênicos, em relação ao controle. Foi então determinado o CI_{50} de cada molécula, com o auxílio do programa *GraFit5*. Em paralelo, foi também avaliado o efeito do resveratrol **1**, da anfotericina B e da miltefosina em amastigotas axênicos.

O meio MAA/20 modificado utilizado neste trabalho foi preparado da seguinte maneira: meio 199, sais de Hank's, L-cisteína, D-glicose, L-glutamina, bicarbonato de sódio, hemina bovina e Hepes ácido, em pH final de 5.5.

3.23 Avaliação da fragmentação do DNA de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A avaliação da fragmentação de DNA de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* também foi determinada através da utilização da técnica do TUNEL, que já foi descrita anteriormente no item **3.16**. Nesse caso foi utilizado o kit comercial de Detecção de morte celular *in situ*, fluoresceína (Roche).

Para a realização do ensaio, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos como descrito anteriormente na seção **3.5** e essas células foram distribuídas sobre lamínulas de vidro de 13 milímetros de diâmetro, em placas de 24 poços, na concentração de 2×10^6 células/mL, em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. As placas foram transferidas para estufa com 5% de CO_2 a $33^\circ C$ para a adesão dos macrófagos às lamínulas. Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril e foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento (10 promastigotas: 1 macrófago). Após 4 horas de interação, cada poço foi lavado com PBS estéril e o composto **VOSalophen** ($14 \mu M$) foi adicionado. Esta concentração corresponde à 4 vezes o CI_{50} deste composto em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, após 72 horas de tratamento. Macrófagos infectados e não tratados foram utilizados como controle negativo, enquanto macrófagos infectados e tratados com $10 \mu g/mL$ de DNase, por 10 minutos, foram usados como controle positivo.

A partir deste momento, o protocolo foi desenvolvido de acordo com as instruções do fabricante, com algumas modificações, onde os macrófagos infectados, tratados ou não, foram fixados com solução de PA 4%, por 1 hora a temperatura ambiente e foram lavados 3x com PBS. Em seguida, as células foram

permeabilizadas em solução a 0,1% de Triton X-100 em citrato de sódio 0,1%, durante 2 minutos, no gelo. Após a permeabilização, os macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram novamente lavados (3x com PBS) e foram adicionados, em cada poço, 50 µl da solução de marcação (5 µl da Via 1 - enzima e 45 µl da Via 2 - tampão). As células foram incubadas a 37°C, durante 1 hora, em câmara úmida e no escuro. Posteriormente, os poços foram lavados 3x com PBS e foi realizada a marcação com DAPI (1 µg/mL) por 30 minutos e ao abrigo da luz. As células foram novamente lavadas (5x com PBS), o excesso de líquido das lamínulas foi removido e as mesmas foram transferidas para lâminas de vidro previamente identificadas, onde cada lamínula foi colocada sobre uma gota de solução de antifade. Após a secagem, cada lamínula foi lacrada com esmalte incolor. Finalmente, as lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX53), usando os filtros de excitação/emissão: 345/460 nm para o DAPI e 485/528 para o FITC e fotografadas (câmera Olympus DP73).

3.24 Determinação dos níveis de EROs em macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, tratados com o composto 11 (VOSalophen)

Macrófagos não infectados: o protocolo foi feito de acordo com Fonseca-Silva et al. (2013) modificado, utilizando H₂DCFDA. Macrófagos peritoneais, obtidos como descrito no ítem 3.5, foram transferidos para placas de 96 poços, em meio RPMI suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. As placas foram colocadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C, por 16 horas, para a adesão dos macrófagos. Em seguida, os macrófagos foram incubados com **VOSalophen** em diferentes concentrações (correspondentes a 20, 12, 9, 4 e 2 vezes o CI₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento), por 24 horas a 33°C. Após incubação, as células foram lavadas com PBS, 200 µL de PBS e 4 µl de uma solução de H₂DCFDA a 1 mM foram adicionados em cada poço e as amostras foram incubadas por 60 minutos. A intensidade de fluorescência foi mensurada usando um espectrofluorímetro (FLx800), a 485 nm de excitação e 528 nm de emissão. Lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria *Escherichia coli* J5 a 30 µg/mL foi utilizado como controle positivo.

Macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*: de acordo com Fonseca-Silva et al. (2013) e realizando algumas modificações, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram obtidos como já descrito anteriormente, no tópico 3.5. Em seguida, as células foram transferidas para placas de 96 poços, em meio RPMI contendo 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina, e incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C. Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril para a retirada dos macrófagos não aderidos e foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento, na razão de 10 promastigotas para 1 macrófago. As placas foram então colocadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C e após 4 horas de interação, cada poço foi lavado com PBS estéril e o composto **VOSalophen** foi adicionado em diferentes concentrações, que correspondem a 20, 12, 9, 4 e 2 vezes o CI₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* após 72 horas de incubação. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados, em cada poço, 200 µL de PBS e 4 µl de uma solução de H₂DCFDA a 1 mM. As amostras foram incubadas por 60 minutos e a intensidade de fluorescência foi mensurada usando um espectrofluorímetro (FLx800), nos comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. Miltefosina (98 µM) e LPS (30 µg/mL) foram utilizados como controle positivo.

3.25 Determinação dos níveis de óxido nítrico (ON) produzidos por macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com o composto 11 (VOSalophen)

A dosagem do NO foi realizada no sobrenadante das culturas de macrófagos não infectados e macrófagos infectados com amastigotas *L. amazonensis* após 48 horas da adição do **VOSalophen**. O NO foi dosado através da concentração de nitrito (NO₂⁻), um subproduto estável do NO, usando o reagente de Griess (GREEN et al., 1982).

O protocolo foi realizado de acordo com Machado et al. (2012): alíquotas de 50 µl do sobrenadante das culturas de macrófagos e de macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram retiradas após 48 horas de tratamento com **VOSalophen** e incubadas com 50 µl do reagente de Griess (25 µl de Sulfanilamida a 1% em ácido

fosfórico a 2,5% e 25 µl de N-(1-naftil) etilenodiamina diidroclorato a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%) por um período de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro (SpectraMax 190) a 540 nm e a produção de nitrito foi quantificada através da comparação com uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO₂. LPS, na concentração de 10 µg/mL, foi utilizado como controle positivo em ambos os experimentos.

3.26 Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* do composto 11 (VOSalophen)

Para avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* do composto **VOSalophen**, camundongos BALB/c fêmeas, de 4 a 6 semanas de vida, foram infectados na pata traseira direita, com 30 µl de PBS contendo 2×10^6 formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento, de acordo com Inacio, Canto-Cavaleiro e Almeida-Amaral (2013), com algumas modificações. A infecção foi realizada com o auxílio de uma microseringa de vidro (modelo 705, Hamilton Company). Após 10 dias de infecção, os animais infectados foram redistribuídos em 5 grupos, cada um contendo 5 camundongos: Grupo 1 (controle negativo - camundongos tratados com 20 µl de solução de DMSO 5% em PBS); Grupo 2 (controle positivo - camundongos tratados com 20 µl de solução de Anfotericina B 300 µg/mL em DMSO 5% em PBS); Grupo 3 (camundongos tratados com 20 µl de solução de **VOSalophen** a 300 µg/mL em DMSO 5% em PBS); Grupo 4 (camundongos tratados com 20 µl de solução de **VOSalophen** a 150 µg/mL em DMSO 5% em PBS) e Grupo 5 (camundongos tratados com 20 µl de solução de **VOSalophen** a 75 µg/mL em DMSO 5% em PBS). Em paralelo, foi realizada a pesagem dos mesmos e as patas (direita e esquerda) foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess). Posteriormente, foi realizado o tratamento de cada animal, conforme descrito acima, através da via intralesional. O tratamento dos camundongos foi feito duas vezes por semana, durante quatro semanas, com o uso de uma microseringa de vidro. Nos dias de cada tratamento, foi realizado o acompanhamento do crescimento das lesões, através das medidas dos tamanhos das patas direita e esquerda, de cada animal. Três dias após o último tratamento, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical, seguido de perfuração do diafragma e o tamanho das patas foi mensurado com um paquímetro digital.

A partir deste teste de triagem, foi definida a melhor concentração do composto **VOSalophen**, quanto à redução do tamanho das patas dos animais, que foi a concentração de 75 µg/Kg. Esta dose foi então escolhida para os demais ensaios *in vivo*.

No segundo teste, o protocolo utilizado foi o mesmo já descrito acima e os grupos de tratamento foram: Grupo 1 (controle negativo - camundongos tratados com 20 µl de solução de DMSO 5% em PBS); Grupo 2 (controle positivo - camundongos tratados com 20 µl de solução de Anfotericina B 300 µg/mL em DMSO 5% em PBS) e Grupo 3 (camundongos tratados com 20 µl de solução de **VOSalophen** a 75 µg/mL em DMSO 5% em PBS). Três dias após o último tratamento, o tamanho das patas foi mensurado com um paquímetro digital e a pata traseira direita (pata infectada) de cada animal foi extraída e pesada. Posteriormente, a pele das patas foi retirada e em seguida as patas foram maceradas, em meio Warren, com o auxílio de um êmbolo de seringa. O conteúdo obtido a partir do macerado foi homogeneizado, transferido para tubos de centrífuga e mantidos a 4°C, por 10 minutos, para que houvesse a precipitação de restos celulares. A partir do sobrenadante do macerado, foi feita uma pré-diluição de 1:500 em meio Warren contendo 10% de SBF e 2% de solução de penicilina/estreptomicina. Esta pré-diluição de 1:500 foi utilizada para a realização do ensaio de diluição limitante (LDA), que tem como objetivo estimar a carga parasitária nas patas infectadas.

O ensaio de diluição limitante (LDA) foi realizado de acordo com Rabito et al. (2014). Em placas de 96 poços foram plaqueados 150 µl de meio Warren, contendo 10% de SBF e 2% de solução de penicilina/estreptomicina, em todos os poços das placas, e nos primeiros poços, correspondentes a cada grupo, foram adicionados 50 µl da pré-diluição. Desses primeiros poços, foram retirados 50 µl e foi realizada uma diluição seriada nos demais poços, correspondentes a cada grupo, e no final, foram descartados 50 µl. Para cada grupo foram feitas 16 diluições, cada uma em triplicata. As placas foram mantidas a 25°C por sete dias. Ao final deste período foi realizada a leitura do LDA, através da análise de cada poço das placas em microscópio invertido (Eclipse TS 100), observando-se, em cada grupo, qual foi o último poço, de cada triplicata, em que houve crescimento dos parasitos. Através desses dados e utilizando a fórmula $3^{n-1} \cdot x \cdot 1000/y$ (onde **n** corresponde ao número do último poço onde houve crescimento de promastigotas, **x** corresponde à pré-

diluição e y corresponde ao volume da pré-diluição adicionado nos primeiros poços da diluição seriada), foi possível estimar o número de parasitos presentes nas patas infectadas dos animais pertencentes a cada grupo testado.

3.27 Avaliação da toxicidade *in vivo* do composto 11 (VOSalophen)

A toxicidade *in vivo* de **VOSalophen** foi realizada a partir dos camundongos utilizados no teste de atividade leishmanicida *in vivo*. Antes da eutanásia, foi coletado o sangue dos animais, por meio de punção cardíaca e em seguida foi realizada a separação do soro sanguíneo, para a análise da toxicidade hepática e renal de **VOSalophen**. Para a separação do soro, o sangue coletado de cada camundongo foi centrifugado (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) a 4000 rpm por 15 minutos, com desaceleração zero. Em seguida, o soro foi coletado e armazenado a - 20°C, até o momento da utilização.

No soro desses animais foram avaliados os níveis de aspartato transaminase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamiltanspeptidase (GGT) e creatinina, usando kits de diagnóstico colorimétrico laboratorial (Labtest). Animais que receberam uma única dose de Acetaminofeno (300 mg/Kg), por via oral, foram utilizados como controle positivo de toxicidade hepática e renal.

3.28 Análise Estatística

Nos ensaios antipromastigota de *Leishmania* e de toxicidade em macrófagos os valores dos CI_{50} e do CC_{50} para cada composto foram determinados graficamente a partir de uma curva de regressão não linear, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *GraFit* versão 5.0 (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K). Para ensaios antiamastigota, os valores dos CI_{50} foram calculados utilizando o programa *Probit*, que utiliza o método de Litchfiet e Wilcoxon e um intervalo de confiança de 95%.

Para a construção de gráficos expressando o mecanismo de ação do composto **VOSalophen** em formas promastigotas de *L. amazonensis* e em macrófagos infectados com amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, as análises estatísticas foram realizadas por análise de variância (One-wayANOVA) usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego,

CA, EUA), sendo que diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett. Para a construção do gráfico de avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**, a análise estatística também foi obtida no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (Two-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Bonferroni.

Nos gráficos de avaliação do efeito do *in vivo* do **VOSalophen**, as análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando teste t não pareado. Nos gráficos expressando a toxicidade hepática e renal deste composto, as análises estatísticas também foram realizadas no *GraphPad Prism* versão 5.0, utilizando análise de variância (One-way ANOVA) e pós-teste de Dunnett.

3.29 Considerações Éticas

Todos os ensaios envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEEA). Os protocolos são: 015/2012, 016/2012, 017/2012, 054/2013, 055/2013, 056/2013 e 047/2014 e os certificados de aprovação estão apresentados no Anexo I.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram divididos em três partes no intuito de facilitar a compreensão do texto:

- Parte I: relata o efeito *in vitro* dos compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos (de ouro ou vanádio) em *Leishmania* sp. e em células de mamíferos (parte dos resultados foram publicados na Revista Biometals - Apêndice I);
- Parte II: compreende os resultados obtidos com o composto **11**, denominado **VOSalophen**, para os testes complementares em células de mamíferos e de mecanismo de ação *in vitro* em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (resultados parcialmente publicados na revista Acta Tropica - Apêndice II e demais resultados submetidos para publicação na revista Parasitology - Apêndice III);
- Parte III: mostra os resultados do efeito leishmanicida *in vivo* e da toxicidade *in vivo* do composto **VOSalophen** (resultados submetidos para publicação na revista Parasitology - Apêndice III).

4.1 Parte I – Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* e da citotoxicidade em células de mamíferos de compostos sintéticos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos

4.1.1 Efeito *in vitro* de bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*

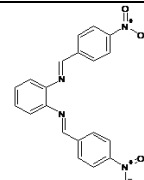
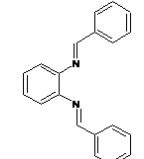
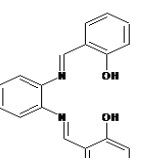
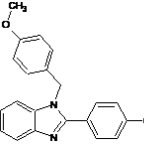
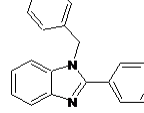
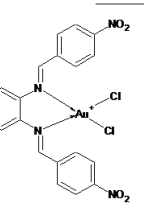
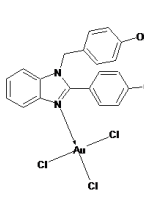
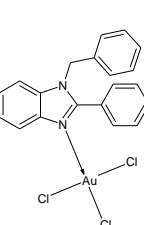
Inicialmente, todos os compostos foram testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. Todas essas três espécies de *Leishmania* estão relacionadas à forma cutânea das leishmanioses. A viabilidade celular foi mensurada pelo método colorimétrico do MTT após 72 horas de tratamento e os resultados foram expressos como CI_{50} de cada composto (Tabela 2).

Em uma primeira análise, como mostrado na Tabela 2, foram testados 5 compostos sintéticos bioisósteros do resveratrol, não complexados a metais (compostos **1-5**) e pode ser observado que os mesmos não foram ativos ou apresentaram baixo efeito antipromastigota, somente para *L. braziliensis*, com CI_{50} acima de 65 μM (compostos **1** e **2**) (Tabela 2).

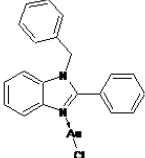
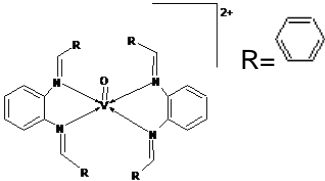
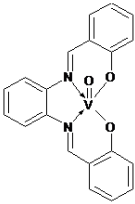
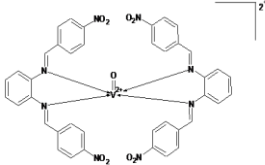
Posteriormente, os bioisósteros do resveratrol (compostos **1-5**) foram complexados a átomos de ouro, originando os compostos **6-9**, ou a átomos de vanádio, dando origem aos compostos **10-12**. É importante destacar que, com exceção do efeito do composto **10** para *L. amazonensis* e *L. major*, a complexação com metais levou a um aumento da atividade leishmanicida dos compostos, já que as moléculas complexadas com ouro ou vanádio apresentaram significativo efeito antipromastigota, nas três espécies de *Leishmania*, com CI_{50} variando de 1,29 a 54,01 μM . No geral, pode-se dizer que *L. braziliensis* foi a espécie mais sensível à ação dos compostos, tanto para os complexados a metais, quanto para os não complexados (Tabela 2).

Os metais utilizados no processo de complexação também foram testados em promastigotas de *Leishmania*, sendo que o vanádio não apresentou efeito em nenhuma das espécies utilizadas neste trabalho, até na máxima concentração testada, que foi de 100 μM , enquanto o ouro mostrou-se efetivo em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, com CI_{50} de 22,77 e 20,07 μM , respectivamente, porém não teve nenhum efeito em promastigotas de *L. major* (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Composto	Estrutura Química	CI ₅₀ (μM)*		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1		>100,00	67,92 ± 1,77	>100,00
2		>100,00	74,70 ± 4,17	>100,00
3		>100,00	>100,00	>100,00
4		>100,00	>100,00	>100,00
5		>100,00	>100,00	>100,00
6		21,51 ± 1,97	9,29 ± 0,79	20,51 ± 1,39
7		5,18 ± 0,56	1,29 ± 0,22	4,36 ± 0,31
8		15,66 ± 0,86	9,90 ± 0,98	48,17 ± 0,26

Continuação Tabela 2: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Composto	Estrutura Química	Cl ₅₀ (µM)*		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
9		42,19 ± 0,38	18,40 ± 0,46	54,01 ± 1,13
10		>100,00	31,94 ± 0,68	>100,00
11		6,65 ± 0,007	15,12 ± 1,53	29,21 ± 3,75
12		17,75 ± 0,71	8,97 ± 0,53	16,76 ± 1,65
K[AuCl ₄]	K[AuCl ₄]	22,77 ± 2,91	20,07 ± 0,48	>100,00
VOSO ₄	VOSO ₄ ·3H ₂ O	>100,00	>100,00	>100,00
Resveratrol1	-	23,23 ± 2,30	75,13 ± 7,66	54,38 ± 10,59
Resveratrol2	-	21,40 ± 2,44	96,13 ± 9,56	65,03 ± 8,26
Resveratrol3	-	> 200,00	> 200,00	> 200,00
Miltefosina	-	21,39 ± 1,18	28,07 ± 0,47	20,00 ± 0,52
Anfotericina B	-	0,15 ± 0,009	0,40 ± 0,06	0,31 ± 0,07

* Cl₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*.

Com relação aos bioisómeros do resveratrol não complexados a metais, pode-se dizer que a presença de grupos nitro (NO₂) ligados aos anéis aromáticos na molécula **1** ou a ausência de qualquer grupamento acoplado aos anéis aromáticos, como na molécula **2**, foram favoráveis à atividade antipromastigota desses compostos, uma vez que os mesmos apresentaram efeito em *L. braziliensis*, com Cl₅₀ de 67,92 e 74,70 µM para os compostos **1** e **2**, respectivamente. Por outro lado, a presença de grupos hidroxila (OH) acoplados aos anéis aromáticos (composto **3**), assim como a presença de um anel de 5 membros, contendo 2 átomos de nitrogênio (compostos **4** e **5**) foram desfavoráveis à atividade antipromastigota dos mesmos, já que estes não apresentaram efeito em formas promastigotas, até a máxima concentração testada (100 µM), em nenhuma das três espécies utilizadas neste trabalho (Tabela 2).

Quanto aos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, pode-se perceber que os compostos **7** e **8** possuem estruturas químicas bastante semelhantes, porém o composto **7** possui dois grupos metoxila, sendo que cada um se liga a um anel aromático distinto. A presença destes grupamentos pode ser a explicação para o fato de tal composto ser mais ativo do que o composto **8**, o que foi observado para as três espécies de *Leishmania* testadas (Tabela 2). Pode-se dizer ainda, que o estado de oxidação do metal também interferiu no efeito biológico dos compostos, pois a presença do ouro em seu estado de oxidação (+1), no composto **9** (obtido a partir do composto **5**), garantiu à este composto uma atividade leishmanicida menor quando comparado ao composto **8**, que também se originou do composto **5** complexado com ouro, porém este metal aparece em seu estado de oxidação (+3) (Tabela 2).

Em relação aos bioisómeros do resveratrol complexados a vanádio, o composto **11** foi mais efetivo em formas promastigotas de *L. amazonensis*, enquanto os compostos **10** e **12** foram mais efetivos em promastigotas de *L. braziliensis*. Comparando as estruturas dos compostos **10** e **12**, verifica-se que são estruturalmente semelhantes, entretanto a presença dos grupos nitro (NO₂) ligados aos anéis aromáticos, no composto **12**, garantiu a ele um efeito antipromastigota melhor quando comparado ao composto **10** (Tabela 2). O mesmo ocorreu com os seus precursores, uma vez que o composto **1**, que deu origem ao composto **12**, foi mais ativo em promastigotas de *L. braziliensis* do que o composto **2**, que originou o

composto **10**, sendo que esta diferença de atividades também pode ser atribuída à presença do grupos (NO₂).

O resveratrol foi também testado em formas promastigotas de *Leishmania*, sendo que foram utilizadas três origens distintas do mesmo composto: Resveratrol **1**, obtido da Sigma-Aldrich, Resveratrol **2**, obtido Fagron e Resveratrol **3**, obtido da Galena. É importante destacar que o resveratrol **1** e **2** mostraram efeitos semelhantes em promastigotas das três espécies de *Leishmania*, porém o mesmo não ocorreu com o resveratrol **3**, que não apresentou efeito antipromastigota até na máxima concentração testada, que foi de 200 µM (Tabela 2). Isso pode ser explicado pelo fato de os resveratrol **1** e **2** apresentarem a mesma quantidade de princípio ativo (cerca de 99%), enquanto o resveratrol **3** possui somente cerca de 8% do princípio ativo.

Comparando a atividade antipromastigota do resveratrol com o efeito de seus bioisómeros testados neste trabalho, pode-se verificar que para *L. amazonensis*, os compostos **7**, **8**, **11** e **12**, que são compostos complexados a metais, foram mais efetivos do que o resveratrol **1** e **2**. Para *L. braziliensis* todos os bioisómeros do resveratrol complexados a metais foram mais efetivos do que o resveratrol **1** e **2**, e ainda para esta espécie, o composto **1**, um bioisómero do resveratrol não complexado a metal, mostrou-se mais efetivo do que o resveratrol **1** e **2**. Com relação à *L. major*, os compostos **6**, **7**, **8**, **11** e **12** (todos bioisómeros do resveratrol complexados a metais), apresentaram maior efetividade do que o resveratrol **1** e **2** (Tabela 2). O conjunto desses resultados mostra que a complexação com metais pode ser uma estratégia para melhorar o efeito biológico de compostos sintéticos, pois neste trabalho foi mostrado que compostos complexados a metais foram mais efetivos em formas promastigotas de *Leishmania*, quando comparado a compostos não complexados.

Vale destacar ainda que para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, a maioria dos bioisómeros do resveratrol complexados a ouro e vanádio mostrou mais efetivos do que a miltefosina (Tabela 2), um medicamento utilizado, em alguns países, para o tratamento das leishmanioses, pela via oral.

4.1.2 Efeito *in vitro* de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Para avaliar a toxicidade dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, obtidos após lavado peritoneal. O efeito dos compostos sobre células de mamíferos foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT após 72 horas de tratamento e os resultados foram expressos como CC_{50} de cada composto, que são mostrados na Tabela 3.

A partir da análise da Tabela 3, pode-se verificar que os bioisómeros do resveratrol não complexados a metais (compostos **1-5**) não apresentaram toxicidade em células de mamíferos, até na máxima concentração testada, que foi de 150 μM . Os metais, ouro e vanádio, apresentaram toxicidade em macrófagos, com CC_{50} de 59,68 e 54,27 μM , respectivamente.

Com relação aos bioisómeros do resveratrol complexados a metais, a maioria dos compostos mostrou-se tóxica, com CC_{50} variando de 16,29 a 84,75 μM . Quanto aos complexos de ouro, dois compostos não foram tóxicos para macrófagos peritoneais até 150 μM , a máxima concentração testada (compostos **6** e **9**), enquanto os compostos **7** e **8** foram citotóxicos, com CC_{50} de 60,28 e 84,75 μM , respectivamente. Já para os complexos de vanádio, todos os compostos apresentaram toxicidade para células de mamíferos, sendo que o composto **12** foi o mais tóxico, com CC_{50} de 16,29 μM (Tabela 3). É válido destacar que o processo de complexação com metais apesar de ter aumentado a atividade antipromastigota dos compostos, também aumentou a toxicidade dos mesmos em células de mamíferos, interferindo, portanto, na seletividade dos compostos. Neste sentido, foi realizada uma comparação entre o efeito de cada composto em *Leishmania* e em macrófagos peritoneais, através do cálculo do InSe (resultados que serão apresentados posteriormente, na Tabela 5).

Os resveratrol **1** e **2** também apresentaram toxicidade em macrófagos peritoneais, com CC_{50} de 87,59 e 70,27 μM , respectivamente, já o resveratrol **3** não foi tóxico para essas células até a máxima concentração testada, que foi de 150 μM (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Compostos	CC₅₀ (µM)*
Macrófagos peritoneais	
1	>150,00
2	>150,00
3	>150,00
4	>150,00
5	>150,00
6	>150,00
7	60,28 ± 3,6
8	84,75 ± 13,83
9	>150,00
10	57,70 ± 1,24
11	24,32 ± 0,80
12	16,29 ± 1,53
K[AuCl₄]	59,68 ± 4,92
VOSO₄	54,27 ± 0,18
Resveratrol1	87,59 ± 10,96
Resveratrol2	70,27 ± 11,33
Resveratrol3	>150,00
Miltefosina	131,99 ± 3,95
Anfotericina B	85,81 ± 30,49

* CC₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa *Grafit*.

4.1.3 Efeito *in vitro* de bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*

Os bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos foram também testados em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. Para a realização desses testes, macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *Leishmania* sp. por 4 horas e tratados com os compostos por 72 horas. O efeito anti-amastigota foi avaliado pela

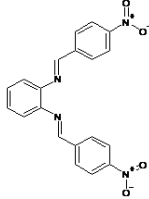
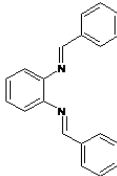
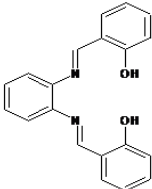
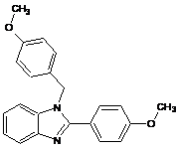
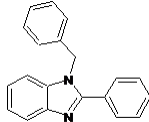
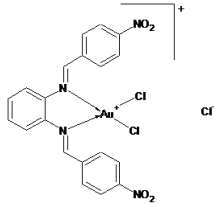
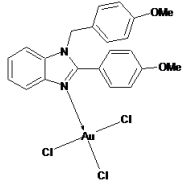
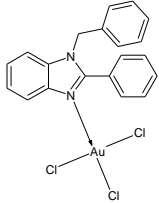
contagem dos parasitos intracelulares e em seguida o CI_{50} de cada composto foi calculado com o auxílio do programa *Probit* (Tabela 4).

Mais uma vez é importante destacar que o processo de complexação dos bioisómeros do resveratrol a metais foi importante para a atividade biológica dos compostos (Tabela 4). Moléculas não complexadas não mostraram atividade anti-amastigota ou foram pouco efetivas, como por exemplo, os compostos **1** e **2** (CI_{50} acima de 50 μ M em amastigotas de *L. amazonensis*), enquanto que as moléculas complexadas, exceto os compostos **10** e **12**, apresentaram significativo efeito em formas intracelulares de *Leishmania*, com CI_{50} variando de 3,16 a 25,95 μ M. Em relação à sensibilidade das três espécies de *Leishmania* à ação dos compostos, pode-se dizer que *L. amazonensis* foi a espécie mais sensível à ação das moléculas não complexadas e também aos bioisómeros do resveratrol complexados a vanádio, entretanto, com relação aos bioisómeros complexados com ouro, *L. braziliensis* mostrou-se a espécie mais sensível.

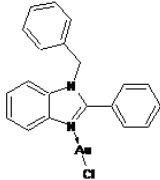
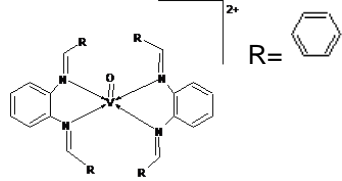
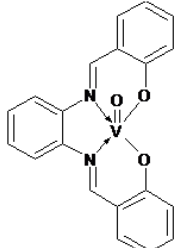
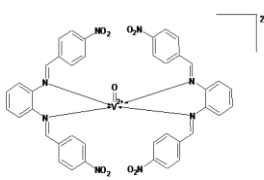
Com relação aos bioisómeros não complexados, observa-se que, assim como ocorreu para formas promastigotas, a presença de grupos (NO_2) ligados aos anéis aromáticos (composto **1**) ou a inexistência de ligantes a esses anéis aromáticos (composto **2**) foram favoráveis à atividade anti-amastigota, pois os compostos **1** e **2** apresentaram efeito em amastigotas de *L. amazonensis* com CI_{50} de 53,36 e 68,65 μ M, respectivamente. As demais moléculas não complexadas não mostraram efeito até na máxima concentração testada, que foi de 100 μ M (Tabela 4).

Quanto aos bioisómeros do resveratrol complexados a ouro, verifica-se que da mesma forma que foi observado para promastigotas, a presença de dois grupos metoxila ligados a dois anéis aromáticos distintos no composto **7** conferiu um efeito anti-amastigota melhor do que o composto **8**, que apresenta uma estrutura bastante semelhante, entretanto não possui os grupamentos metoxila. Por outro lado, diferente do observado para formas promastigotas de *Leishmania*, o composto **9**, que possui o ouro em seu estado de oxidação (+1), foi mais efetivo do que o composto **8**, que tem o ouro no estado de oxidação (+3) (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Composto	Estrutura Química	CI ₅₀ (μM)*		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1		53,36 (43,10-66,06)	>100,00	>100,00
2		68,65 (41,16-114,51)	>100,00	>100,00
3		>100,00	>100,00	NT [#]
4		>100,00	>100,00	>100,00
5		>100,00	>100,00	>100,00
6		17,07 (14,42-20,21)	5,00 (3,19-7,84)	15,22 (12,02-19,26)
7		16,25 (12,12-21,79)	4,06 (3,27-5,03)	5,69 (4,56-7,08)
8		25,95 (20,51-32,84)	6,84 (5,24-8,94)	15,43 (11,60-20,53)

Continuação Tabela 4: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Composto	Estrutura Química	Cl ₅₀ (µM) [*]		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
9		5,77 (4,39-7,58)	3,16 (2,04-4,90)	14,90 (12,59-17,64)
10		>50,00	>50,00	>50,00
11		3,51 (2,90-4,26)	25,31 (19,78-32,39)	13,99 (10,91-17,94)
12		>10,00	>10,00	>10,00
K[AuCl₄]	K[AuCl₄]	37,83 (30,36-47,14)	40,57 (28,70-57,35)	>50,00
VOSO₄	VOSO₄.3H₂O	>50,00	>50,00	>50,00
Resveratrol1	-	42,85 (37,56-48,88)	124,48 (106,44-145,59)	52,40 (43,42-63,25)
Resveratrol2	-	41,34 (35,60-48,01)	130,00 (107,79-156,79)	55,81 (49,04-63,52)
Resveratrol3	-	>100,00	> 200,00	>200,00
Miltefosina	-	4,15 (2,90-5,96)	2,45 (2,21-2,94)	7,56 (6,35-8,98)
Anfotericina B	-	0,18 (0,12-0,26)	0,03 (0,02-0,05)	0,07 (0,06-0,08)

^{*} Cl₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos. Os valores entre parênteses representam o intervalo de confiança. Calculado pelo programa *Probit*. #NT = Não testado.

Em relação aos bioisósteros do resveratrol complexados com vanádio, entre os três compostos sintéticos, somente um, o composto **11**, mostrou efeito em amastigotas de *Leishmania*, com CI_{50} de 3,51, 25,31 e 13,99 μM para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, respectivamente (Tabela 4). Talvez a explicação para isto possa estar no fato de o composto **11** possuir uma estrutura molecular menor do que os compostos **10** e **12**, o que facilitaria a penetração do mesmo através das membranas celulares, dos macrófagos e dos parasitos, visto que os amastigotas estão localizados no ambiente intracelular. Vale destacar ainda que o composto **11** foi, dentre todos os compostos testados, o mais efetivo em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (Tabela 4).

É importante ressaltar que, com base na toxicidade dos complexos metálicos em macrófagos peritoneais, foi realizada uma adaptação das concentrações máximas a serem testadas em amastigotas intracelulares. Por exemplo, a máxima concentração do composto **10** testada em amastigotas, foi de 50 μM e do composto **12**, foi de 10 μM , em virtude da toxicidade dos mesmos em células de mamíferos (ver Tabela 3).

Os metais, ouro e vanádio, também tiveram o seu efeito avaliado, sendo que o vanádio não foi ativo, até na máxima concentração testada (50 μM) em nenhuma das três espécies de *Leishmania*, enquanto o ouro mostrou-se efetivo em amastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, com CI_{50} de 37,83 e 40,57 μM , respectivamente (Tabela 4). Tal fato mostra que o efeito dos bioisósteros do resveratrol complexados a metais, tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas intracelulares, ocorre em virtude da complexação do bioisósteros do resveratrol com o metal, já que o efeito da maioria dos compostos complexados em promastigotas e amastigotas de *Leishmania* é melhor do que o efeito dos bioisósteros não complexados e/ou dos metais isolados.

Ao comparar o efeito dos bioisósteros do resveratrol complexados a metais com a atividade do resveratrol, pode-se perceber que para as três espécies de *Leishmania* testadas todos os complexos ativos mostraram-se mais efetivos do que o resveratrol **1** e **2**. Ainda é válido destacar que o composto **7** (complexo de ouro), para *L. major* e o composto **11** (complexo de vanádio) para *L. amazonensis*, foram mais efetivos do que um dos medicamentos de referência utilizados neste trabalho, a miltefosina (Tabela 4).

É importante destacar que os resultados dos testes com os compostos **1**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8** e **9**, os complexos de ouro e os seus precursores, em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* já haviam sido apresentados anteriormente em uma dissertação de mestrado (MACHADO, 2013), entretanto foram novamente adicionados neste trabalho somente com o intuito de comparar esses dados com os resultados desses mesmos compostos em outras espécies de *Leishmania*, *L. braziliensis* e *L. major*, e com o efeito de complexos de vanádio nesta mesma espécie de *Leishmania*.

4.1.4 Seletividade dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*

A seletividade dos compostos utilizados neste trabalho foi determinada através do cálculo do índice de seletividade (InSe). O InSe determina a seletividade de um composto pelo parasito, em comparação com a célula hospedeira. Isso mostra se um determinado composto é mais ativo em *Leishmania* do que tóxico para macrófagos ou vice-versa. O InSe é calculado pela razão entre o CC₅₀ em macrófagos peritoneais e o CI₅₀ em formas promastigotas ou amastigotas de *Leishmania*. Portanto, para que um composto tenha maior efeito leishmanicida do que toxicidade para macrófagos, é necessário que o valor do InSe seja maior do que um, mostrando que o CI₅₀ em *Leishmania* é menor do que o CC₅₀ em macrófagos. As Tabelas 5 e 6 mostram o InSe de cada composto em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, respectivamente.

A partir da análise da Tabela 5, é válido destacar que a maioria dos bioisósteros do resveratrol apresentou InSe maior do que um, mostrando seletividade dos compostos por promastigotas, em comparação com a célula hospedeira. Dentre os complexos de ouro, o composto **7** merece destaque, pois se mostrou cerca de 47 vezes mais tóxico para promastigotas de *L. braziliensis* do que para macrófagos. Dos bioisósteros complexados com vanádio, o composto **11**, em promastigotas de *L. amazonensis*, foi o que apresentou melhor seletividade, uma vez que foi cerca de 4 vezes mais tóxico em promastigotas do que em macrófagos peritoneais. Com relação ao composto **12**, apesar de ter apresentado significativo efeito antipromastigota (Tabela 2), foi muito tóxico para macrófagos (Tabela 3) e, portanto, para *L. amazonensis* e *L. major* o valor do InSe ficou abaixo de um,

mostrando que esse composto é mais tóxico para macrófagos do que para formas promastigotas.

Tabela 5: InSe dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Compostos	InSe*		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1	-	>2,21	-
2	-	>2,01	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	>6,97	>16,15	>7,31
7	11,64	46,73	13,82
8	5,41	8,56	1,76
9	>3,55	>8,15	>2,78
10	-	1,81	-
11	3,66	1,61	0,83
12	0,92	1,82	0,97

*Índice de Seletividade, calculado pela fórmula: CC_{50} em macrófagos peritoneais/ CI_{50} em formas promastigotas de *Leishmania*.

Com relação à amastigotas intracelulares, a análise da Tabela 6 mostra que os complexos de ouro apresentaram elevada seletividade pelo estágio intracelular do parasito *Leishmania*, sendo no mínimo 3 vezes mais tóxico em amastigotas do que em macrófagos, com destaque para o composto **9**, que foi pelo menos 47 vezes mais efetivo em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* do que em macrófagos peritoneais. Quanto aos complexos de vanádio, o composto **11**, em amastigotas de *L. amazonensis*, se destacou, já que foi cerca de 7 vezes mais tóxico para o parasito intracelular do que para a célula hospedeira. Este fato é de suma importância, já que os amastigotas são as formas biológicas do parasito relacionadas às manifestações clínicas das leishmanioses em mamíferos, incluindo o homem.

Tabela 6: InSe dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Compostos	InSe*		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1	>2,81	-	-
2	>2,18	-	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	>8,79	>30,00	>9,85
7	3,71	14,85	10,59
8	3,26	12,39	5,49
9	>26,00	>47,47	>10,07
10	-	-	-
11	6,93	0,96	1,74
12	-	-	-

*Índice de Seletividade, calculado pela fórmula: CC_{50} em macrófagos peritoneais/ CI_{50} em formas amastigotas de *Leishmania*.

Nas Tabelas 5 e 6 pode-se observar que para alguns compostos não foi possível calcular o InSe, visto que os mesmos não apresentaram efeito leishmanicida em formas promastigotas ou amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* ou *L. major*. Em um raciocínio semelhante, para alguns compostos foi possível obter somente uma estimativa do InSe, visto que alguns não apresentaram toxicidade até a máxima concentração testada (150 μ M).

4.1.5 Especificidade dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*

A especificidade dos compostos utilizados neste trabalho foi determinada através do cálculo do índice de especificidade (InEs). O InEs determina a especificidade de um composto entre os dois estágios do parasito *Leishmania*, promastigotas e amastigotas, avaliando em qual dessas formas o composto é mais

ativo. O InEs é calculado pela razão entre o CI_{50} em formas promastigotas e o CI_{50} em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

Muylder et al. (2011) estabeleceram uma classificação relacionada à especificidade dos compostos entre os dois estágios do parasito *Leishmania*. De acordo com este trabalho, valores acima de 2,0 definem compostos mais ativos em amastigotas intracelulares, valores abaixo de 0,4 definem compostos mais ativos em formas promastigotas e compostos com valores de especificidade entre 0,4 e 2,0 são considerados ativos em ambos os estágios do parasito, com efeito semelhante em promastigotas e amastigotas. No presente trabalho foi calculado o InEs dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos, que estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: InEs dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Compostos	InEs*		
	<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1	>1,87	<0,68	-
2	>1,46	<0,75	-
3	-	-	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	1,26 ^S	1,86 ^S	1,35 ^S
7	0,32 ^P	0,32 ^P	0,77 ^S
8	0,60 ^S	1,45 ^S	3,12 ^A
9	7,31 ^A	5,82 ^A	3,62 ^A
10	-	<0,64	-
11	1,89 ^S	0,60 ^S	2,09 ^A
12	<1,77	<0,90	<1,68

*Índice de Especificidade, calculado pela fórmula: CI_{50} em formas promastigotas/ CI_{50} em formas amastigotas de *Leishmania*. ^SEfeito semelhante entre os dois estágios do parasito; ^PEspecificidade em formas promastigotas; ^AEspecificidade em formas amastigotas.

Analisando a Tabela 7 e considerando a classificação estabelecida por Muylder et al. (2011), verifica-se que os bioisósteros do resveratrol complexados a ouro apresentaram variada especificidade entre os dois estágios do parasito. Para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, os compostos **6** e **8** apresentaram efeito semelhantes em promastigotas e amastigotas, o composto **7** mostrou-se mais efetivo em formas promastigotas e o composto **9** em amastigotas intracelulares. Para *L. major*, os compostos **6** e **7** mostraram semelhantes efeitos entre os estágios de vida do parasito e os compostos **8** e **9** foram mais efetivos em amastigotas intracelulares.

Sobre os compostos não complexados e para a maioria dos bioisósteros complexados a vanádio (para os compostos **10** e **12**), não se pode chegar a conclusões para todos os compostos, visto que para alguns não foi possível fazer o cálculo do InEs, pois não apresentaram efeito em nenhuma das formas evolutivas de *Leishmania*, enquanto que para outros, em virtude de não possuírem efeito em uma das duas formas evolutivas, não se obteve um valor exato, mas sim uma estimativa do InEs. Para o composto **11**, também um complexo de vanádio, pode-se afirmar que para *L. amazonensis* e *L. braziliensis* houve um efeito semelhante entre os dois estágios do parasito (InEs = 1,89 e 0,60, respectivamente), mostrando que este composto pode apresentar alvos semelhantes em promastigotas e amastigotas dessas duas espécies de *Leishmania*, entretanto para *L. major*, tal composto mostrou especificidade por formas amastigotas intracelulares, com InEs = 2,09 (Tabela 7).

Em resumo, os resultados apresentados na Parte I deste trabalho destacam o potencial leishmanicida *in vitro* de bioisósteros do resveratrol complexados com átomos de ouro ou vanádio, o que abre perspectivas para o delineamento de novos compostos biologicamente ativos e estimula a continuidade deste trabalho, através da investigação do mecanismo de ação, bem como da avaliação do efeito na LC murina.

Neste sentido, após a triagem dos doze compostos sintéticos bioisósteros do resveratrol em *Leishmania* sp. e em macrófagos, foi selecionado o composto **11** (um complexo de vanádio, a partir de agora denominado de **VOSalophen**) em *L. amazonensis*, para ser avaliado de maneira mais detalhada quanto ao seu efeito neste protozoário. A escolha deste composto foi baseada nos seguintes critérios: (1) estar complexado a vanádio, cuja síntese é financeiramente mais vantajosa quando comparada a de complexos com ouro; (2) dentre os complexos de vanádio, este

composto em *L. amazonensis*, mostrou-se o mais efetivo, mostrando significativo efeito em ambas as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e (3) apresentou InSe satisfatório em ambas as formas do parasito *L. amazonensis*. Esses resultados serão descritos na Parte II deste trabalho.

4.2 Parte II – Estudos complementares do efeito de VOSalophen em células de mamíferos e em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*

4.2.1 Efeito *in vitro* do composto VOSalophen em outra linhagem de células de mamíferos: eritrócitos humanos

Como já foi apresentado anteriormente na Parte I deste trabalho, o composto **VOSalophen**, apesar de ter se mostrado seletivo em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (Tabelas 5 e 6, respectivamente), apresentou toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c, com CC_{50} de 24,32 μ M (Tabela 3). Este fato impulsionou a avaliação da toxicidade deste composto em outra linhagem de células de mamíferos, os eritrócitos humanos, resultando em maiores informações sobre os possíveis efeitos adversos deste composto.

Para a avaliação do efeito hemolítico, eritrócitos humanos foram incubados com **VOSalophen** por 24 horas e mantidos a 37°C. O nível de hemólise foi avaliado espectrofotometricamente, pela concentração de hemoglobina no sobrenadante das células. A Figura 7 mostra o efeito hemolítico do composto **VOSalophen**, bem como do resveratrol **1** e da anfotericina B. A análise desta figura revela que o composto **VOSalophen** não apresentou níveis significativos de toxicidade para eritrócitos, induzindo cerca de 6% de hemólise na concentração mais elevada, de 150 μ M. Resveratrol **1** também não induziu níveis expressivos de hemólise, enquanto a anfotericina B resultou, em todas as concentrações testadas, em níveis hemolíticos acima de 40%.

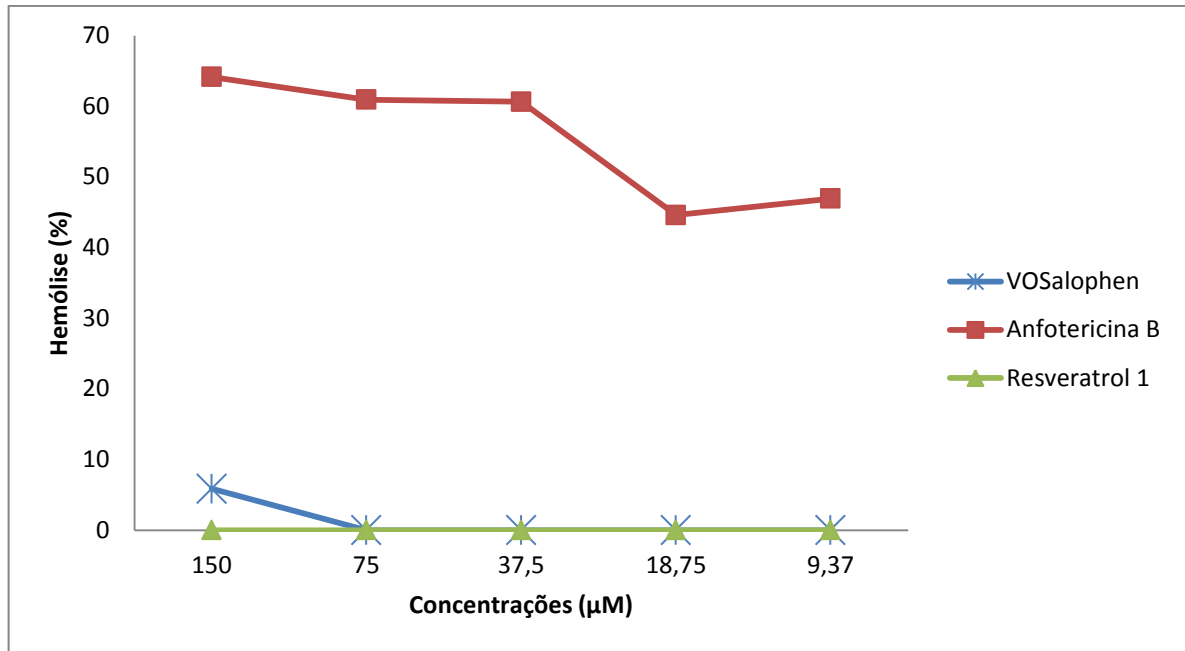


Figura 7: Efeito hemolítico induzido pelo composto **VOSalophen**, resveratrol 1 e anfotericina B. Os compostos foram incubados com os eritrócitos por 24 horas a 37°C e a lise celular foi avaliada espectrofotometricamente, através da concentração de hemoglobina no sobrenadante das células. O gráfico foi construído utilizando Microsoft Excel 2010, com valores correspondentes à média de 3 experimentos independentes.

Esses resultados mostram que apesar de **VOSalophen** ter apresentado certo grau de toxicidade em macrófagos peritoneais, o mesmo não foi tóxico em eritrócitos humanos. Além disso, este composto apresentou-se quatro e sete vezes mais tóxico para promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente, quando comparado à célula hospedeira (macrófagos peritoneais). Esses dados, em conjunto, impulsionaram a continuidade dos estudos com **VOSalophen**, quanto à avaliação do mecanismo de ação neste protozoário e ao efeito *in vivo* em modelo experimental murino de LC, cujos resultados serão apresentados adiante.

4.2.2 Estudo *in vitro* do mecanismo de ação do composto **VOSalophen** em promastigotas de *L. amazonensis*

Para iniciar esses estudos, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 50,00; 25,00; 12,50 e 6,25 µM de **VOSalophen** por 72 horas e o efeito antiparasitário foi avaliado pelo método colorimétrico do MTT. Em seguida, foi montada uma curva de sobrevivência dos promastigotas após 72 horas de tratamento com **VOSalophen** (Figura 8). A análise da mesma mostra que este

composto possui um efeito antipromastigota concentração dependente, sendo que quanto maior a concentração utilizada, menor a porcentagem de promastigotas viáveis. O CI_{50} deste composto em promastigotas de *L. amazonensis*, após 72 horas de tratamento, é 6,65 μ M e já foi apresentado na Parte I deste trabalho (Tabela 2).

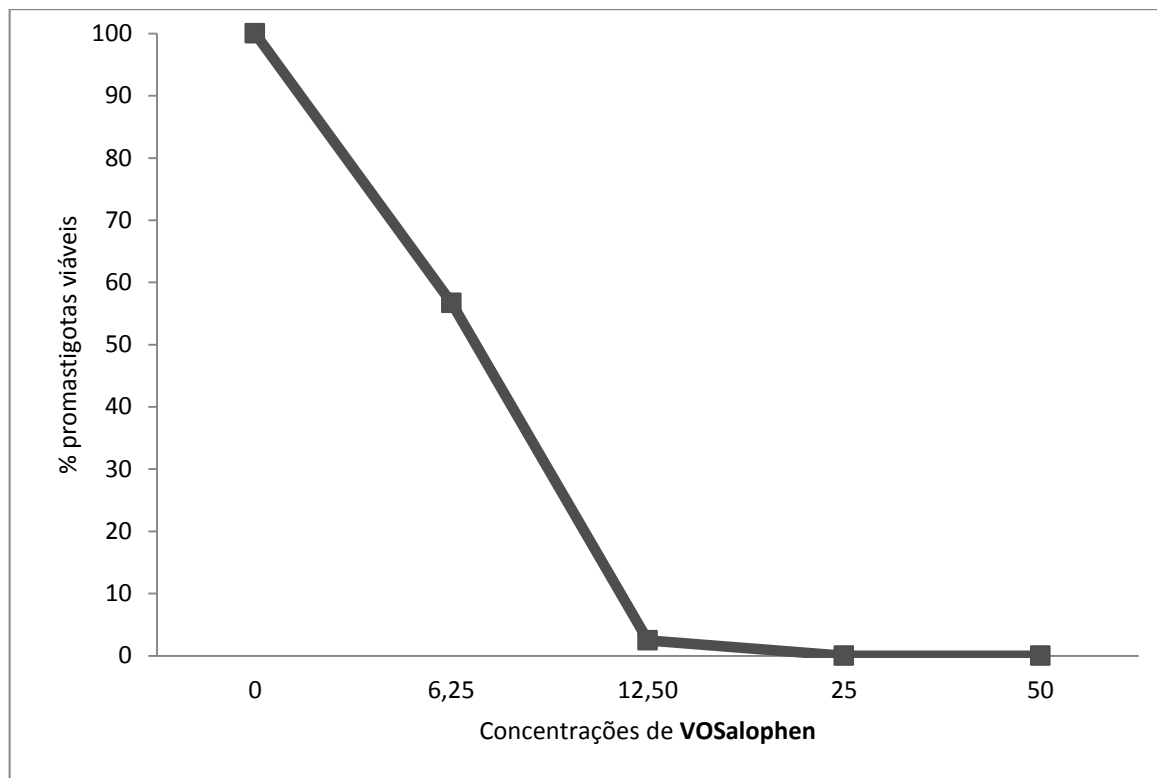


Figura 8: Efeito de **VOSalophen** no crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento. A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. O gráfico foi construído utilizando Microsoft Excel 2010, com valores correspondentes à média de 3 experimentos independentes.

A mitocôndria de tripanossomatídeos, por ser única (FIDALGO e GILLE, 2011; MENNA-BARRETO e DE CASTRO, 2014), apresentar uma série de peculiaridades importantes para a sobrevivência do parasito (FIDALGO e GILLE, 2011) e ser estruturalmente e funcionalmente diferente das mitocôndrias de mamíferos, tem sido considerada um alvo terapêutico atrativo e tem exercido papel crucial no desenvolvimento de novos compostos ativos (FIDALGO e GILLE, 2011; MENNA-BARRETO e DE CASTRO, 2014). Com base neste fato, foi avaliado o $\Delta\Psi_m$ de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**, por 24 horas.

Primeiramente, os promastigotas foram tratados com **VOSalophen** a 27 ou 53 μM por 24 horas e incubados com JC-1 (Figura 9). Em células não tratadas (controle) a razão 600/528 foi 7,68. O tratamento com 27 ou 53 μM do composto levou a redução da razão 600/528 para 4,77 e 1,62, respectivamente. Células tratadas com miltefosina 21 μM por 24 horas foram utilizadas como controle positivo e este tratamento induziu redução da razão 600/528 para 1,87. Estes resultados mostram que o tratamento com **VOSalophen** induziu dano à mitocôndria de promastigotas de *L. amazonensis*, com despolarização do $\Delta\Psi_m$.

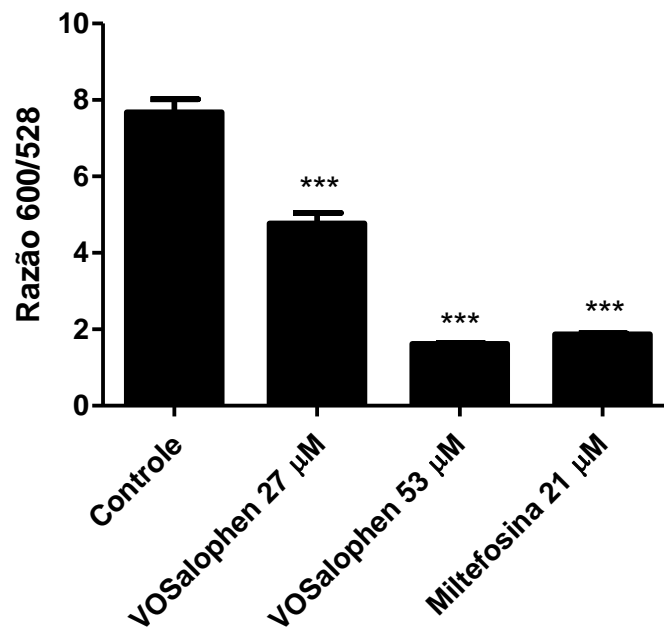


Figura 9: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas através de marcação com JC-1. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Para confirmar os dados obtidos com o JC-1, foi também utilizado o Mitotracker® Red CM-H2XROS para avaliar o $\Delta\Psi_m$ de células tratadas com **VOSalophen**. A Figura 10 mostra que o tratamento com 27 e 53 μM do composto induziu uma redução da intensidade de fluorescência do Mitotracker® Red CM-H2XROS, de 47,5% e 32,5%, respectivamente, comparado ao controle sem tratamento. Os tratamentos de promastigotas de *L. amazonensis* com FCCP 20 μM

e miltefosina 21 μM , por 24 horas, foram utilizados como controle positivo deste experimento e induziram redução da intensidade de fluorescência de 67,5% e de 12,5%, respectivamente, quando comparados ao controle não tratado (Figura 10). Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos com JC-1 e confirmam os danos mitocondriais ocasionados por **VOSalophen** em promastigotas de *L. amazonensis*.

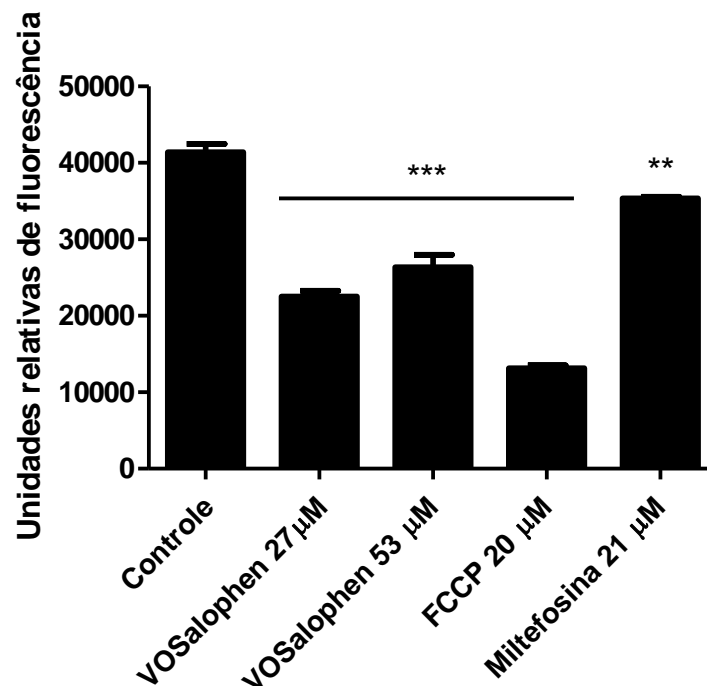


Figura 10: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas através de marcação com Mitotracker® Red CM-H2XRos. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) ; $p < 0,01$ (**). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Ainda com o intuito de confirmar os resultados de dano mitocondrial obtidos com o JC-1 e o Mitotracker® Red CM-H2XRos, foi realizado o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com **VOSalophen** a 27 e 53 μM , por 24 horas e em seguida as células foram marcadas com rodamina 123 (Tabela 8). A partir da marcação com a rodamina 123, foi calculado o índice de variação (IV), que é dado pela fórmula $(\text{MT}-\text{MC})/\text{MC}$, onde MT corresponde à mediana de fluorescência de parasitos tratados e MC é a mediana de fluorescência de parasitos controle. Valores

de IV negativos correspondem à depolarização do $\Delta\Psi_m$. Como pode ser observado na Tabela 8, tanto para **VOSalophen** (27 e 53 μM), quanto para miltefosina foram obtidos valores de IV negativos, o que mais uma vez confirma a ocorrência de despolarização $\Delta\Psi_m$ de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com este complexo de vanádio. Esses resultados, em conjunto, mostram que a mitocôndria de promastigotas de *L. amazonensis* é um alvo potencial de **VOSalophen**.

Tabela 8: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas e avaliadas por meio da marcação com rodamina 123.

Tratamento	IV*
Controle	0.00
VOSalophen 27 μM	-0,31
VOSalophen 53 μM	-0.78
Miltefosina 21 μM	-0.74

*Índice de variação (IV), obtido pela equação $(\text{MT}-\text{MC})/\text{MC}$, onde MT é a mediana de fluorescência dos parasitos tratados e MC é a mediana de parasitos não tratados (controle). Análises foram obtidas no *FCS Express V3*. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

A despolarização do $\Delta\Psi_m$ geralmente está relacionada à ocorrência de estresse oxidativo, com aumento da produção de EROs (CHANDRASEKARAN et al., 2013). Baseado neste fato, a produção de tais radicais foi avaliada em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**, por meio a marcação com H_2DCFDA . A Figura 11 mostra que o tratamento com 27 e 53 μM deste composto aumentou a produção de EROs em aproximadamente 3 e 2,5 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle não tratado. Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com miltefosina (21 μM), por 24 horas, foram utilizadas como controle positivo e este tratamento levou a um aumento dos níveis de EROs de cerca de 3 vezes, quando comparado ao controle.

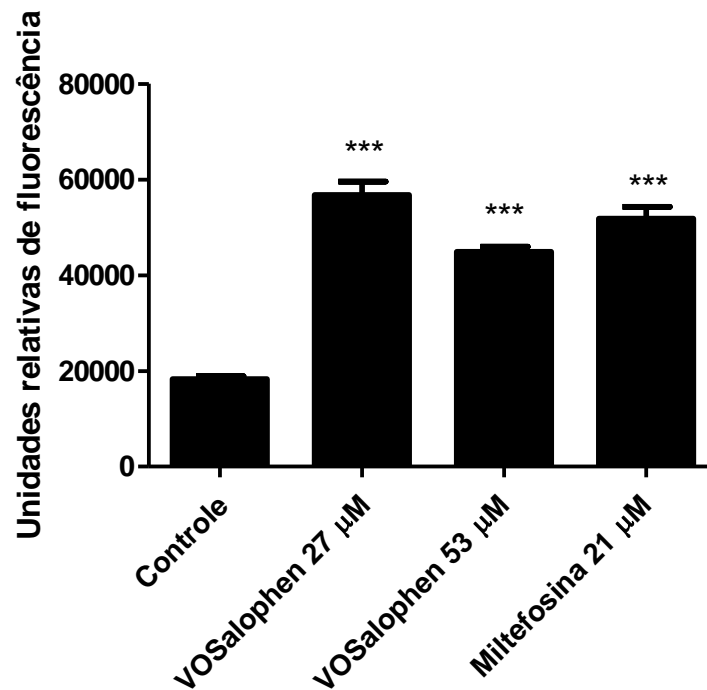


Figura 11: Produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas e posteriormente marcados com H_2DCFDA . Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Esses resultados mostram que parasitos tratados com **VOSalophen**, além de terem apresentado despolarização do $\Delta\Psi_m$ (Figuras 9 e 10 e Tabela 8), sofreram também estresse oxidativo, com o aumento da produção de EROs (Figura 11).

Na tentativa de esclarecer a sequência destes eventos (despolarização do $\Delta\Psi_m$ e produção de EROs), os parasitos foram tratados com **VOSalophen** em tempos mais curtos. Assim, promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com 27 e 53 μM do composto por 3 e 6 horas e em seguida as células foram marcadas, separadamente, com JC-1 para avaliação do $\Delta\Psi_m$ e com H_2DCFDA para avaliação dos níveis de EROs. A Figura 12 mostra que após 3 e 6 horas de tratamento com o composto já houve despolarização do $\Delta\Psi_m$, com redução da razão 600/528, em ambas as concentrações utilizadas. Após 3 horas, o tratamento com 27 e 53 μM induziu redução da razão 600/528 de 7,88 (controle não tratado) para 3,99 e 3,97, respectivamente. Após 6 horas, nas concentrações de 27 e 53 μM do composto houve redução da razão de 7,17 (controle) para 3,48 e 4,53, respectivamente.

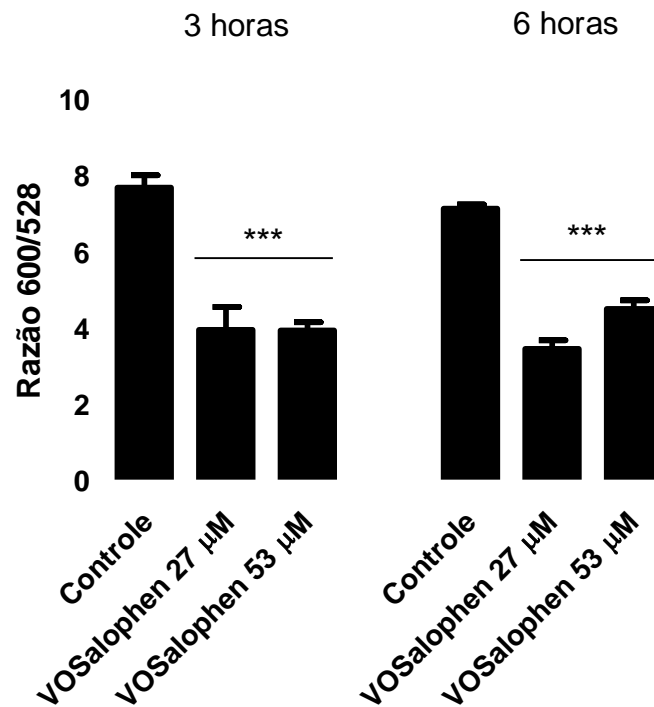


Figura 12: Alterações no $\Delta\Psi_m$ induzidas pelo tratamento de 3 e 6 horas com **VOSalophen** (27 e 53 μM) e avaliadas através de marcação com JC-1. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes, quando comparado ao grupo controle, foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes.

Com relação à produção de EROs, a análise da Figura 13 permite concluir que após 6 horas de tratamento com o composto houve aumento de produção de EROs, onde a incubação com 27 μM aumentou 1,58 vezes a produção desses radicais e o tratamento com 53 μM aumentou 1,81 vezes a produção de EROs. Entretanto, após 3 horas de incubação, não houve diferença de produção de EROs entre células não tratadas e células tratadas com ambas concentrações do composto. Esses resultados mostram que a despolarização do $\Delta\Psi_m$ antecede a produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto, o que remete ao fato de que talvez este composto atue como uma substância tóxica exógena, que induz danos à mitocôndria do parasito, com despolarização do $\Delta\Psi_m$. Em virtude deste fato, ocorre um aumento de produção de EROs, sendo que essa substância, uma vez produzida, também pode contribuir com a morte do parasito.

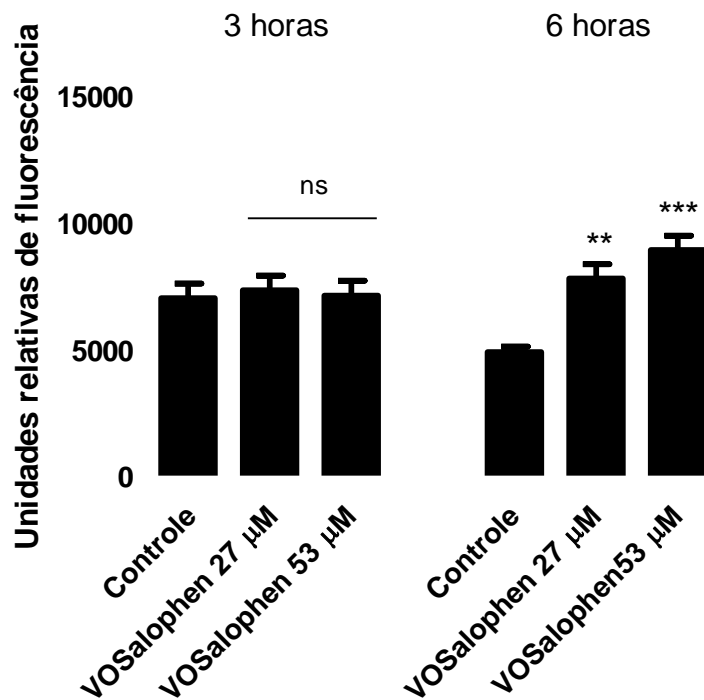


Figura 13: Produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 µM) por 3 e 6 horas e posteriormente marcados com H₂DCFDA. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes, quando comparado ao grupo controle, foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e não significativo (ns). Os dados foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes.

A disfunção mitocondrial pode induzir um acúmulo de corpos lipídicos no interior das células (LEE et al., 2013). Com base neste fato e sabendo que **VOSalophen** causa disfunção mitocondrial em *L. amazonensis*, foi avaliado o acúmulo de lipídeos neutros em formas promastigotas tratadas com este composto. A ocorrência desta alteração celular foi determinada por meio da marcação com Nile Red. A Figura 14 mostra que o tratamento com **VOSalophen** a 27 e 53 µM induziu aumento de 86% e 98% do acúmulo de lipídeos neutros, respectivamente, quando comparado ao controle não tratado. Miltefosina 21 µM foi utilizada como controle positivo e induziu um aumento de 22% do acúmulo de lipídeos neutros no interior das células.

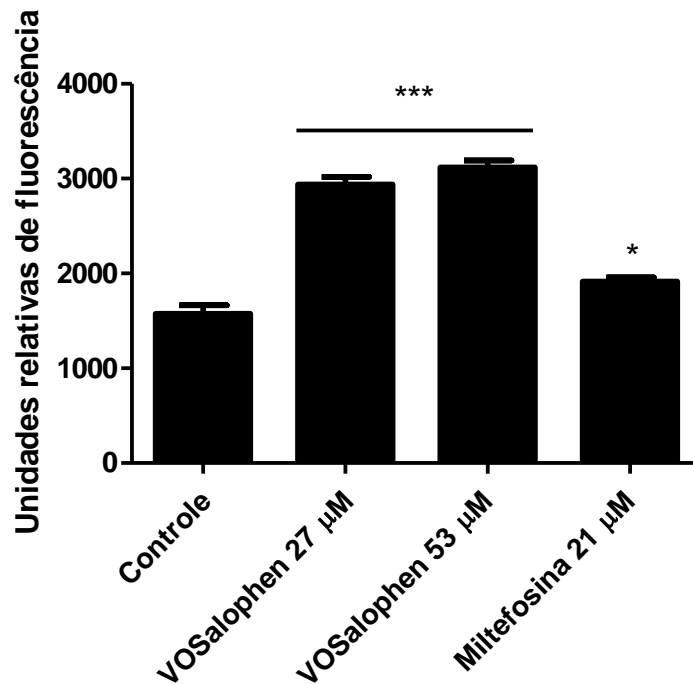


Figura 14: Acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (27 e 53 µM) por 24 horas e posteriormente marcados com Nile Red. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) e $p < 0,05$ (*). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

O aspecto morfológico de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen** também foi avaliado. Após 24 horas de incubação com 27 e 53 µM do composto, foram observadas alterações na morfologia das células (Figura 15). Verifica-se a presença de parasitos contendo mais de um flagelo (setas azuis), e parasitos com formato do corpo arredondado (setas vermelhas), em ambas as concentrações testadas (Figuras 15B - 27 µM; 15C e D - 53 µM), diferentemente do controle não tratado (Figura 15A), em que os parasitos apresentaram apenas um flagelo e corpo celular alongado. Outra alteração que pode ser observada em promastigotas tratadas com **VOSalophen** (27 e 53 µM) é a redução do volume da célula, quando comparado ao controle não tratado (Figura 15).

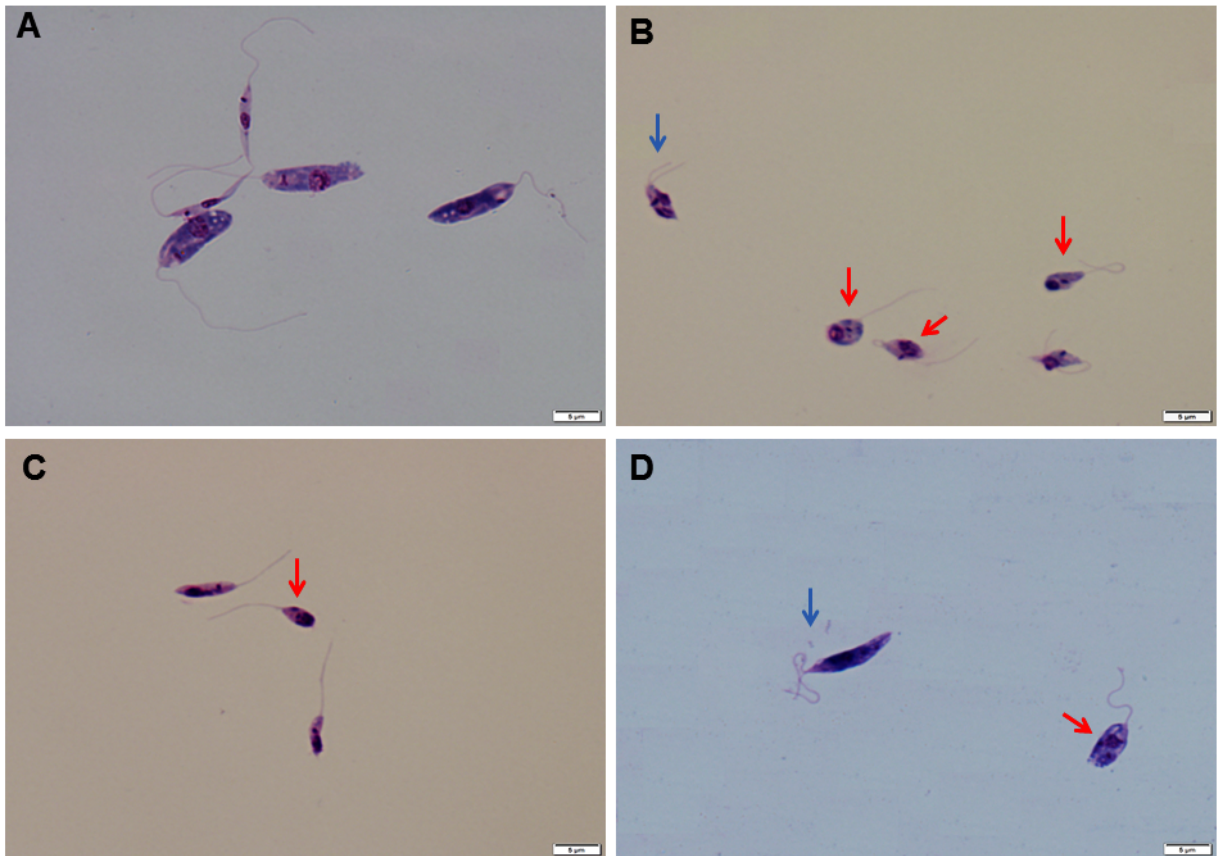


Figura 15: Fotomicrografia ilustrativa do efeito de **VOSalophen** (27 e 53 μM) em promastigotas de *L. amazonensis*, após 24 horas de tratamento. **(A)** Controle **(B)** **VOSalophen** 27 μM **(C e D)** **VOSalophen** 53 μM . Após tratamento as células foram fixadas com etanol, coradas com Giemsa e analisadas em microscópio ótico. As setas azuis indicam parasitos com dois flagelos e as setas vermelhas indicam parasitos com o corpo arredondado. Escala da barra = 5 μm .

No intuito de confirmar a redução do volume celular observada durante a análise das lâminas pela microscopia óptica, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas ou não com **VOSalophen** e em seguida foram analisadas em citômetro de fluxo para avaliação do parâmetro FSC, que tem relação com o volume celular. A Figura 16 mostra que o tratamento com **VOSalophen** a 27 e 53 μM realmente induziu uma redução do volume dos promastigotas após 24 horas de tratamento. Analisando a população de células no quadrante inferior esquerdo (3° quadrante), verifica-se que no controle há 12,77% de células, e esta porcentagem aumentou para 20,44% e 39,48% após o tratamento com 27 e 53 μM do composto, respectivamente. O tratamento com miltefosina (42 μM) por 24 horas foi utilizado como controle positivo e também induziu uma redução do volume das células, onde no 3° quadrante foram observadas 80,81% das células (Figura 16).

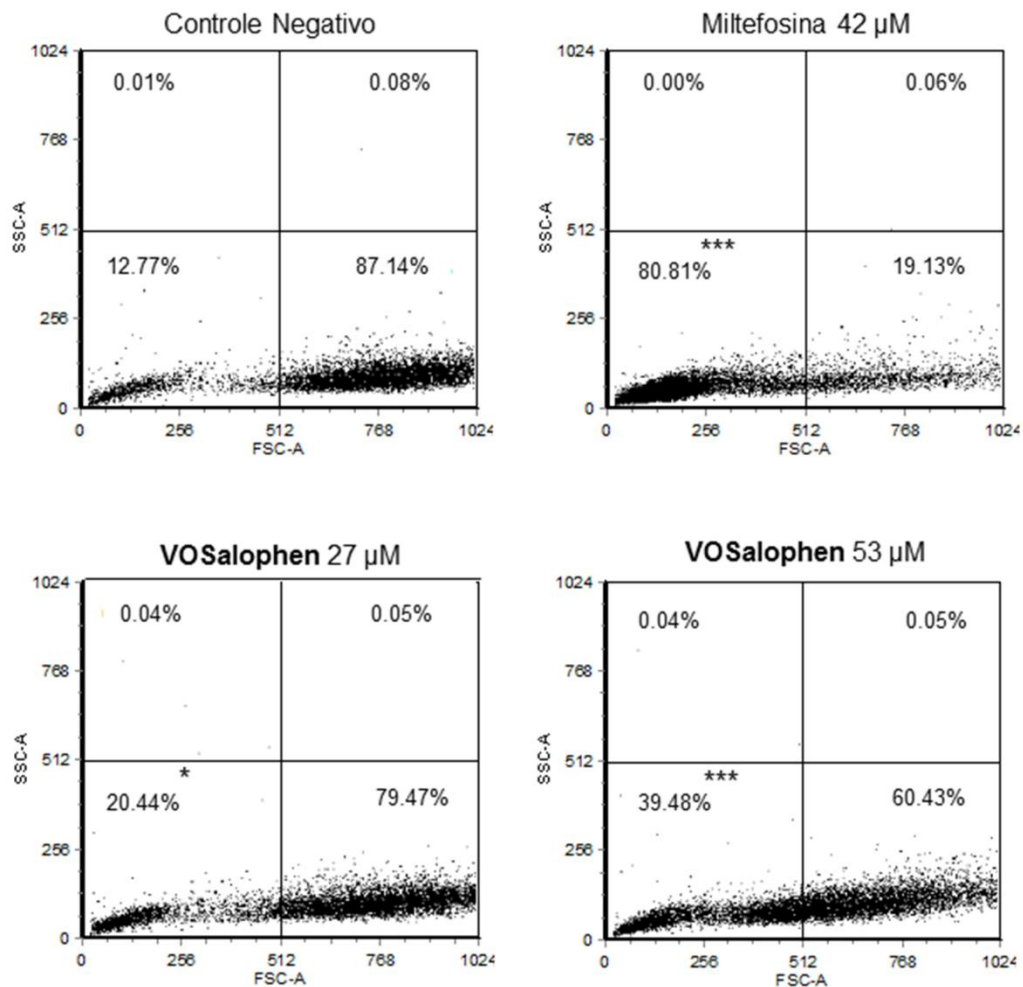


Figura 16: Volume dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas. O tamanho celular foi avaliado através de citometria de fluxo, onde 10.000 eventos foram analisados, observando o FSC (Forward Scatter), que tem relação com o volume da célula. Análises foram obtidas no *FCS Express V3*. As análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism 5.0* usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) e $p < 0,05$ (*). Os dados foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes.

Foi ainda avaliado o tamanho (corpo + flagelo) dos promastigotas tratados com **VOSalophen**. Para isto foram utilizados recursos do programa CellSens. A análise da Figura 17 permite concluir que o tratamento com este composto também induziu redução do tamanho dos promastigotas de *L. amazonensis*. No controle não tratado os parasitos apresentam média de tamanho de 24,75 μm , o qual foi reduzido, em média, para 19,19 μm e 16,14 μm , em promastigotas tratados com 27 e 53 μM de **VOSalophen**, respectivamente.

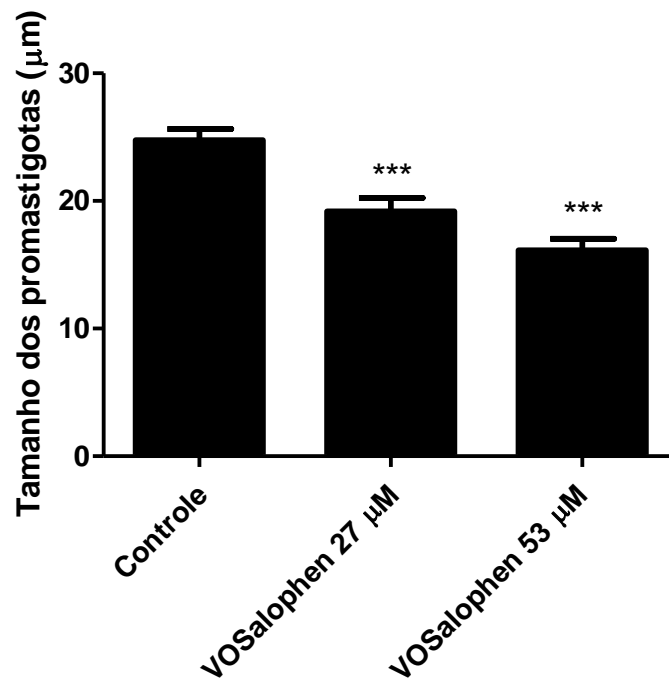


Figura 17: Tamanho (corpo + flagelo) dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 µM) por 24 horas. O tamanho celular foi avaliado por meio de medidas do corpo + flagelo dos parasitos, em lâminas fixadas com etanol e coradas com Giemsa, por microscopia ótica. As medidas foram realizadas com recursos do programa CellSens. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) . Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Dando continuidade à avaliação do mecanismo de ação de **VOSalophen** em promastigotas de *L. amazonensis*, foi avaliada a permeabilidade da membrana plasmática dos parasitos tratados com este composto, por 24 horas. Para esta avaliação, foi realizada a marcação com PI e em seguida as células foram analisadas por citometria de fluxo (Figura 18) e por fluorimetria (Figura 19).

Por citometria de fluxo, a Figura 18 mostra que não houve diferenças das intensidades de fluorescência do PI entre o controle e os tratamentos com **VOSalophen** a 27 e 53 µM. O mesmo não pode ser dito sobre o controle positivo (promastigotas aquecidos a 65°C por 10 minutos), que apresentou intensidade de fluorescência mais elevada quando comparado ao controle.

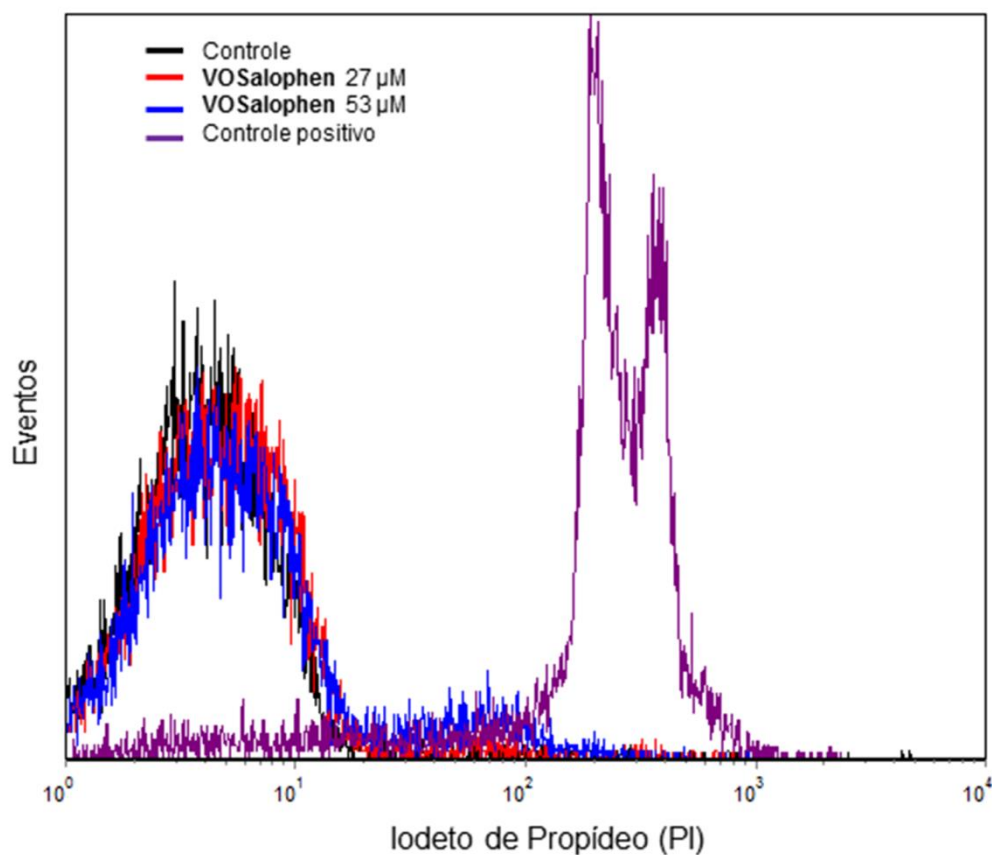


Figura 18: Integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (27 e 53 μ M) por 24 horas, marcados com PI e avaliados por citometria de fluxo, onde 10.000 eventos foram analisados. A figura mostra a representação da intensidade de fluorescência para PI. Análises foram obtidas no *FCS Express V3*. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Promastigotas aquecidos a 65°C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo.

A Figura 19 mostra a avaliação da integridade da membrana plasmática por fluorimetria, e é possível verificar que após 24 horas de tratamento com **VOSalophen** nas concentrações de 27, 53, 106 e 160 μ M, não houve alteração na integridade da membrana plasmática dos parasitos. Esses dados mostram que mesmo em concentrações elevadas, como em 106 e 160 μ M, concentrações correspondentes a 16 e 24 vezes o CI_{50} em promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento, não houve danos à membrana plasmática das células, uma vez que não foi observada marcação pelo PI, cuja molécula só consegue penetrar na célula e marcar o DNA em caso de perda da integridade da membrana plasmática. Estes resultados corroboraram com os dados obtidos por citometria de fluxo, em que ambos mostram que a membrana plasmática dos parasitos

permaneceu íntegra após o tratamento com **VOSalophen**. Este conjunto de resultados indica que este composto parece não induzir morte por necrose nestes parasitos, visto que células necróticas apresentam como uma das características principais a perda da integridade da membrana plasmática, com aumento da permeabilidade e consequente lise celular (BORGES et al., 2016).

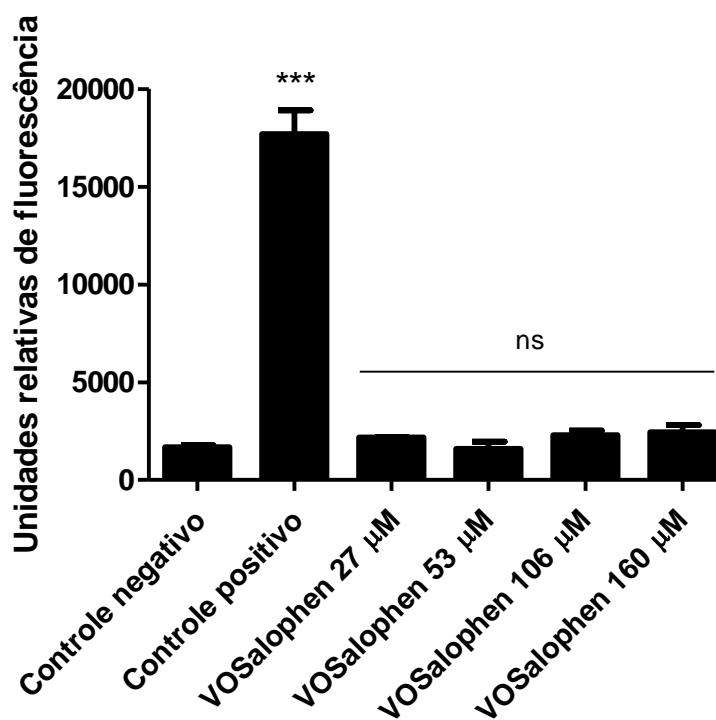


Figura 19: Integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (27, 53, 106 e 160 µM) por 24 horas, marcados com PI e avaliados por fluorimetria. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) e não significativo (ns). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Promastigotas aquecidos a 65°C por 10 minutos foram utilizados como controle positivo.

A perda de volume celular associada à membrana plasmática intacta é considerada marco de células em processo de apoptose (GANNAVARAM e DEBRABANT, 2012). Como essas duas características foram observadas em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com **VOSalophen**, a possibilidade de ocorrência de morte por apoptose-like, foi investigada, por meio da determinação da externalização de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática (Figura 20) e da avaliação da fragmentação do DNA dos parasitos

(Figura 21), pois esses dois processos constituem duas características-chave de células em apoptose (KACZANOWSKI, SAJID e REECE, 2011; EL-HANI et al., 2012).

A Figura 20 mostra que o tratamento com **VOSalophen** aumentou significativamente a exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. amazonensis*. No controle negativo, 12,42% das células apresentavam este fosfolípido exposto na face externa da membrana plasmática e em células tratadas com 27 e 53 μM deste composto esta porcentagem subiu para 82,52% e 87,05%, respectivamente.

Para controlar a integridade da membrana plasmática dos parasitos e eliminar a possibilidade de marcação de fosfatidilserina presente na porção interna da membrana plasmática dos promastigotas, foi realizada, em paralelo ao uso de anexina V-FITC, uma marcação com PI. Pode-se verificar, através da análise da Figura 20, que não houve aumento significativo da porcentagem de células duplamente positivas para anexina V-FITC/PI, o que mostra que realmente a anexina V-FITC está marcando fosfatidilserina presente na face externa da membrana dos parasitos, e não na interna. Este conjunto de dados sugere a possibilidade de ocorrência de apoptose-like em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o **VOSalophen**.

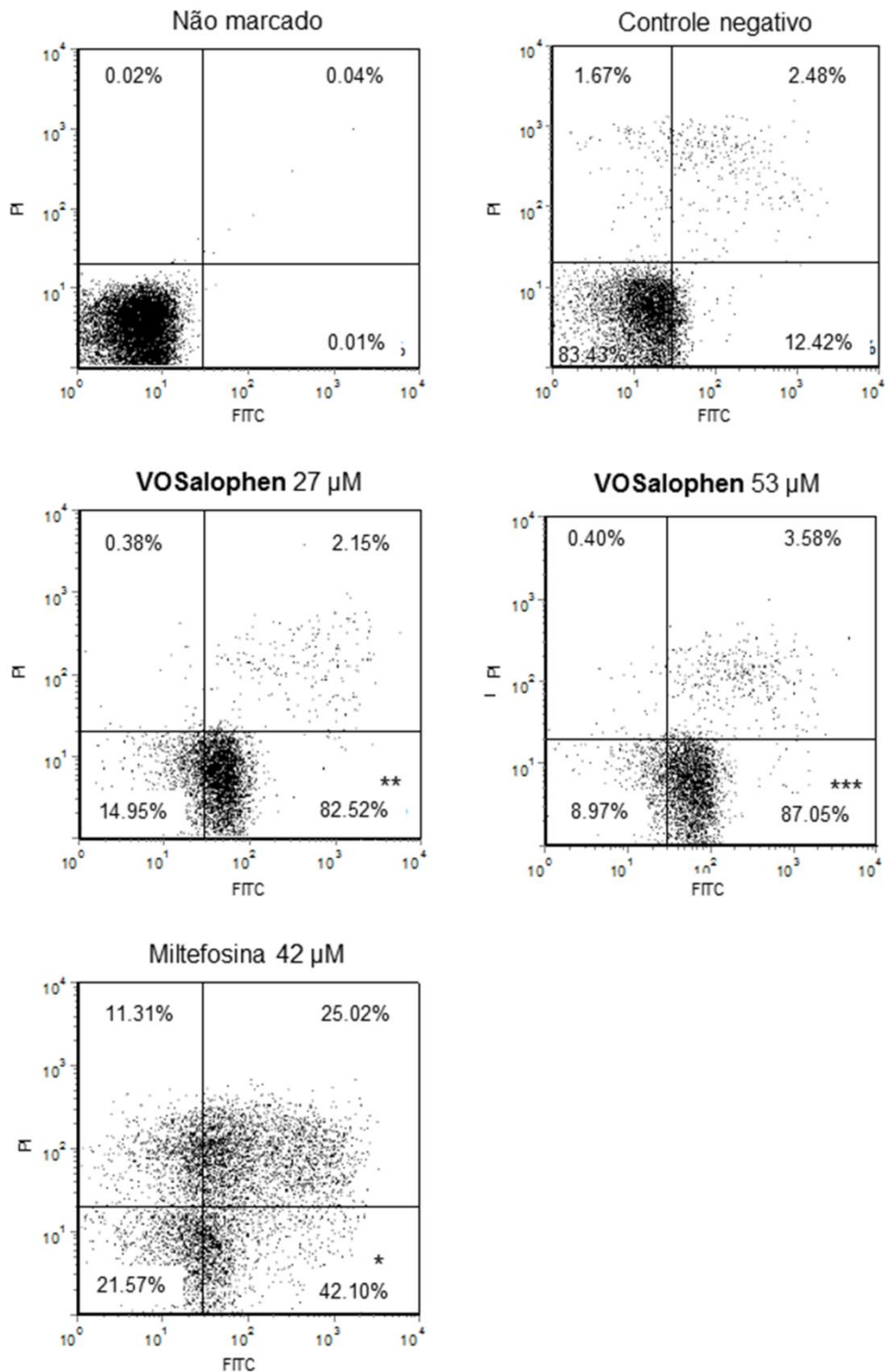


Figura 20: Externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas. As células foram duplamente marcadas com anexina V-FITC e PI e em seguida foram avaliadas por citometria de fluxo. Análises foram obtidas no *FCS Express V3*. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e $p < 0,05$ (*). Os dados foram obtidos a partir de 4 experimentos independentes.

No intuito de confirmar a ocorrência de apoptose-like em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen**, foi verificada a possibilidade de fragmentação do DNA dos parasitos, por meio da utilização da técnica TUNEL. A Figura 21 mostra que o tratamento com este composto induziu a fragmentação do DNA dos promastigotas, visto que ocorreu marcação do DNA dos parasitos com FITC, o que não foi verificado no controle não tratado. Estes dados confirmam a possibilidade de ocorrência de apoptose-like em formas promastigotas, após o tratamento com o **VOSalophen**. Promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 5 µg/mL de DNase por 10 minutos, foram utilizados como controle positivo e também apresentaram fragmentação do DNA (Figura 21).

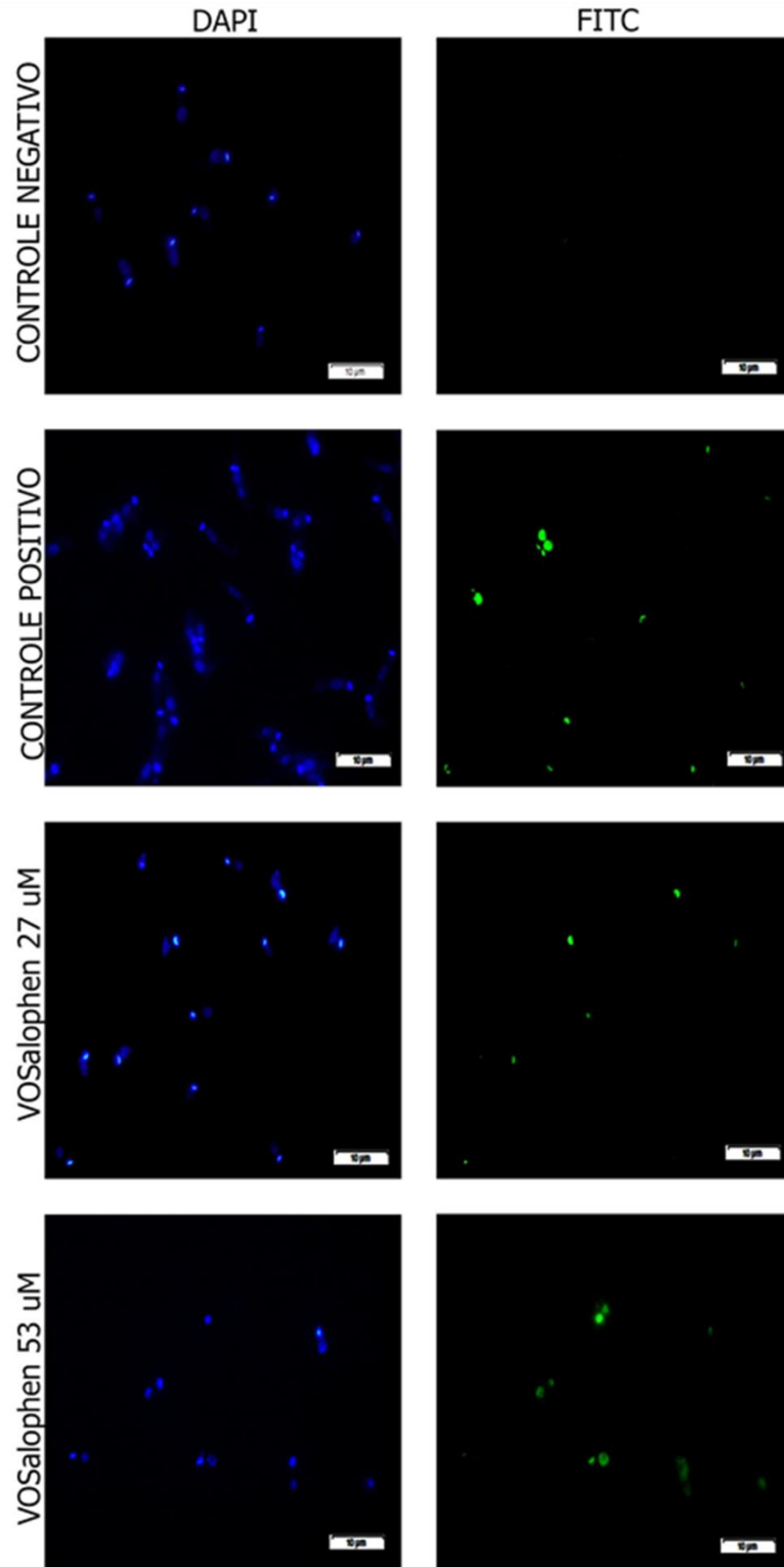
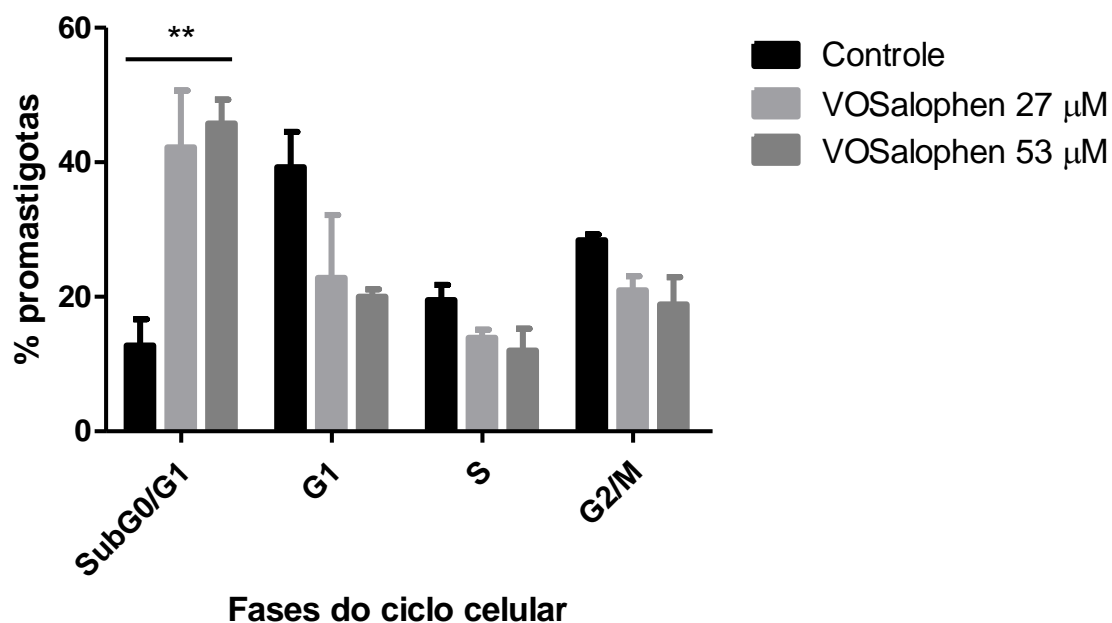


Figura 21: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da fragmentação do DNA de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 μM) por 24 horas. As células foram processadas, marcadas com o kit TUNEL de acordo com as instruções do fabricante e analisadas em microscópio de fluorescência. Escala da barra = 10 μm . Promastigotas de *L. amazonensis* tratados com 5 $\mu\text{g/mL}$ de DNase por 10 minutos, foram utilizados como controle positivo.

Ainda com relação à possibilidade de ocorrência de apoptose-like nos parasitos, foram avaliadas as alterações no ciclo celular induzidas pelo tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com **VOSalophen**. Para realizar este teste, formas promastigotas, tratadas ou não com este composto, por 24 horas, foram permeabilizadas com etanol 70%, marcadas com PI e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo, no intuito de avaliar o conteúdo de DNA presente nas células e com isso atribuir em qual etapa do ciclo celular elas se encontravam. Esses resultados são mostrados na Figura 22.

A Figura 22A mostra que houve um aumento significativo na porcentagem de células na fase sub G0/G1, após o tratamento com **VOSalophen** a 27 e 53 μM , quando comparada ao controle não tratado. Na figura 22B, os mesmos resultados são apresentados, porém em forma de tabela, e pode ser verificado que o tratamento com o composto a 27 e 53 μM , aumentou significativamente a porcentagem de células presentes na fase sub G0/G1 (41,33% e 49,33%, respectivamente) em relação ao controle não tratado (16,69%). Nas demais fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) foi observada uma redução da porcentagem de promastigotas, quando comparado ao controle (Figura 22). Neste momento, é válido destacar que células presentes na fase sub G0/G1 do ciclo celular correspondem às células com conteúdo muito baixo de DNA. As mesmas apresentam conteúdo de DNA abaixo de 1 x DNA, que é encontrado em células presentes na fase G1 do ciclo celular e devido a este fato, é possível dizer que correspondem à células com DNA fragmentado (RIBEIRO, 2011). Esses dados de fragmentação de DNA estão de acordo com aqueles obtidos pela utilização do TUNEL e mais uma vez confirmam a possibilidade de ocorrência de morte por apoptose-like em promastigotas de *L. amazonensis*.

(A)



(B)

Fases do Ciclo Celular	Controle	VOSalophen 27 µM	VOSalophen 53 µM
Sub G0/G1	16,69%	41,33%	49,33%
G1	33,97%	22,84%	18,99%
S	21,76%	12,75%	8,75%
G2/M	27,58%	23,08%	22,93%

Figura 22: Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (27 e 53 µM) por 24 horas. Após o tratamento, as células foram permeabilizadas com etanol 70% e marcadas com PI para a avaliação, por citometria de fluxo, do conteúdo de DNA presente nas células. (A) Porcentagem de células presentes em cada fase do ciclo celular, resultados apresentados na forma de gráfico. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* 5.0 usando análise de variância (Two-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Bonferroni: $p < 0,01$ (**). (B) Porcentagem de células presentes em cada fase do ciclo celular, resultados apresentados na forma de tabela. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Foi também avaliada a possível ocorrência de autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen**. Para isto foi realizada uma marcação com MDC, um marcador de vacúolos autofágicos, e as amostras foram avaliadas por microscopia de fluorescência (Figura 23).

A análise da Figura 23 permite concluir que promastigotas tratados com **VOSalophen** (27 e 53 μM) e marcados com MDC apresentam estruturas circulares marcadas de azul, que correspondem aos vacúolos autofágicos (Figura 23C e D). Este fato não foi observado nos campos fotografados das lâminas correspondentes ao controle não tratado (Figura 23A). Esses resultados mostram que além da ocorrência de apoptose-like em células tratadas com **VOSalophen**, a autofagia também parece ocorrer em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com este composto.

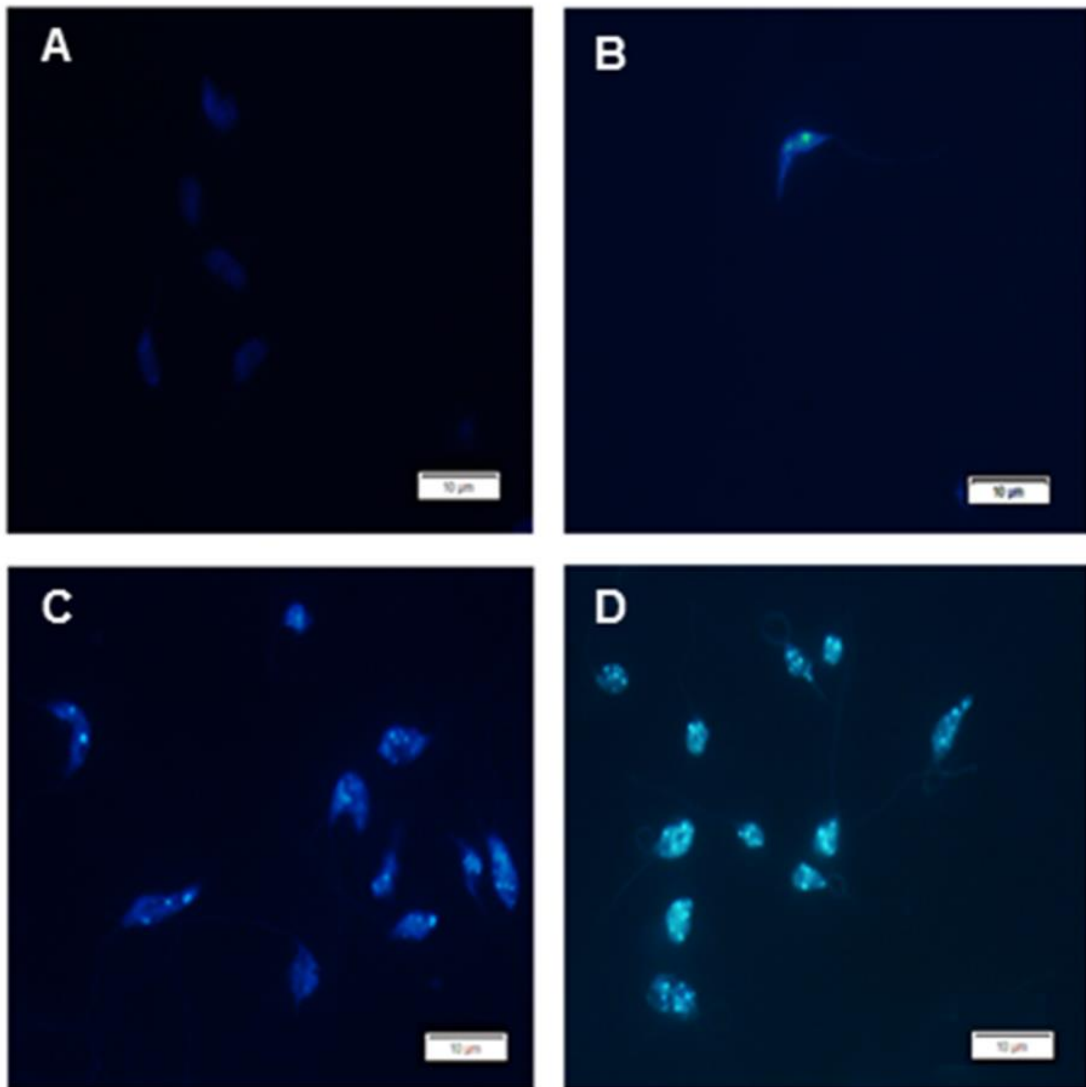


Figura 23: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da ocorrência de autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** por 24 horas. (A) Controle negativo; (B) controle positivo; (C) **VOSalophen** 27 μM e (D) **VOSalophen** 53 μM . As células foram fixadas com PA 4%, marcadas com MDC e avaliadas por microscopia de fluorescência. Promastigotas cultivados em PBS (condição de privação de aminoácidos) por 24 horas foram utilizados como controle positivo. Escala da barra = 10 μm .

Finalmente, foram avaliadas as possíveis alterações ultraestruturais desencadeadas em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com **VOSalophen**, por meio da realização de microscopia eletrônica de transmissão (MET), representada na Figura 24. A Figura 24A mostra que parasitos não tratados exibiam uma ultraestrutura normal das organelas, tais como mitocôndria, cinetoplasto e núcleo. O tratamento de promastigotas com **VOSalophen** causou alterações ultraestruturais drásticas (Figura 24B-D). **VOSalophen** induziu dano severo à mitocôndria do parasito, refletido por inchaço mitocondrial (setas brancas), com presença de estruturas de membrana concêntricas dentro desta organela (pontas de setas pretas). É importante destacar que essas alterações estão compatíveis com dados encontrados anteriormente, onde foram detectadas alterações no $\Delta\Psi_m$ e aumento da produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com este complexo de vanádio. Na MET também foram observadas vesículas dentro dos vacúolos (setas pretas), vacúolos autofágicos (asteriscos) e aumento do número de flagelos (pontas de setas brancas) (Figura 24B-I). A presença de vacúolos autofágicos estão de acordo com o que já havia sido mostrado anteriormente, por meio da marcação de promastigotas com MDC e o encontro de um número aumentado de flagelos também corrobora com dados anteriores, durante a análise morfológica dos parasitos tratados com **VOSalophen**.

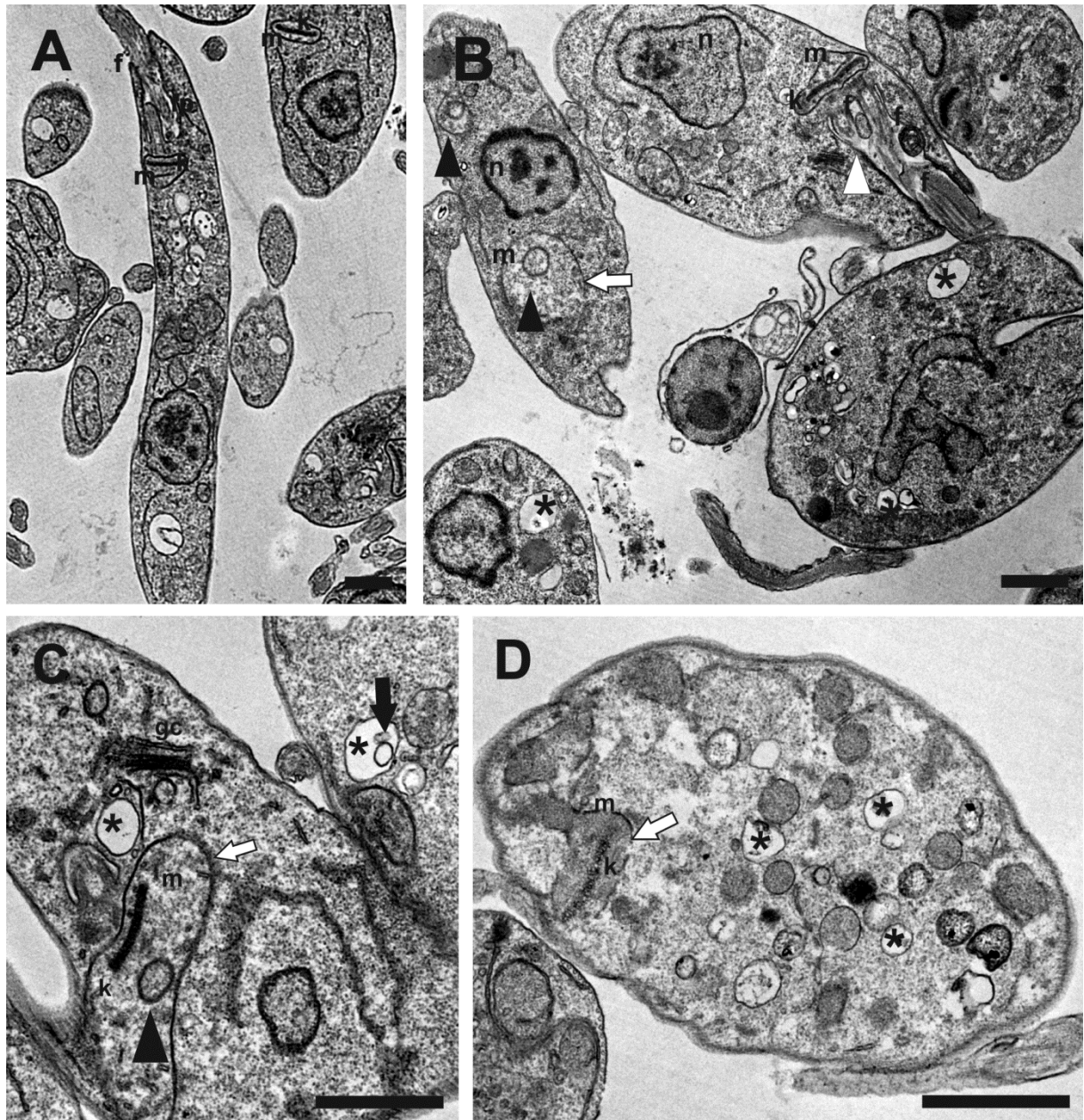


Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** ($13 \mu\text{M}$) por 24 horas. (A) Parasitos não tratados e (B - D) Parasitos tratados com VOSalophen $13 \mu\text{M}$. As setas brancas indicam mitocôndria inchada. As pontas de seta pretas indicam a presença de estruturas de membrana concêntricas dentro da mitocôndria. As setas pretas indicam a presença de vesículas dentro dos vacúolos. O asterisco indica vacúolos autofágicos. As pontas de seta brancas representam aumento no número de flagelos. N, núcleo; M, mitocôndria; K, cinetoplasto; F, flagelo; Gc, complexo de Golgi. Escala da barra = $1 \mu\text{m}$.

Até este momento, alterações celulares e moleculares compatíveis com morte por apoptose-like e autofagia foram observadas em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**. Em seguida, foi investigado se este composto poderia exercer um efeito letal e definitivo sobre os parasitos ou se os mesmos poderiam se recuperar do efeito do composto e reestabelecerem uma

cultura celular quando re-incubados em meio de cultura fresco e livre do composto. Para isto, promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados ou não com **VOSalophen** por 24 horas, lavados com PBS, transferidos para meio de cultura sem a presença deste composto e foram novamente incubados por 24, 48 e 72 horas. Em seguida foi realizado o teste colorimétrico do MTT.

A Figura 25 mostra a densidade óptica obtida após 24, 48 e 72 horas de incubação dos parasitos em meio de cultura fresco. Verifica-se que parasitos tratados com a concentração mais baixa de **VOSalophen** (27 μM) conseguem recuperar seu crescimento, pois após 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura sem o composto, eles já conseguem atingir densidades ópticas semelhantes ao grupo controle não tratado (Figura 25). Parasitos tratados com a concentração mais alta de **VOSalophen** (53 μM) também conseguiram recuperar a cultura, visto que ao longo do tempo houve um discreto aumento da densidade óptica, entretanto esta recuperação ocorreu com maior dificuldade, uma vez que em nenhum dos momentos analisados, a densidade óptica de parasitos tratados com 53 μM atingiu níveis semelhantes à de parasitos não tratados (Figura 25).

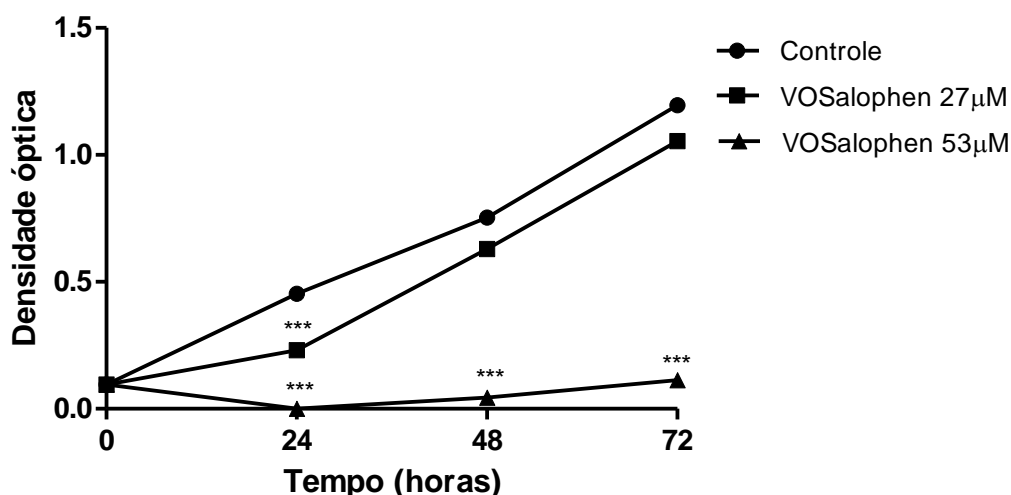


Figura 25: Análise da reversibilidade do efeito de **VOSalophen** (27 e 53 μM) no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* após 24, 48 e 72 horas de incubação em meio de cultura fresco. A viabilidade celular foi avaliada pelo método do MTT. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes.

Além disso, foi avaliada se ocorria alterações na capacidade de infectividade dos parasitos tratados com **VOSalophen** a 27 e 53 μM , e colocados para interagir com macrófagos em meio sem droga. Para isto, promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas ou não com este composto por 24 horas, lavados com PBS para a retirada do **VOSalophen** e recuperados em meio de cultura fresco. Em seguida, esses parasitos foram colocados em contato com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c.

Os parasitos tratados com o composto, que conseguiram se recuperar em meio de cultura fresco, tiveram a mesma capacidade de infectar macrófagos peritoneais de camundongos, quando comparado ao controle sem tratamento. Como mostrado na Figura 26, tanto a porcentagem de células infectadas (Figura 26A), quanto o número de amastigotas (Figura 26B) são semelhantes no controle e nos tratamentos com 27 e 53 μM de **VOSalophen**. Esses resultados mostram que apesar deste complexo de vanádio induzir morte celular por apoptose-like e autofagia em promastigotas de *L. amazonensis*, é necessário uma pressão da droga até a completa morte dos parasitos, ou seja, os parasitos precisam estar em contato direto com o composto até a morte de todas as células presentes.

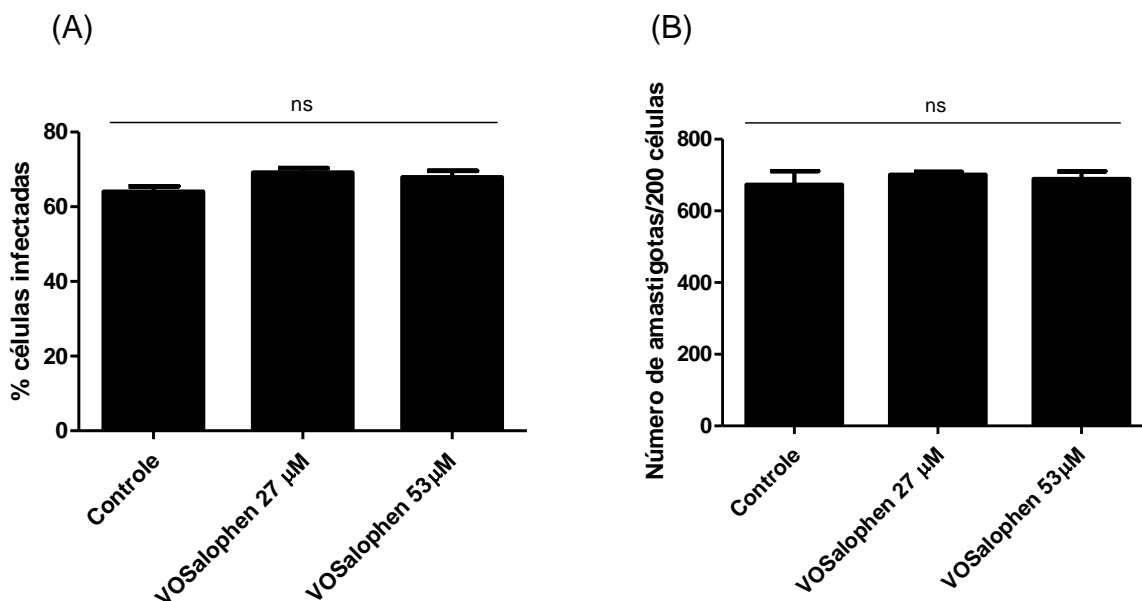


Figura 26: Análise da infectividade de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o **VOSalophen** (27 e 53 µM) e recuperados em meio de cultura sem droga. (A) % de células infectadas, (B) número de amastigotas intracelulares/200 macrófagos. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: *não significativo* (ns). Os dados foram obtidos a partir de 2 experimentos independentes.

4.2.3 Estudo *in vitro* do mecanismo de ação do composto VOSalophen em amastigotas de *L. amazonensis*

Inicialmente, foi determinado o efeito de **VOSalophen** em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, em diferentes concentrações e após 72 horas de tratamento. A Figura 27 mostra que, assim como ocorreu em promastigotas, o efeito deste composto em amastigotas intracelulares é dose dependente, ou seja, quanto maior a concentração do composto, menor é a porcentagem de amastigotas viáveis. O CI_{50} deste composto em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, após 72 horas de tratamento, é 3,51 µM e já foi apresentado na Parte I deste trabalho (Tabela 4).

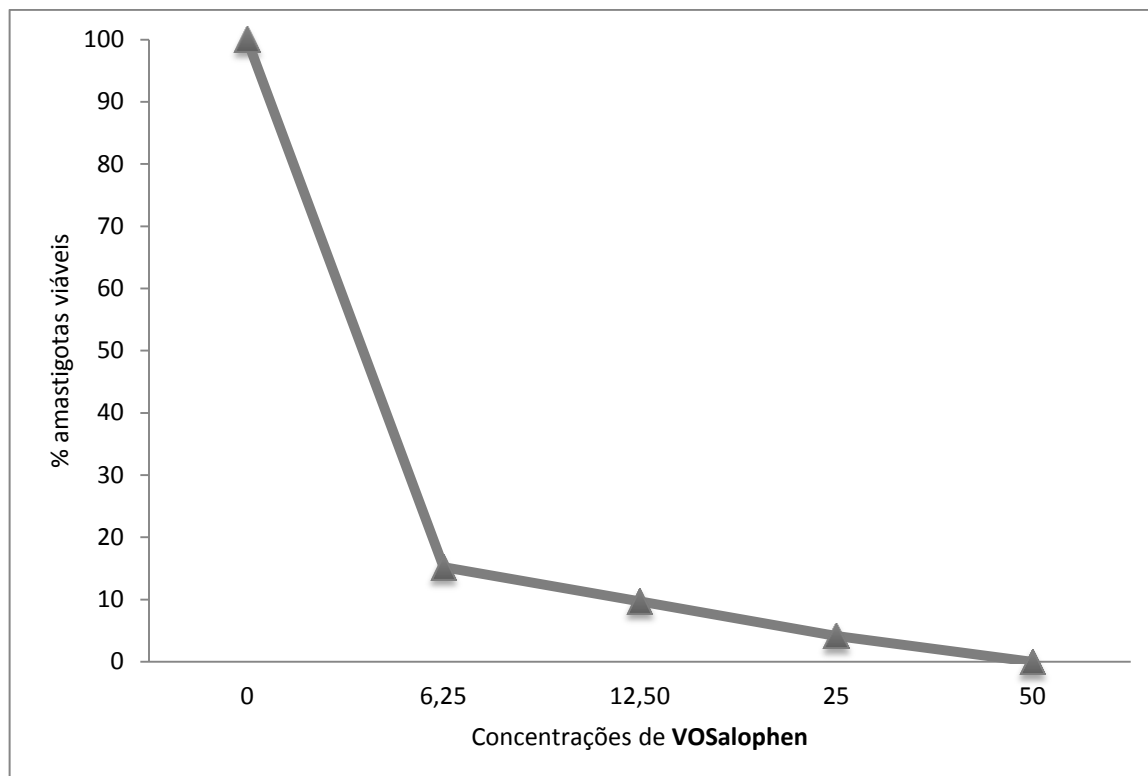


Figura 27: Efeito de **VOSalophen** no crescimento de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* durante 72 horas de tratamento. Macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* e em seguida tratados com **VOSalophen**, em diferentes concentrações. A viabilidade celular foi avaliada por meio da contagem dos parasitos presentes no interior dos macrófagos. O gráfico foi construído utilizando Microsoft Excel 2010, com valores correspondentes à média de 3 experimentos independentes.

Além disso, foi também avaliado se **VOSalophen** apresentaria efeito em amastigotas extracelulares de *L. amazonensis*, visto que este complexo de vanádio apresentou significativo efeito em promastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares desta espécie de *Leishmania*. Para avaliar o efeito do composto em amastigotas extracelulares de *L. amazonensis*, células Vero foram infectadas com formas promastigotas desta mesma espécie e após 72 horas, os amastigotas foram recuperados no sobrenadante das culturas de células Vero. Após contagem dessas formas, as mesmas foram incubadas com o composto por 72 horas e o efeito antiparasitário foi avaliado pelo método do MTT. Foi então calculado o CI_{50} deste composto, bem como do resveratrol **1** e dos compostos de referência, miltefosina e anfotericina B (Tabela 9). A Tabela 9 mostra também os InSe e InEs desses compostos em amastigotas axênicos de *L. amazonensis*.

Tabela 9: Efeito de **VOSalophen**, resveratrol **1**, miltefosina e anfotericina B sobre amastigotas axênicas de *L. amazonensis*.

Compostos	CI ₅₀ * (µM)	InSe**	InEs***
<i>L. amazonensis</i>			
VOSalophen	5,46 ± 0,94	4,45	1,55
Resveratrol 1	57,24 ± 4,39	1,53	1,34
Miltefosina	2,16 ± 0,15	61,11	0,52
Anfotericina B	0,59 ± 0,06	145,44	3,27

*CI₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Valores obtidos pelo programa Grafit. **InSe (Índice de Seletividade), calculado pela fórmula: CC₅₀ em macrófagos peritoneais/CI₅₀ em formas amastigotas extracelulares de *L. amazonensis*. ***InEs (Índice de Especificidade), calculado pela fórmula: CI₅₀ em formas amastigotas extracelulares/CI₅₀ em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

O composto **VOSalophen** foi efetivo em amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, com o CI₅₀ de 5,46 µM e ainda apresentou-se 4,45 vezes mais tóxico para essas formas extracelulares, quando comparado à célula hospedeira (Tabela 9). É interessante destacar que o valor do CI₅₀ deste composto em amastigotas axênicas é muito próximo ao valor do CI₅₀ do mesmo em promastigotas de *L. amazonensis* (6,65 µM - Tabela 2). Calculando o InEs e considerando a classificação de Muylder et al. (2011), já descrita na Parte I deste trabalho, pode-se verificar que este composto apresenta efeito semelhante em promastigotas e amastigotas axênicas (InEs = 1,22) de *L. amazonensis*. Seguindo o mesmo raciocínio, **VOSalophen** também apresenta efeito semelhante em amastigotas extracelulares e amastigotas intracelulares (CI₅₀ = 3,51 µM - Tabela 4), com InEs = 1,55 (Tabela 9).

É válido destacar que o resveratrol **1** também foi efetivo em amastigotas axênicas do *L. amazonensis*, com CI₅₀ de 57,24 µM, entretanto, **VOSalophen** apresentou-se cerca de 10 vezes mais efetivo nesta forma do parasito do que o resveratrol **1**. Miltefosina e anfotericina B foram utilizados como compostos de referência e apresentaram CI₅₀ de 2,16 e 0,59 µM, respectivamente (Tabela 9).

Observando a especificidade do **VOSalophen** entre promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (InEs = 1,89 - Tabela 7), observa-se que este composto apresenta efeito semelhante nestas formas parasitárias, as quais estão presentes naturalmente durante o ciclo evolutivo deste parasito. Isto induz a

pensar que este composto possa apresentar os mesmos alvos celulares em ambos os estágios. Portanto, a indução de apoptose-like em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen** e a grande importância deste processo na morte deste parasito levaram à investigação da ocorrência deste tipo de morte celular em amastigotas intracelulares. Para isto, foi determinada a fragmentação do DNA em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, o qual foi realizado por meio da técnica TUNEL. A Figura 28 mostra que o tratamento com **VOSalophen** a 14 μ M induziu fragmentação do DNA dos amastigotas intracelulares, visto ser possível observar marcação do DNA dos parasitos com FITC, o que não foi verificado no controle sem tratamento. Estes dados confirmam a possibilidade de ocorrência de apoptose-like em formas amastigotas intracelulares, após o tratamento com **VOSalophen**. É válido destacar que este tratamento não induziu a fragmentação do DNA dos macrófagos, o que confirma a seletividade deste composto pelo parasito intracelular. Macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com 10 μ g/mL de DNase por 20 minutos, foram utilizados como controle positivo e este tratamento também induziu fragmentação do DNA dos parasitos e dos macrófagos (Figura 28).

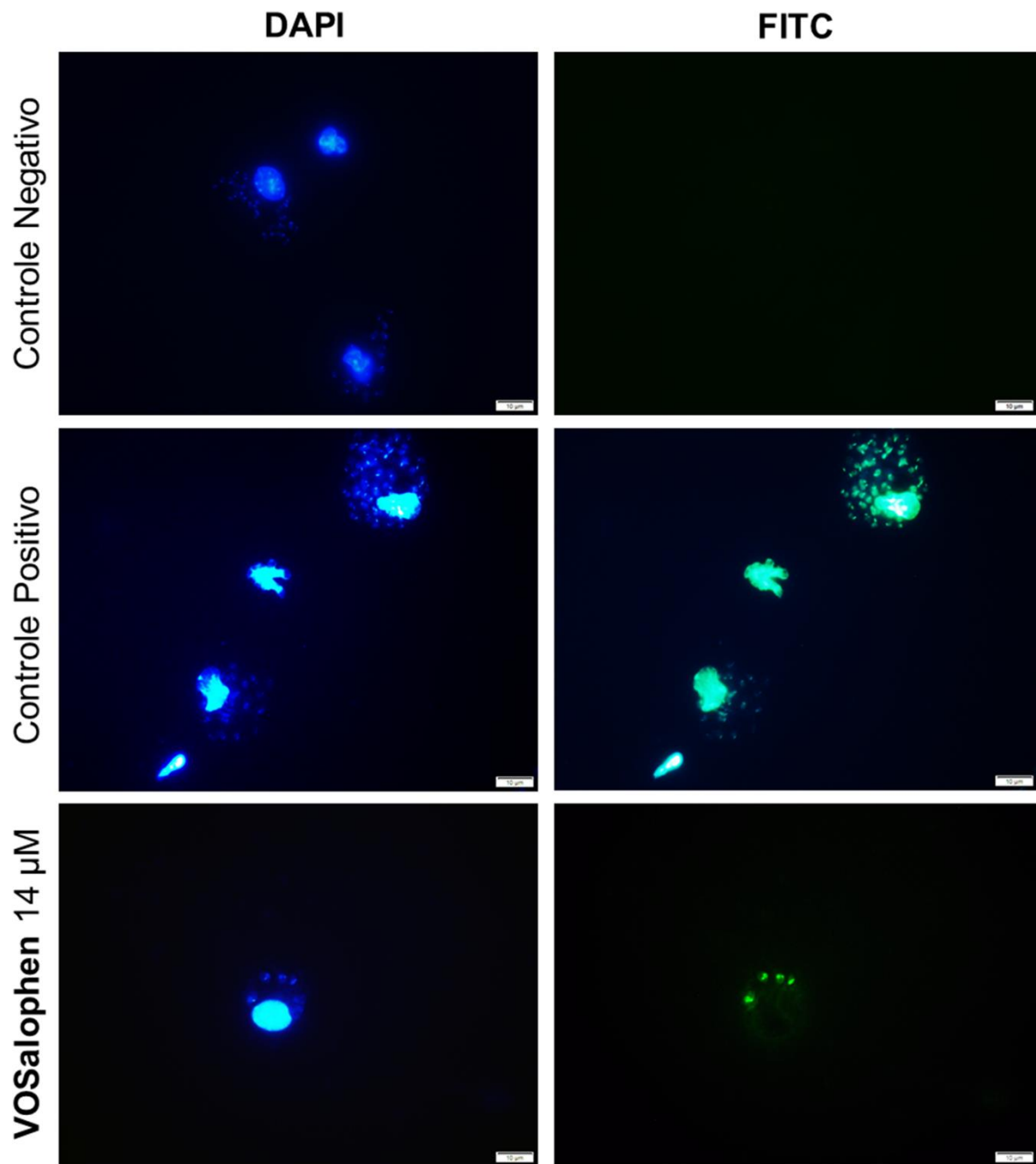


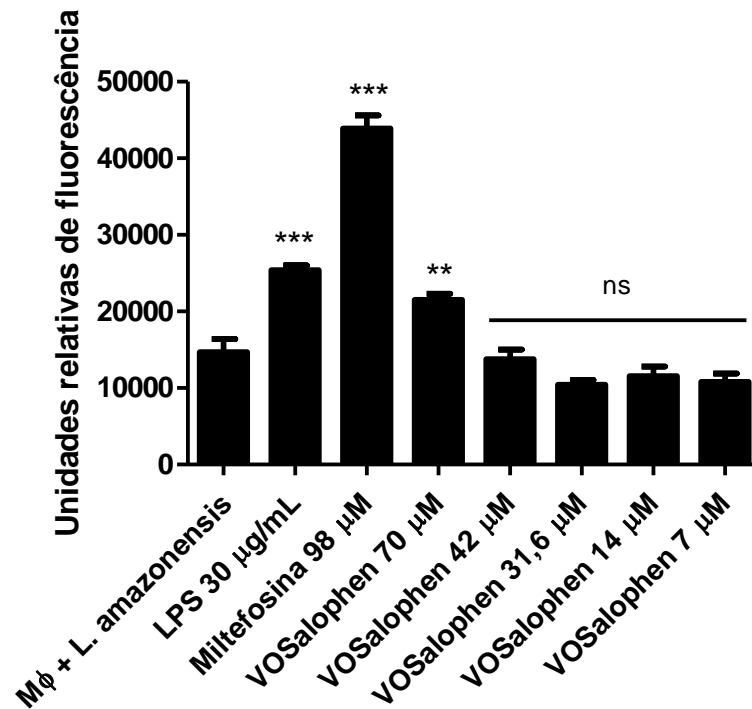
Figura 28: Fotomicrografia ilustrativa da avaliação da fragmentação do DNA de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com **VOSalophen** (14 μM) por 24 horas. As células foram processadas, marcadas com o kit TUNEL de acordo com as instruções do fabricante e analisadas em microscópio de fluorescência. Escala da barra = 10 μm . Macrófagos infectados e tratados com 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNase por 20 minutos foram utilizados como controle positivo.

Macrófagos são células microbicidas capazes de produzir EROs e ON (NATHAN e SHILOH, 2000). Essas substâncias podem também ser geradas em resposta a algumas drogas e este é um dos mecanismos pelo qual alguns

medicamentos antiparasitários atuam para causar a morte de protozoários no interior de células infectadas (FONSECA-SILVA et al., 2013). Baseado nisto, foi investigada a produção de EROs e ON por macrófagos não infectados e infectados com *L. amazonensis* e tratados com **VOSalophen**.

Com relação aos níveis de EROs (Figura 29), pode-se dizer que o tratamento, com **VOSalophen**, de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, no geral, não foi capaz de aumentar a produção de EROs por macrófagos infectados, exceto na maior concentração testada (70 μM) a qual induziu um aumento de 47% da produção de EROs, quando comparado ao controle infectado e não tratado. LPS (30 $\mu\text{g/mL}$) e miltefosina (98 μM) foram utilizados como controle positivo e aumentaram em 73% e 200% a produção de EROs em macrófagos infectados, respectivamente (Figura 29A). É válido ainda destacar que o tratamento, com **VOSalophen**, de macrófagos não infectados também não induziu a produção de EROs (Figura 29B), nem na maior concentração utilizada (70 μM), sugerindo que o aumento de EROs poderia ser específico de células infectadas com amastigotas intracelulares, quando em altas concentrações do composto.

(A)



(B)

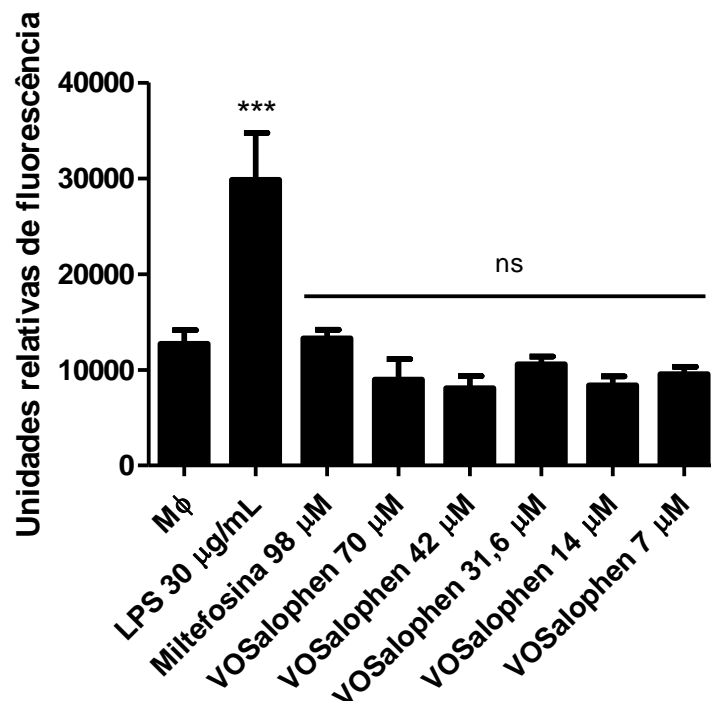
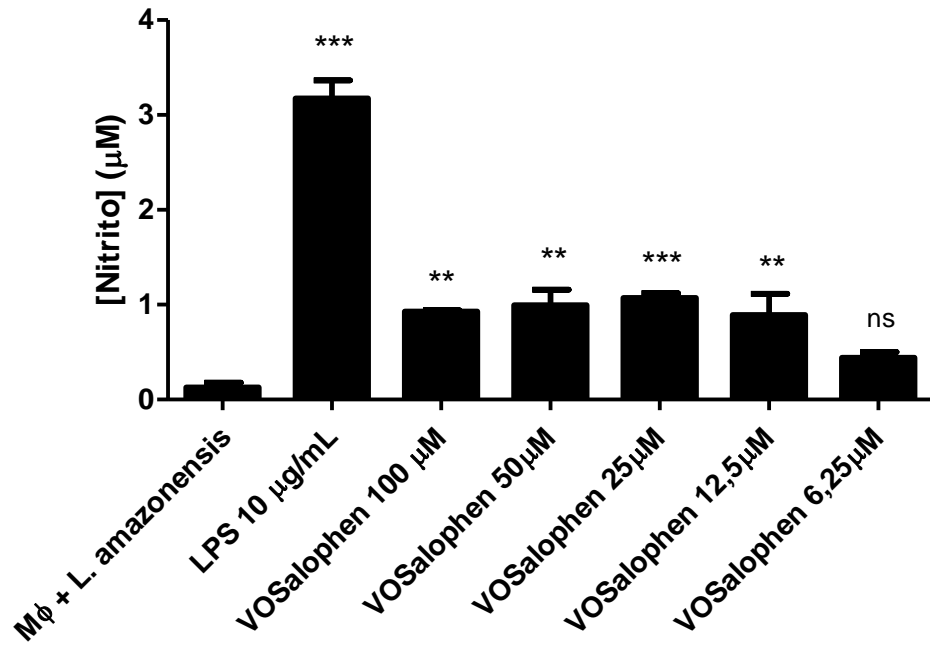


Figura 29: Produção de EROs por macrófagos infectados com *L. amazonensis* (A) e por macrófagos não infectados (B), tratados com **VOSalophen** por 24 horas e posteriormente marcados com H₂DCFDA. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foi analisado pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) e não significativo (*ns*). Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. MΦ = macrófago.

A Figura 30 mostra os níveis de ON produzidos por macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figura 30A) e macrófagos não infectados (Figura 30B) e tratados com o **VOSalophen**. Os níveis de ON foram avaliados de forma indireta, através da concentração de nitrito, um subproduto estável do ON, pelo método de Griess.

O tratamento de macrófagos infectados com *L. amazonensis* com **VOSalophen** nas concentrações de 100 μM a 12,5 μM levou a um aumento significativo de cerca de 7 a 8 vezes, da produção de ON, quando comparado ao controle não tratado e a concentração de 6,25 μM aumentou cerca de 3 vezes, comparado ao controle. LPS (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi utilizado como controle positivo e induziu aumento dos níveis de óxido nítrico de cerca de 25 vezes quando comparado ao controle sem tratamento (Figura 30A). Esses resultados mostram que o composto induziu a produção de ON pela célula hospedeira, sugerindo que este é um mecanismo pelo qual o macrófago poderia ser capaz de destruir o parasito intracelular. Assim como ocorreu para a produção de EROs, o tratamento com **VOSalophen** não induziu a produção de ON em macrófagos não infectados (Figura 30B).

(A)



(B)

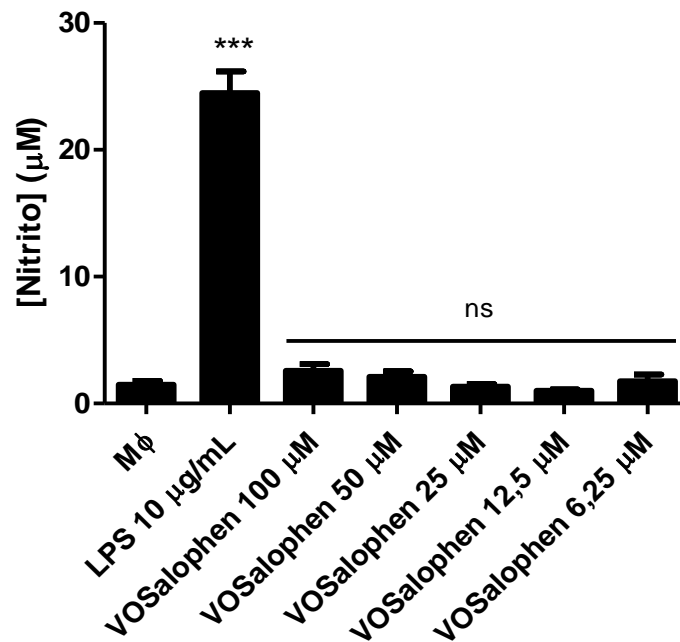


Figura 30: Avaliação dos níveis de ON produzidos por macrófagos infectados com *L. amazonensis* (A) e por macrófagos não infectados (B) e tratados com **VOSalophen** por 48 horas. A produção de ON foi avaliada de maneira indireta, pelo método de Griess. O controle positivo foi LPS 10 µg/mL. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**) e não significativo (ns). Mφ = macrófago.

Em resumo, os resultados apresentados na Parte II deste trabalho mostraram que **VOSalophen** parece induzir características de morte celular por apoptose-like e autofagia em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, **VOSalophen** também parece induzir morte por apoptose-like. É ainda importante ressaltar que este composto não mostrou toxicidade significativa para eritrócitos humanos e não induziu fragmentação do DNA de macrófagos, em concentrações tóxicas para o parasito. Em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, **VOSalophen** induziu aumento de produção de EROs e ON, o que poderia estar contribuindo para o efeito desta molécula em amastigotas intracelulares. Devido a este significativo efeito leishmanicida *in vitro* do **VOSalophen** em *L. amazonensis*, seu efeito no modelo de LC murina foi também investigado e os resultados estão na Parte III deste trabalho.

4.3 Parte III – Avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* de **VOSalophen** em modelo de LC murina, causada por *L. amazonensis*

Camundongos BALB/c foram infectados na pata traseira direita com formas promastigotas de *L. amazonensis* e após 10 dias de infecção, os animais foram redistribuídos em 5 grupos, onde cada grupo passou a receber um tipo de tratamento: DMSO 5%, Anfotericina B 300 µg/Kg, **VOSalophen** 300 µg/Kg, 150 µg/Kg e 75 µg/Kg. O tratamento dos camundongos foi realizado pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas e antes de cada tratamento foi realizada a medida dos tamanhos das patas infectadas, no intuito de acompanhar a evolução dos tamanhos das lesões.

A Figura 31 mostra a evolução dos tamanhos das patas dos camundongos infectados, ao longo dos 39 dias do experimento. O dia 0 corresponde ao dia em que os animais foram infectados e o tratamento foi iniciado no dia 10, ou seja, 10 dias após a infecção. Até o dia 24, o tamanho das patas dos animais controle não se diferiu do tamanho das patas dos animais tratados com **VOSalophen** ou com anfotericina B. A partir do dia 28 é possível perceber que o tamanho das patas dos animais tratados com diferentes concentrações de **VOSalophen** e com anfotericina B torna-se ligeiramente menor do que o tamanho das patas dos animais tratados com DMSO 5%, sendo que esta diferença persiste até o dia 39, que é o último dia do experimento. A partir deste experimento e observando o tamanho das lesões nos dias 36 e 39, os dois últimos dias avaliados, foi verificado que a concentração de **VOSalophen** que induziu maior redução de tamanho das patas dos animais, foi a de 75 µg/Kg (Figura 31). Talvez este fato possa ter sido ocasionado devido à baixa solubilidade deste composto em água. Baseado neste fato, este experimento foi repetido, utilizando a mesma metodologia, porém usando apenas a concentração de 75 µg/Kg de **VOSalophen**. Três dias após o último tratamento, os animais foram eutanasiados, as patas infectadas foram medidas (Figura 32), extraídas e pesadas (Figura 33). Em seguida, foram retiradas as peles das patas, as mesmas foram maceradas e foi realizado o LDA (Figura 34), no intuito de estimar a carga parasitária nas patas infectadas.

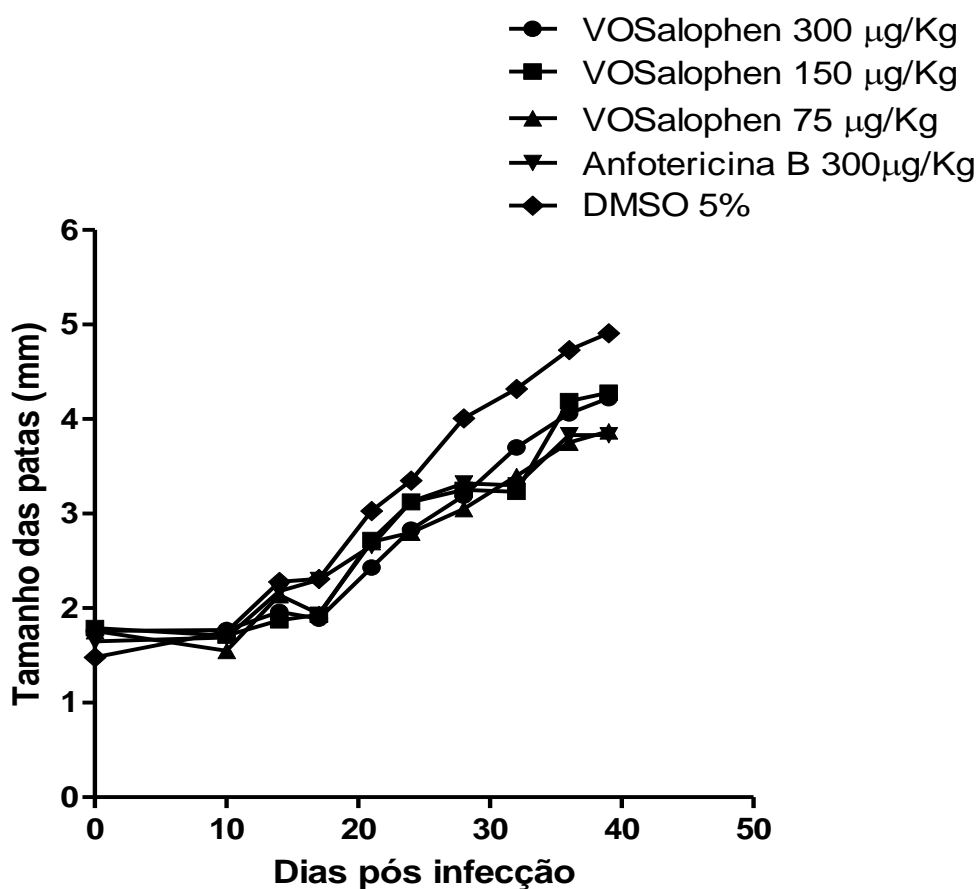


Figura 31: Avaliação do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* ao longo do tratamento com **VOSalophen**. Camundongos BALB/c, foram infectados, na pata traseira direita, com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Após 10 dias, os animais foram redistribuídos em 5 grupos, onde cada grupo passou a receber um tipo de tratamento. Os tratamentos foram realizados pela via intralésional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Antes da realização de cada tratamento, os animais tiveram o tamanho das patas mensurado, com o auxílio de um paquímetro digital. O gráfico foi construído utilizando *GraphPad Prism* versão 5.0.

A Figura 32 representa o tamanho das lesões dos animais no último dia do experimento, ou seja, no dia 39, dia no qual os camundongos já haviam recebido oito doses do tratamento. Vale destacar que houve redução de 21,18% e 31,97% do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com **VOSalophen** (75 µg/Kg) e com anfotericina B (300 µg/Kg), respectivamente, quando comparado ao grupo controle (tratamento com DMSO 5%). A média dos tamanhos das lesões dos animais tratados com DMSO 5% foi de 4,91 mm e esta média foi reduzida para 3,87 e 3,34 mm após o tratamento com **VOSalophen** e anfotericina B, respectivamente.

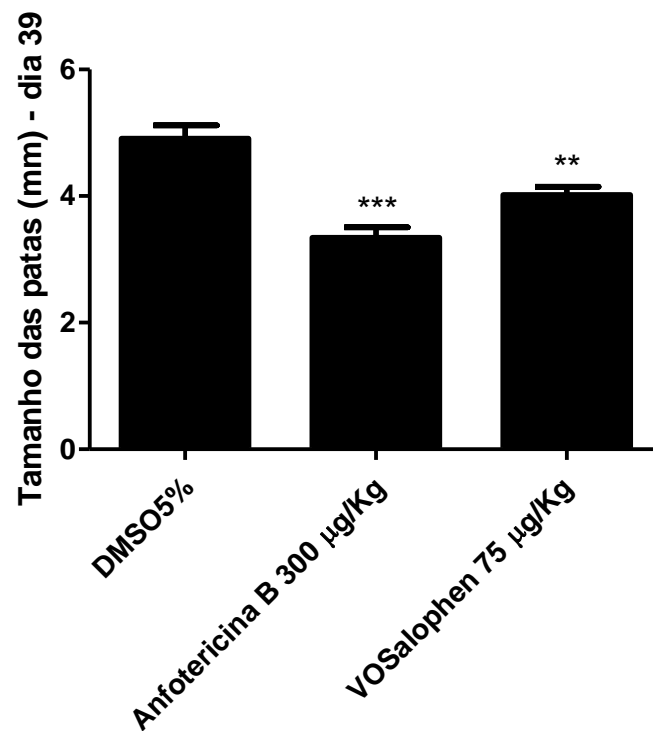


Figura 32: Avaliação do tamanho das lesões de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, 3 dias após o fim do tratamento com **VOSalophen**. Camundongos BALB/c, foram infectados com *L. amazonensis* e após 10 dias, os animais começaram a receber os tratamentos. Os mesmos foram realizados pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Três dias após o último tratamento, os camundongos foram eutanasiados e tiveram o tamanho das patas mensurado, com o auxílio de um paquímetro digital. Esses dados correspondem, portanto, ao dia 39 do experimento. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando teste t não pareado: $p < 0,001$ (***), $p < 0,01$ (**).

Outro parâmetro avaliado ao final do tratamento com **VOSalophen** foi o peso das patas infectadas e extraídas após a eutanásia dos animais. A Figura 33 mostra que o tratamento com **VOSalophen** (75 µg/Kg) e anfotericina B reduziu em 24,34% e 29,20% o peso das patas infectadas, respectivamente. O peso médio das patas tratadas com DMSO 5% (controle negativo) foi de 0,3472 g e este valor foi reduzido para 0,2627 g e 0,2458 g após o tratamento com **VOSalophen** e anfotericina B, respectivamente.

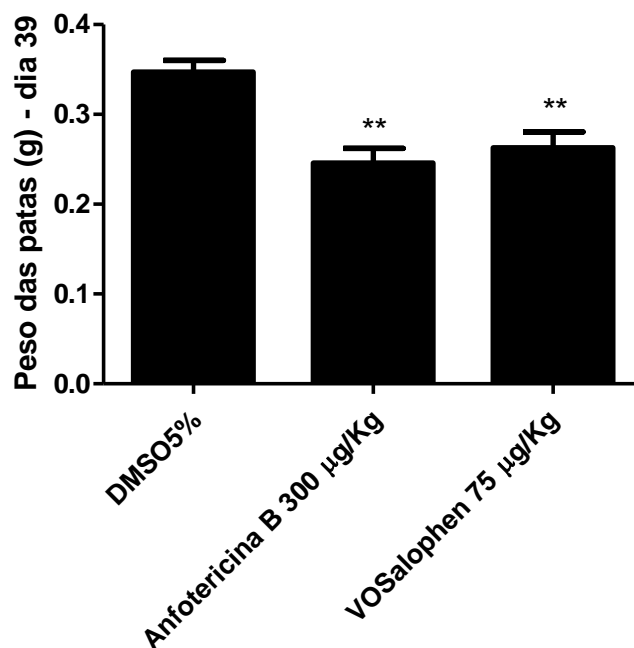


Figura 33: Avaliação do peso das patas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, 3 dias após o fim do tratamento com **VOSalophen**. Camundongos BALB/c, foram infectados com *L. amazonensis* e após 10 dias, os animais começaram a receber os tratamentos. Os mesmos foram realizados pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Três dias após o último tratamento, os camundongos foram eutanasiados e as patas foram extraídas e pesadas. Esses dados correspondem, portanto, ao dia 39 do experimento. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando teste t não pareado: $p < 0,01$ (**).

As patas extraídas tiveram suas peles retiradas e foram maceradas para a realização do LDA. A Figura 34 mostra que os tratamentos com **VOSalophen** (75 µg/Kg) e com anfotericina B reduziram em 86,58% e 97,97% a carga parasitária nas patas infectadas, respectivamente, quando comparado ao controle negativo. O número estimado de parasitos nas patas dos animais controle foi de $199,26 \times 10^6$ e este valor foi reduzido para $26,73 \times 10^6$ e $4,05 \times 10^6$ após oito doses de tratamento com **VOSalophen** e anfotericina B, respectivamente.

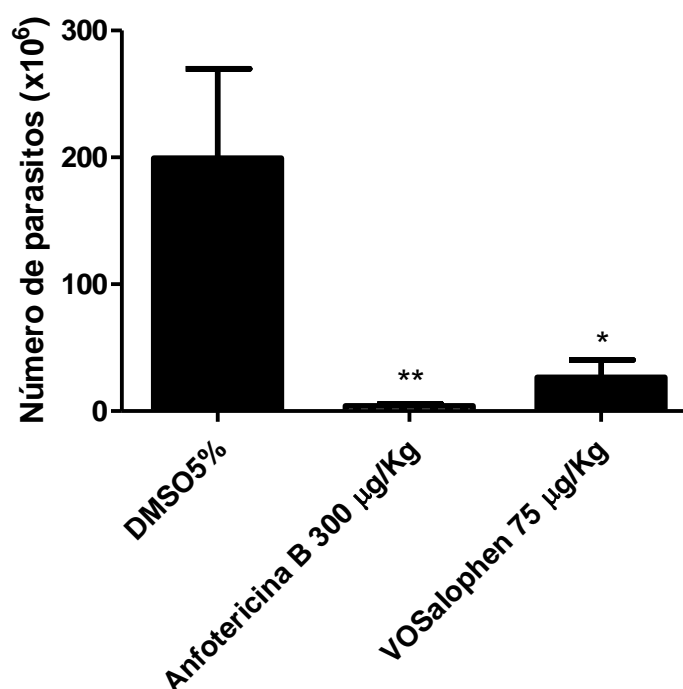


Figura 34: Avaliação da carga parasitária nas patas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, 3 dias após o fim do tratamento com **VOSalophen**. Camundongos BALB/c, foram infectados com *L. amazonensis* e após 10 dias, os animais começaram a receber os tratamentos, que foram realizados pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Três dias após o último tratamento, os camundongos foram eutanasiados e as patas foram extraídas para a realização do LDA. Esses dados correspondem, portanto, ao dia 39 do experimento. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando teste t não pareado: $p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*).

Foi realizada também a avaliação dos parâmetros de toxicidade hepática e renal após o tratamento com **VOSalophen**, onde foram determinados os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-glutamiltanspeptidase (GGT) e creatinina no soro dos camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com este composto. A Figura 35 mostra que o tratamento com **VOSalophen** a 75 µg/Kg não alterou os níveis de AST, ALT, GGT e creatinina, quando comparado ao controle negativo, tratado com DMSO 5%, o que mostra que este composto não causou efeitos tóxicos ao fígado e aos rins dos animais tratados. Anfotericina B induziu toxicidade hepática, com alteração dos níveis de AST e ALT e toxicidade renal, alterando os níveis de creatinina. Acetaminofeno 300 mg/Kg, administrado por via oral, foi utilizado como controle positivo de toxicidade e alterou os níveis de todos os parâmetros avaliados (Figura 35).

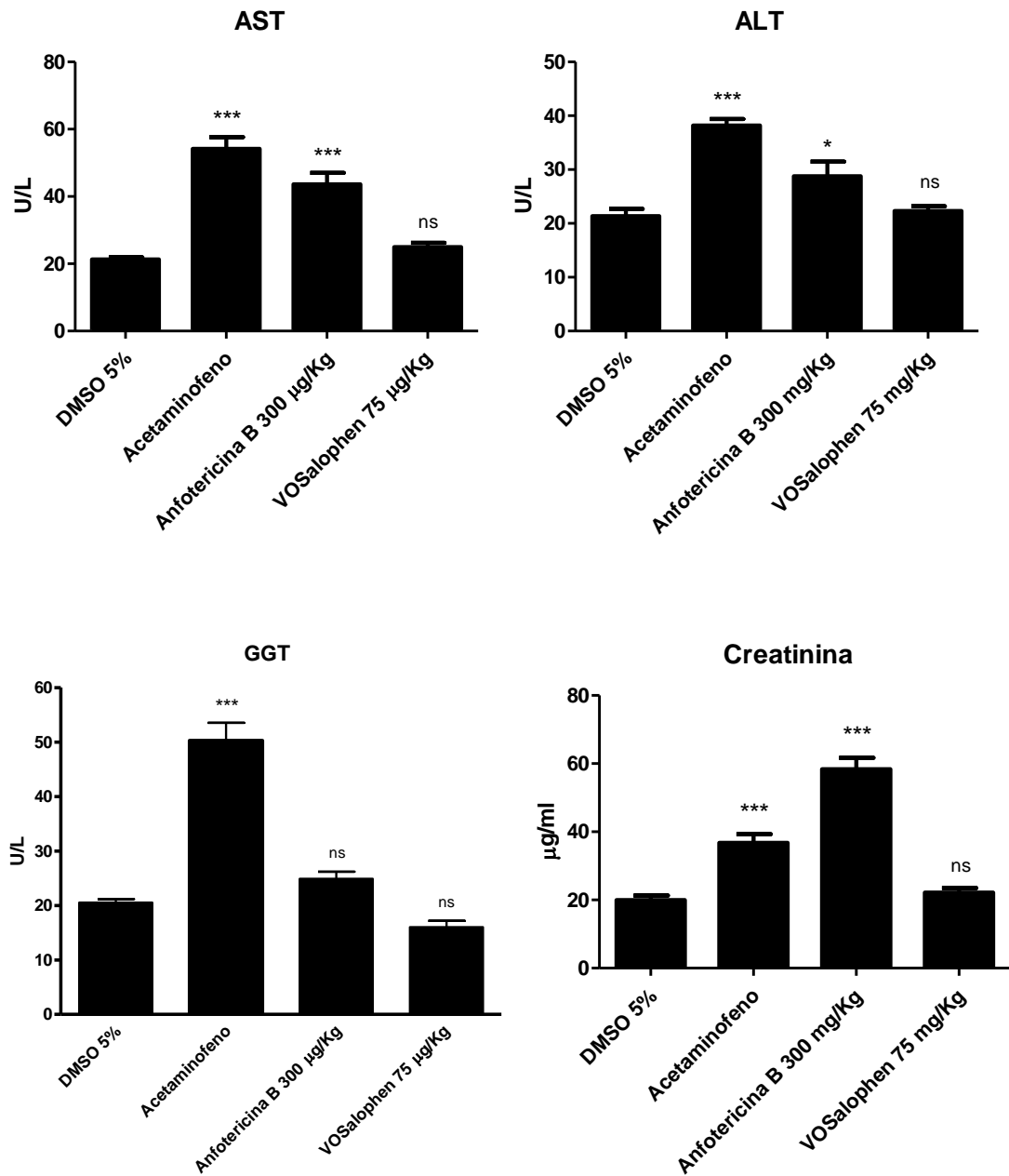


Figura 35: Avaliação dos parâmetros de toxicidade hepática e renal após o tratamento com o **VOSalophen**. Camundongos BALB/c, foram infectados com *L. amazonensis* e tratados com este composto pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Três dias após o último tratamento, foi coletado o sangue dos animais e o soro foi separado para a dosagem de AST, ALT, GGT e creatinina, utilizando kits de diagnóstico colorimétrico laboratorial. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,001$ (***) , $p < 0,05$ (*) e não significativo (ns).

Os dados apresentados na Parte III deste trabalho mostram que **VOSalophen**, administrado em um total de oito doses, pela via intralesional, foi capaz de interferir na evolução da LC murina causada por *L. amazonensis*, visto

este composto ter induzido redução do tamanho das lesões, do peso das patas infectadas e da carga parasitária. Além disso, este regime de tratamento não induziu toxicidade hepática e renal aos camundongos infectados, mostrando ser bem tolerado.

5 DISCUSSÃO

Atualmente, não existem vacinas eficazes contra as leishmanioses em humanos e o controle da doença é baseado na quimioterapia (RAJASEKARAN e CHEN, 2015). Entretanto, existe uma grande dificuldade relacionada à quimioterapia dessas doenças, incluindo a LC, visto que os medicamentos disponíveis apresentam diversas desvantagens, como sérios efeitos adversos, elevada toxicidade, alto custo, tratamento prolongado e rotas de administração injetáveis. Além disso, esses tratamentos nem sempre são efetivos (STEFANELLO et al., 2014). Essas limitações representam obstáculos para o sucesso da terapia e destacam a necessidade de desenvolver novas drogas, mais efetivas e menos tóxicas, para o tratamento da LC.

Neste contexto, o presente trabalho investigou o efeito leishmanicida de doze compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol complexados ou não a metais (ouro e vanádio) em *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, espécies de *Leishmania* relacionadas à ocorrência de LC (WHO, 2010). A análise dos resultados apresentados na Parte I deste trabalho mostra que os compostos não complexados a metais não apresentaram efeito ou foram pouco efetivos em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* (Tabelas 2 e 4, respectivamente). Já as moléculas complexadas a metais mostraram efeito significativo em ambas as formas do parasito *Leishmania* (Tabelas 2 e 4, respectivamente). Tal fato mostra que o processo de complexação dos bioisómeros do resveratrol com metais foi de suma importância para a atividade leishmanicida dos compostos aqui testados.

Um importante exemplo dos efeitos biológicos de compostos contendo metais é o uso atual de complexos de platina para o tratamento de diversos tipos de câncer (CRAIG et al., 2012). Entretanto, o uso de complexos metálicos é também voltado para ação antiparasitária (NAVARRO et al., 2010). Durante os últimos setenta anos até os dias atuais, a primeira linha de quimioterapia para as leishmanioses depende da utilização de compostos contendo o semi-metal antimônio (Sb^{+5}) (GUTIÉRREZ et al., 2016). Mais recentemente, o efeito antiparasitário de moléculas contendo metais também começou a ser demonstrado. Já foi relatado, por exemplo, que compostos complexados a platina apresentam atividade em diferentes espécies de *Leishmania* (CARMO et al., 2011). Paladi et al. (2012) relataram o efeito leishmanicida *in vitro* de

complexos de paládio. Quanto à compostos de ouro, foi mostrado que, tanto moléculas contendo ouro (+1) como aquelas com ouro (+3), possuem efeito tóxico em diferentes espécies de *Leishmania* (GLIŠIĆ e DJURAN, 2014). Com relação à complexos de vanádio, Benítez et al. (2011) e Do Amaral et al. (2015) avaliaram o efeito, em *Leishmania*, de diversos compostos contendo este metal e obtiveram resultados satisfatórios.

O efeito leishmanicida do resveratrol também foi avaliado e a análise das Tabelas 2 e 4 permite concluir que este composto apresentou de baixo a moderado efeito em promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Tais dados corroboram com dados obtidos por Kedzierski et al. (2007), Lucas e Kolodziej (2013) e Ferreira et al. (2014), que avaliaram a atividade do resveratrol em *Leishmania* e com os resultados de Passos et al. (2015), que demonstraram o efeito de análogos do resveratrol em *L. amazonensis*.

Entretanto, é importante destacar que o processo de complexação com metais, apesar de ter aumentado o efeito leishmanicida dos bioisómeros do resveratrol, também aumentou a toxicidade dos mesmos em macrófagos peritoneais de camundongos, enquanto todos os bioisómeros do resveratrol não complexados não foram tóxicos nesta mesma linhagem celular (Tabela 3). No entanto, avaliando a seletividade dos complexos metálicos, a maioria dos compostos apresentou $\ln Se$ maior do que um, mostrando que são mais tóxicos ao parasito do que à célula hospedeira (Tabelas 5 e 6). Tal fato é de suma importância, pois, como já foi dito anteriormente, a quimioterapia das leishmanioses enfrenta muitos desafios relacionados à elevada toxicidade dos medicamentos disponíveis (CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015). A toxicidade de complexos metálicos já foi anteriormente demonstrada, em que compostos complexados a vanádio apresentaram efeito tóxico em células de mamíferos, como em macrófagos peritoneais murinos (DO AMARAL et al., 2015) e células da linhagem THP-1 (BENÍTEZ et al., 2011).

No intuito de avaliar a especificidade dos compostos entre os dois estágios do parasito, foi calculado o $\ln Es$, dado pela razão entre o CI_{50} em formas promastigotas e o CI_{50} em formas amastigotas de *Leishmania*. Considerando a classificação proposta por Muylder et al. (2011), com relação à especificidade de compostos, que já foi anteriormente citada neste trabalho, pode-se perceber que os complexos metálicos apresentaram especificidade variada entre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. Com isso, pode-se concluir que os bioisómeros do

resveratrol complexados a metais podem ter alvos específicos em formas promastigotas, como o composto **7** para *L. amazonensis* e *L. braziliensis*; ou terem alvos semelhantes em ambos as formas evolutivas de *Leishmania*, como o composto **6** para as três espécies testadas e o composto **11 (VOSalophen)** para *L. amazonensis*; ou podem ter alvos específicos em amastigotas intracelulares ou, ainda, atuarem através de mecanismos relacionados à célula hospedeira, como o composto **8** para *L. major* e o composto **9** para *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* (Tabela 7). Isto significa que, por um lado, as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*, possuem uma série de semelhanças entre si, uma vez que ambos estão presentes durante o ciclo de vida do mesmo parasito e por isso podem ter estruturas que compartilham alvos comuns de uma série de compostos. Por outro lado, tais formas habitam ambientes distintos, sendo os promastigotas encontrados no intestino do inseto vetor e os amastigotas presentes em células do sistema fagocítico de mamíferos. Tal fato exige que cada uma dessas formas estejam morfológica e metabolicamente bem adaptadas aos distintos compartimentos de seus hospedeiros específicos. Estas implicações morfológicas e bioquímicas de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp., podem remeter à diferenças de sensibilidade a uma grande variedade de compostos (CHAKRABORTY et al., 2010).

Após esta etapa de triagem de compostos sintéticos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos em *Leishmania* e macrófagos (Parte I), foi realizada a escolha de um composto, para ter seu efeito avaliado de maneira mais detalhada em *Leishmania* e em células de mamíferos, bem como para ser testado em modelo de LC murina. Neste momento, vale destacar que compostos que possuem o ouro em sua estrutura possuem síntese cara, pois este é um metal de preço elevado, o que não acontece com compostos contendo vanádio, já que este é um metal que possui preço mais acessível. Portanto, decidiu-se escolher um complexo de vanádio, efetivo e seletivo nas duas formas do parasito *Leishmania*, promastigotas e amastigotas intracelulares.

Dentre os complexos de vanádio testados neste trabalho (compostos **10 - 12**), verifica-se que o composto **11 (VOSalophen)**, apresentou o melhor efeito leishmanicida, sendo o mais efetivo em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com CI_{50} abaixo de 7 μ M (Tabelas 2 e 4). Este composto atua de maneira dose dependente em ambas as formas do parasito e embora tenha

apresentado toxicidade em células de mamíferos (macrófagos peritoneais), com CC_{50} de 24,32 μ M (Tabela 3), ele se mostrou cerca de quatro e sete vezes mais tóxico para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente, em comparação com a célula hospedeira (Tabelas 5 e 6). Ainda é importante destacar que **VOSalophen** não causou toxicidade expressiva em eritrócitos humanos (Figura 7).

Uma das primeiras questões levantadas neste trabalho foi sobre o mecanismo de morte induzido por **VOSalophen** em *L. amazonensis*. Diferente do ocorrido em metazoários, a questão relacionada à mecanismos de morte em protozoários foi negligenciada durante muito tempo. Nestes organismos unicelulares, a morte celular era geralmente relacionada à ocorrência de forma descoordenada, e os processos envolvidos nas decisões de vida ou morte após o tratamento de parasitos com agentes quimioterápicos ou após a indução de imunidade antiparasitária foram, portanto, largamente ignorados (LÜDER et al., 2010). Atualmente, esta situação passou por modificações e prova disto é que muitos grupos de pesquisa buscam compostos com efeito anti-protozoário e além disso avaliam os mecanismos pelos quais tais compostos ocasionam a morte dos parasitos (ARDESTANI et al., 2012; SARDAR et al., 2013; VOLPATO et al., 2013; MARINHO et al., 2014).

O ponto inicial deste estudo foi focado na mitocôndria, uma vez que a mitocôndria de *Leishmania* é importante, não apenas no processo de morte celular por apoptose, mas também pelo fato de que em tripanosomatídeos, como *Leishmania*, tal organela é única (diferente dos metazoários que apresentam várias mitocondrônrias) e apresenta algumas características bioquímicas diferentes das mitocôndrias presentes no hospedeiro mamífero. Por este motivo a mitocôndria de tripanosomatídeos constitui um dos alvos celulares de maior importância (FIDALGO e GILLE, 2011). Baseando-se nisto, foi investigado o efeito do composto **VOSalophen** sobre a mitocôndria de promastigotas de *L. amazonensis*, com avaliação de alterações no $\Delta\Psi_m$. Após 24 horas de incubação com o composto, parasitos tratados apresentaram despolarização do $\Delta\Psi_m$, o que foi avaliado através da marcação com JC-1 (Figura 9), Mitotracker® Red CM-H2XROS (Figura 10) e com Rodamina 123 (Tabela 8). Esses resultados mostram que a mitocôndria de *L. amazonensis* parece ser extremamente afetada por este composto. Associado à despolarização do $\Delta\Psi_m$, foi observada a ocorrência de estresse oxidativo, com aumento da produção de EROs (Figura 11).

É importante destacar que alterações mitocondriais podem ocorrer como consequências de efeitos potencialmente prejudiciais causados por compostos tóxicos endógenos e exógenos (VOLPATO et al., 2013). Nesse caso, **VOSalophen** poderia estar atuando sobre a mitocôndria do parasito causando alterações no $\Delta\Psi_m$, como um composto tóxico de origem exógena e esta organela, uma vez comprometida, poderia estar produzindo níveis aumentados de EROs, uma vez que a despolarização do $\Delta\Psi_m$ está diretamente associada, entre outros mecanismos, à geração de EROs (BORGES, 2012). Por outro lado, **VOSalophen** poderia estar aumentando diretamente a produção de EROs e estas substâncias tóxicas estariam causando danos à mitocôndria da célula, como um composto tóxico de origem endógena. Para tentar esclarecer a sequência de eventos que ocorrem em *L. amazonensis* por ação do composto, foi realizado o tratamento de promastigotas por 3 e 6 horas e em seguida as células foram marcadas, separadamente, com JC-1 para avaliação do $\Delta\Psi_m$ (Figura 12) e com H₂DCFDA para avaliação dos níveis de EROs (Figura 13), no intuito de acompanhar os efeitos iniciais deste composto no parasito. Os resultados mostraram que **VOSalophen** atua inicialmente sobre a mitocôndria do parasito, como um composto tóxico de origem exógena, causando alteração do $\Delta\Psi_m$, o que desencadeia um aumento de produção de EROs, com consequente estresse oxidativo, e a produção dessas espécies reativas também pode estar contribuindo com a morte do parasito.

A disfunção mitocondrial pode induzir um acúmulo de corpos lipídicos no interior das células (LEE et al., 2013). Este acúmulo de lipídeos ocorre para tentar suprir o fornecimento de energia, visto que a principal fonte de energia celular, a mitocôndria, está comprometida (AON, BHATT e CORTASSA, 2014). Com base nesta afirmação foi avaliado o acúmulo de lipídeos neutros no interior de promastigotas tratados com o composto e a Figura 14 mostra que o acúmulo de lipídeos realmente aumenta em células tratadas com este complexo metálico, o que corrobora com os dados de comprometimento mitocondrial apresentados anteriormente.

Apesar de terem sido observadas, após 24 horas de tratamento com **VOSalophen**, alterações internas de funcionalidade mitocondrial e externas de morfologia, volume e tamanho em promastigotas de *L. amazonensis*, a integridade da membrana plasmática dessas células não foi alterada, o que foi avaliado através da utilização do PI (Figura 18 e 19). Este fato permite a conclusão de que

promastigotas tratados com **VOSalophen** parecem que não estão morrendo por necrose, pois umas das principais características de células em necrose é a alteração da permeabilidade da membrana plasmática com extravasamento de conteúdo intracelular (JAIN et al., 2013). Entretanto, já se pode pensar que talvez este composto possa estar induzindo morte celular por apoptose-like em formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo que tal conclusão preliminar pode ser feita com base nas alterações celulares observadas em parasitos tratados com **VOSalophen**, como alteração do $\Delta\Psi_m$ e redução do volume da célula, sem afetar a integridade da membrana plasmática, que de acordo com Proto, Coombs e Mottran (2013) são características de células em processo de morte por apoptose. Junto a estes dados, foi observado acúmulo de corpos lipídicos e geração de EROs em promastigotas tratados, que também constituem-se como características da ocorrência de apoptose (BOREN e BRINDLE, 2012; GANNAVARAM e DEBRABANT, 2012).

A possibilidade de ocorrência de apoptose-like em parasitos tratados com **VOSalophen** levou à investigação da ocorrência de externalização de fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. amazonensis*, uma vez que a exposição deste fosfolípido na porção externa da membrana plasmática é uma das características de uma célula em apoptose (EL-HANI et al., 2012). Apesar da discussão sobre a ocorrência da exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática de *Leishmania*, visto que há a possibilidade deste fosfolípido estar ausente ou em pequena quantidade na membrana do parasito (PROTO, COOMBS e MOTTRAN, 2013), a marcação deste fosfolípido com anexina V-FITC tem sido muito utilizada para detectar apoptose-like em *Leishmania* (MESQUITA et al., 2013; CHOUHAN et al., 2015; MALLICK et al., 2015). Assim, a anexina V-FITC foi utilizada neste trabalho para a marcação de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática de *Leishmania* e nossos resultados (Figura 20) permitem concluir que o tratamento com este composto aumentou significativamente a porcentagem de células externalizando resíduos de fosfatidilserina, o que reforça a possibilidade de ocorrência de apoptose-like em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com este complexo de vanádio.

Em paralelo à avaliação da externalização de fosfatidilserina, foi determinada a fragmentação do DNA em promastigotas, pois este também é um evento característico de células apoptóticas (KACZANOWSKI, SAJID e REECE, 2011).

Através da técnica do TUNEL foi observada a fragmentação do DNA dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com **VOSalophen** (Figura 21), o que confirma a possibilidade de ocorrência de apoptose-like após o tratamento com este complexo de vanádio. Corroborando com este fato, nossos resultados ainda apontam um aumento da porcentagem de células na fase sub-G0/G1 do ciclo celular (Figura 22), destacando que células presentes nesta fase do ciclo possuem um conteúdo muito baixo de DNA e, portanto, correspondem a células com DNA fragmentado (RIBEIRO, 2011).

De maneira interessante, foi observada, simultaneamente a apoptose-like, a possibilidade de ocorrência de autofagia em células tratadas com **VOSalophen**, o que foi verificado por meio da marcação com MDC (Figura 23) e da MET (Figura 24). O processo autofágico pode estar sendo diretamente induzido pelo tratamento com este composto e conseqüentemente estar contribuindo com a morte dos promastigotas de *L. amazonensis*. Por outro lado, a autofagia poderia estar ocorrendo como um mecanismo de defesa da célula, contra as alterações celulares, compatíveis com apoptose-like, induzidas por este complexo metálico, pois este processo constitui um mecanismo de defesa e sobrevivência de células em condições de estresse (SU et al., 2015). Também, uma vez que **VOSalophen** afeta a mitocôndria do parasito, talvez a autofagia seja apenas um mecanismo desencadeado com o intuito de degradar esta organela, em um processo denominado mitofagia (BRENNAND et al. 2012). Entretanto, o conjunto de modificações induzidas por **VOSalophen** não descartam a hipótese de que ambos processos de morte por apoptose-like e autofagia possam estar ocorrendo em promastigotas de *L. amazonensis* (BRENNAND et al. 2012).

Convém também ressaltar que **VOSalophen** induz apoptose-like em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, com observação de fragmentação do DNA dos parasitos, pela técnica do TUNEL (Figura 31). É válido destacar ainda que este composto não causou fragmentação do DNA da célula hospedeira, o que confirma a seletividade do mesmo pelo parasito, quando comparado aos macrófagos.

Apesar das importantes alterações celulares *in vitro* observadas em *L. amazonensis* após tratamento com **VOSalophen**, é importante destacar que existe a necessidade de pressão medicamentosa para que haja a completa eliminação dos parasitos. Esta hipótese é reforçada pela observação de que promastigotas tratados

conseguem recuperar o seu crescimento (Figura 25) e infectividade (Figura 26) ao serem reincubados em meio de cultura sem a presença do composto. Este resultado sugere que em uma perspectiva de quimioterapia usando **VOSalophen**, esquemas de tratamentos devem ser aplicados de maneira prolongada, até a completa eliminação do parasito. É interessante destacar que a ocorrência de LC mucosa tem sido associada a falhas no tratamento durante a LC localizada (STEBUT, 2015). Esta falha no tratamento pode ser atribuída à descontinuidade ou interrupção do mesmo. Isto mostra que a interrupção do tratamento com compostos atualmente disponíveis para tratar as leishmanioses, também pode levar à recuperação dos parasitos. Esta recuperação é geralmente seguida de recidiva da doença ou agravamento da mesma, como no caso de surgimento de LC mucosa.

Uma das principais táticas utilizadas por macrófagos para incapacitar patógenos é a geração de EROs e de ON (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015). Contudo, a produção dessas substâncias pode ser induzida pelo tratamento com algumas drogas (FONSECA-SILVA et al., 2013). Neste trabalho foi mostrado que **VOSalophen** induziu um discreto aumento da produção de EROs (somente na maior concentração utilizada - 70 μM) e um aumento da produção de ON, por macrófagos infectados com *L. amazonensis*, entretanto isto não ocorre em macrófagos não infectados (Figuras 29 e 30, respectivamente). Este fato sugere que **VOSalophen** possa exercer um efeito modulador de resposta celular em células infectadas com *L. amazonensis*.

É válido destacar que os resultados encontrados em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **VOSalophen**, podem ser extrapolados para amastigotas extracelulares e intracelulares. De acordo com Muylder et al. (2011) compostos que apresentam valores de InEs entre 0,4 e 2,0 são considerados ativos em promastigotas e amastigotas, possuindo, em ambas as formas, os mesmos alvos celulares. Assim, como este composto apresentou InEs = 1,22 entre promastigotas e amastigotas extracelulares e InEs = 1,89 entre promastigotas e amastigotas intracelulares, acredita-se que **VOSalophen** possua os mesmos alvos celulares em formas promastigotas, amastigotas axênicos e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Este fato ainda pode ser confirmado pela ocorrência de apoptose-like em amastigotas intracelulares, assim como ocorreu em formas promastigotas. Entretanto, o CI_{50} do composto em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (3,51 μM) é um pouco mais baixo do que o CI_{50} deste composto em formas

extracelulares, como promastigotas e amastigotas axênicos ($CI_{50} = 6,65$ e $5,46 \mu M$, respectivamente). Nossa hipótese é que além dos eventos em comum que desencadeiam a morte dos parasitos extracelulares, a produção de ON e EROs em macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com **VOSalophen**, poderia estar contribuindo com o efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas intracelulares.

Na Figura 36 foi proposto um mecanismo de ação para **VOSalophen** em *L. amazonensis*. O esquema representa um resumo dos resultados obtidos com relação ao mecanismo de morte induzido no parasito após o tratamento *in vitro* com este complexo de vanádio.

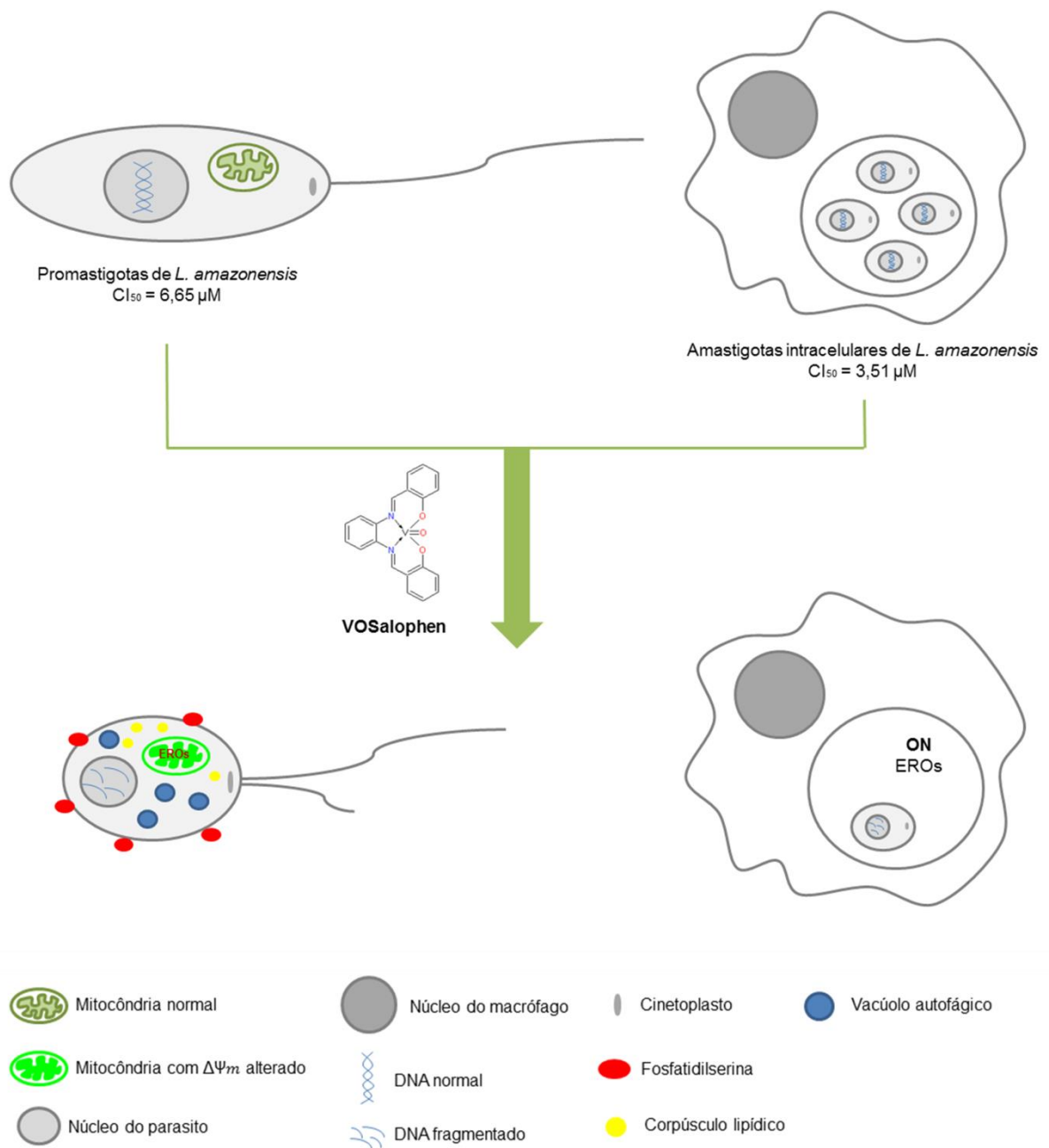


Figura 36: Proposta de mecanismo de ação de **VOSalophen** em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. **VOSalophen** atua sobre a mitocôndria de promastigotas, danificando-a e causando alteração do $\Delta\Psi_m$ e aumento de produção de EROs. Além disso, há acúmulo de lipídeos neutros e as células sofrem arredondamento e redução de volume e tamanho. Paralelamente, ocorre externalização de fosfatidilserina e fragmentação do DNA, entretanto a membrana plasmática das células permanece íntegra, o que caracteriza eventos relacionados à apoptose-like. Adicionalmente, ocorre um aumento de formação de vacúolos autofágicos após o tratamento com este composto, sugerindo a ocorrência de autofagia. Em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, foi observado fragmentação de DNA, mostrando a possível ocorrência de apoptose-like. Em macrófagos infectados com amastigotas, **VOSalophen** induz produção de ON e EROs.

A significativa atividade leishmanicida *in vitro* de **VOSalophen** levou à investigação do efeito *in vivo* deste complexo de vanádio. O tratamento dos animais infectados foi realizado pela via intralesional, duas vezes por semana, durante quatro semanas. Esta via de administração foi escolhida como uma alternativa terapêutica que objetiva reduzir os efeitos colaterais associados às formulações leishmanicidas disponíveis atualmente. Duas vantagens associadas desta via de administração são a redução da toxicidade sistêmica do composto e a possibilidade de tratamento fora do ambiente hospitalar, problemas relacionados à maioria dos medicamentos utilizados para o tratamento da LC (MONGE-MAILLO e LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Formulações alternativas à administração parenteral de compostos leishmanicidas tem sido aplicadas para o tratamento da LC, como a administração tópica de paromomicina e imiquimod (TIUMAN et al., 2012).

O tratamento de camundongos infectados com *L. amazonensis*, com 75 µg/Kg do composto causou redução do tamanho das patas (Figura 32), do peso das patas (Figura 33) e da carga parasitária nas patas infectadas (Figura 34), quando comparado ao controle negativo, em que os animais foram tratados com DMSO 5%. O efeito antiparasitário *in vivo* de complexos metálicos já havia sido relatado anteriormente na literatura. Caballero et al. (2014) demonstraram que complexos de cobalto, níquel e cobre apresentaram atividade tripanocida *in vivo*, em modelo murino de doença de Chagas aguda. Kaur et al. (2010) mostraram o efeito da cisplatina em modelo murino de leishmaniose visceral, no qual foi observada uma significativa redução da carga parasitária hepática de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*. Matte et al. (2000) revelaram que o tratamento de camundongos infectados com *L. major*, com complexos peroxo-vanádio controlaram a progressão da doença de maneira dependente de ON. No nosso trabalho, apesar da discreta redução do tamanho e peso das patas (abaixo de 30%), houve redução de mais de 85% da carga parasitária em animais tratados com **VOSalophen**. Nossa hipótese é que o composto possui efeito anti-parasitário expressivo, entretanto, neste tempo observado, o processo inflamatório ainda era evidente. Talvez, a implementação de tempos maiores de tratamento possam realçar a eficácia *in vivo* do **VOSalophen**, no sentido de causar a redução completa do número de parasitos e a cura da lesão.

Vale também acrescentar que o tratamento não causou toxicidade hepática e renal aos camundongos (Figura 35). Este fato é de suma importância em virtude dos

problemas relacionados à elevada toxicidade dos medicamentos disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses e ressalta a importância do uso dos biosósteros do resveratrol complexados a metal no tratamento da LC.

Em resumo, os resultados apresentados neste trabalho destacam o potencial leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de biosósteros do resveratrol complexados com os metais ouro e vanádio e com isso abrem perspectivas para a síntese de novos compostos com significativo efeito em *Leishmania* e baixa toxicidade ao hospedeiro.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que houve uma potencialização da atividade leishmanicida nos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro e vanádio, quando comparado aos compostos não complexados a metal, e ainda foram seletivos ao parasito, em comparação com a célula hospedeira.

Dentre os compostos testados, o composto **11** (denominado **VOSalophen**), um bioisómeros do resveratrol complexado com vanádio, por ter sido efetivo e seletivo em ambas as formas do parasito e por apresentar síntese financeiramente acessível, foi selecionado para ser avaliado de maneira mais detalhada neste protozoário. Este composto induziu a ocorrência de eventos sugestivos de apoptose-like e autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* e causou fragmentação de DNA em amastigotas intracelulares desta espécie de *Leishmania*, sugerindo também a morte por apoptose-like. Além disso, **VOSalophen** modulou a produção de EROs e ON em macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Em adição, também foi observado um efeito *in vivo* de **VOSalophen**, com discreta redução do tamanho das lesões e do peso das patas de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, significativa redução da carga parasitária nas patas infectadas e ausência de toxicidade hepática e renal aos animais.

Esses resultados abrem perspectivas para o delineamento da síntese de novos compostos complexados a metal e para estudos acerca da associação à ferramentas de biotecnologia, no intuito de aumentar a eficácia dos compostos e reduzir a toxicidade ao hospedeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADADE, C.M.; OLIVEIRA, I.R.S.; PAIS, J.A.R.; SOUTO-PADRÓN, T. 2013. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, **69**: 227-239.

ADRIAZOLA, I.O.; AMARAL, A.E.; AMORIM, J.C.; CORREIA, B.L.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÉ, A.L.R.; NOLETO, G.R. 2014. Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex *in vitro*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **132**: 45-51.

AGGARWAL, B.B.; BHARDWAJ, A.; AGGARWAL, R.S.; SEERAM, N.P.; SHISHODIA, S.; TAKADA, Y. 2004. Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies. **Anticancer Research**, **24**: 2783-2840.

ALEMÁN-NAVA, G.S.; CUELLAR-BERMUDEZ, S.P.; CUARESMA, M.; BOSMA, R. MUYLEAERT, K.; RITMANN, B.E.; PARRA, R. 2016. How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. **Journal of Microbiological Methods**, **128**: 74-79.

AMEEN, M. 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and Experimental Dermatology**, **35**: 699-705.

ANDERA L. 2009. Signaling activated by the death receptors of the TNFR family. **Biomedical Papers**, **153 (3)**: 173-180.

AON, M.A.; BHATT, N.; CORTASSA, S.C. 2014. Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. **Frontiers in Physiology**, **5**: 1-13.

ARDESTANI, S.K.; POORRAJAB, F.; RAZMI, S.; FOROUMADI, A.; AJDARY, S.; GHAREGOZLOU, B.; BEHROUZI-FARDMOGHADAM, M.; SHAFIEE, A. 2012. Cell death features induced in *Leishmania major* by 1,3,4-thiadiazole derivatives. **Experimental Parasitology**, **132**: 116-122.

AVERSI-FERREIRA, R.A.G.M.F.; GALVÃO, J.D.; DA SILVA, S.F.; CAVALCANTE, G.F.; DA SILVA, E.V.; BHATIA-DEY, N.; AVERSI-FERREIRA, T.A. 2015. Geographical and Environmental Variables of Leishmaniasis Transmission. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment** (ed. Claborn, D. M.), InTech: 105-124.

BARBOSA, J.F.; FIGUEIREDO, S.M.; MONTEIRO, F.M.; ROCHA-SILVA, F.; GACIELE-MELO, C.; COELHO, S.S.C.; LYON, S.; CALIGIORNE, R.B. 2015. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery**, **9**: 90-102.

BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; LEAL, S.M.; GUISET, H.; PESSOA, J.C.; LORENZO, J.; TANGO, S.; ESCOBAR, P.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, D. 2011. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **105**: 303-312.

BENÍTEZ, J.; QUEIROZ, A.C.; CORREIA, I.; ALVES, M.A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; BARREIRO, E.J.; LIMA, L.M.; VARELA, J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MORENO, V.; PESSOA, J.C.; GAMBINO, D. 2013. New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **62**: 20-27.

BERA, A.; SINGH, S.; NAGARAJ, R.; VAIDYA, T. 2003. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **127 (1)**: 23-35.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A.; MORRISON, L. S.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. 2006 Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **The Journal of Biological Chemistry**, **281**: 11.384-11.396.

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. 2012. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death and Differentiation**, **19**: 1561-1570.

BORGES, A.R. 2012. **Estudo da atividade biológica de óleos essenciais de plantas medicinais do nordeste brasileiro sobre *Trypanosoma cruzi***. Dissertação acadêmica, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 110 p.

BORGES, L.J.H.; BULL, E.S.; FERNANDES, C.; HORN JR., A.; AZEREDO, N.F.; RESENDE, J.A.L.C.; FREITAS, W.R.; CARVALHO, E.C.Q.; LEMOS, L.S.; HASSAN JERDY, H.; KANASHIRO, M.M. 2016. In vitro and in vivo studies of the antineoplastic activity of copper (II) compounds against human leukemia THP-1 and murine melanoma B16-F10 cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **123**: 128-140.

BRENNAND, A., RICO, E.; PAUL A. M. MICHELS, P. A. M. 2012. Autophagy in Trypanosomatids. **Cells**, **1**: 346-371.

CABALLERO, A.B.; RODRÍGUEZ-DIÉGUEZ, A.; QUIRÓS, M.; SALAS, J.M.; HUERTAS, O.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; MARÍN, C.; CHAVES-LEMAUR, G.; GUTIERREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. 2014. Triazolopyrimidine compounds containing first-row transition metals and their activity against the neglected infectious Chagas disease and leishmaniasis. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **85**: 526-534.

CANTACESSI, C.; DANTAS-TORRES, F.; NOLAN, M.J.; OTRANTO, D. 2015. The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, **31 (3)**: 100-108.

CARLSEN, E.D.; LIANG, Y.; SHELITE, T.R.; WALKER, D.H.; MELBY, P.C.; SOONG, L. 2015. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, **182**: 109-118.

CARMEN, J.C.; SINAI, A.P. 2007. Suicide prevention: disruption of apoptotic pathways by protozoan parasites. **Molecular Microbiology**, **64 (4)**: 904-916.

CARMO, A.M.L.; SILVA, F.M.C.; MACHADO, P.A.; FONTES, A.P.S.; PAVAN, F.R.; LEITE, C.Q.F.; LEITE, S.R.A.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D. 2011. Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum (II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **65**: 204-209.

CARUANA, M.; CAUCHI, M.; VASSALLO, N. 2016. Putative Role of Red wine Polyphenols against Brain Pathology in Alzheimer's and Parkinson's Disease. **Frontiers in Nutrition**, **3**: 1-31.

CARVALHO, A.K.; SILVEIRA, F.T.; PASSERO, L.F.D.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E.P.; LAURENTI, M.D. 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunology**, **34**: 395-403.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; MACIEL, J.; RODRIGUES, V.; SILVA, A.C. 2014. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Frontiers in Immunology**, **5**: 1-16.

CHAKRABORTY, B.; BISWAS, S.; MONDAL, S.; BERA, T. 2010. Stage Specific Developmental Changes in the Mitochondrial and Surface Membrane Associated Redox Systems of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote. **Biochemistry**, **75 (4)**: 494-504.

CHANDRASEKARAN, S.; DAYAKAR, A.; VERONICA, J.; SUNDAR, S.; MAURYA, R. 2013. An in vitro study of apoptotic like death in *Leishmania donovani* promastigotes by withanolides. **Parasitology International**, **62**: 253-261.

CHAN, M.M. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, **63**: 99-104.

CHAVES, J.D.S.; TUNES, L.G.; FRANCO, C.H.J.; FRANCISCO, T.M.; CORRÊA, C.C.; MURTA, S.M.F.; MONTE-NETO, R.L.; SILVA, H.; FONTES, A.P.S.; ALMEIDA, M.V. 2016. Novel gold(I) complexes with 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione and phosphine as potential anticancer and antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.052.

CHÁVEZ-FUMAGALLI, M.A.; RIBEIRO, T.G.; CASTILHO, R.O.; FERNANDES, S.O.A.; CARDOSO, V.N.; COELHO, C.S.P.; MENDONÇA, D.V.C.; SOTO, M.; TAVARES, C.A.P.; FARACO, A.A.G.; COELHO, E.A.F. 2015. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **48 (3)**: 235-242.

CHOI, C.M.; LERNER, E.A. 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, **6**: 175-182.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; WANT, M.Y.; ABDIN, M.Z.; OZBAK, H.A.; HEMEG, A.A.; SAHAL, D.; AFRIN, F. 2015. Apoptosis mediated leishmanicidal activity of *Azadirachta indica* bioactive fractions is accompanied by Th1 immunostimulatory potential and therapeutic cure *in vivo*. **Parasites & Vectors**, **8**: 1-24.

CHRISTENSEN, A.T.; MCLAUCHLAN, C.C.; DOLBECQ, A.; MIALANE, P. JONES, M.A. 2016. Studies of the Effectiveness of Bisphosphonate and Vanadium-Bisphosphonate Compounds *In Vitro* against Axenic *Leishmania tarentolae*. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, **2016**: 1-12.

COELHO, A.C.; OLIVEIRA, J.C.; ESPADA, C.R.; REIMÃO, J.Q.; TRINCONI, C.T.; ULIANA, S.R.B. 2016a. A Luciferase-Expressing *Leishmania braziliensis* Line That Leads to Sustained Skin Lesions in BALB/c Mice and Allows Monitoring of Miltefosine Treatment Outcome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **10 (5)**: e0004660.

COELHO, A.C.; TRINCONI, C.T.; COSTA, C.H.N.; ULIANA, S.R.B. 2016b. *In Vitro* and *In Vivo* Miltefosine Susceptibility of a *Leishmania amazonensis* Isolate from a Patient with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis: Follow-Up. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **10 (7)**: e0004720.

COLOTTI, G.; ILARI, A.; FIORILLO, A.; BAIOTTO, P.; CINELLU, M.A.; MAIORE, L.; SCALETTI, F.; GABBIANI, C.; MESSORI, L. 2013. Metal-based compounds as prospective antileishmanial agents: inhibition of trypanothione reductase by selected gold complexes. **ChemMedChem**, **8 (10)**: 1634-1637.

COUPPIE, P.; CLYTI, E.; SAINTE-MARIE, D.; DEDET, J.P.; CARME, B.; PRADINAUD, R. 2004. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **71**: 558-60.

CRAIG, S.; GAO, L.; LEE, I.; GRAY, T.; BERDIS, A.J. 2012. Gold-Containing Indoles as Anticancer Agents That Potentiate the Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation. **Journal of Medicinal Chemistry**, **55**: 2437-2451.

DA SILVA, R.E.; JÚNIOR, A.T.; SENNA, M.C.; RABELLO, A.; COTA, G. 2016. Intralesional meglumine antimoniate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **111 (8)**: 512-516.

DE MENEZES, J.P.B.; GUEDES, C.E.S.; PETERSEN, A.L.O.A.; FRAGA, D.B.M.; VERAS, P.S.T. 2015. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. **BioMed Research International**, **2015**: 1-11.

DE MENEZES, J.P.; SARAIVA, E.M.; ROCHA-AZEVEDO, B. 2016. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & Vectors**, **9**: 1-8.

DE MORAIS, C.G.V.; LIMA, A.K.C.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R.F.; DA-SILVA, S.A.G.; DUTRA, P.M.L. 2015. The Dialogue of the Host Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, **2015**: 1-19.

DERMANI, F.K.; SAIDIJAM, M.; AMINI, R.; MAHDAVINEZHAD, A.; HEYDARI, K.; NAJAFI, R. 2016. Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, **9999**: 1-9.

DIAZ, M.; DEGENS, H.; VANHEES, L.; AUSTIN, C.; AZZAWI, M. 2016. The effects of resveratrol on aging vessels. **Experimental Gerontology**, **85**: 41-47.

DO AMARAL, A.E.; PETKOWICZ, C.L.O.; MERCÊ, A.L.R.; IACOMINI, M., MARTINEZ, G.R.; MERLIN ROCHA, M.E.M.; CADENA, S.M.S.C.; NOLETO, G.R. 2015. Leishmanicidal activity of polysaccharides and their oxovanadium(IV/V) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry** **90**: 732-741.

DOCHERTY, J.J.; FU, M.M.; STIFFLER, B.S.; LIMPEROS, R.J.; POKABLA, C.M.; LUCIA, A.L. 1999. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. **Antiviral Research**, **43**: 145-155.

DORLO, T.P.C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **67**: 2576-2597.

DUTTA, A.; GHOSHAL, A.; MANDAL, D.; MONDAL, N.B.; BANERJEE, S.; SAHU, N.P.; MANDAL, C. 2007. Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 1196-1204.

EL-HANI, C.N.; BORGES, V.M.; WANDERLEY, J.L.M.; BARCINSKI, M.A. 2012. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, **2**: 1-6.

ELMORE, S. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, **35**: 495-516.

EZATPOUR, B.; DEZAKI, E.S.; MAHMOUDVAND, H.; AZADPOUR, M.; EZZATKHAH, F. 2015. *In Vitro* and *In Vivo* Antileishmanial Effects of *Pistacia khinjuk* against *Leishmania tropica* and *Leishmania major*. Evidence-Based **Complementary and Alternative Medicine**, **2015**: 1-6.

FEIJÓ, D.; TIBÚRCIO, R.; AMPUERO, M.; BRODSKYN, C.; TAVARES, N. 2016. Dendritic Cells and *Leishmania* Infection: Adding Layers of Complexity to a Complex Disease. **Journal of Immunology Research**, **2016**: 1-9.

FERREIRA, C.; SOARES, D.C.; NASCIMENTO, M.T.C.; PINTO-DA-SILVA, L.H.; SARZEDAS, C.G.; TINOCO, L.W.; SARAIVA, E.M. 2014. Resveratrol Is Active against *Leishmania amazonensis*: *In Vitro* Effect of Its Association with Amphotericin B. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, **58 (10)**: 6197-6208.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. 2011. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, **28**: 2758-2770.

FLORENTINO, P. T. V.; REAL, F.; BONFIM-MELO, A.; ORIKAZA, C.M.; FERREIRA, E. R.; PESSOA, C. C.; LIMA, B.R.; SASSO, G. R. S.; MORTARA, R.A. 2014. An Historical Perspective on How Advances in Microscopic Imaging Contributed to Understanding the *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Host-Parasite Relationship. **BioMed Research International**, **2014**: 1-16.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E.; 2013. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, **76**: 1505-1508.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; KINSELLA, J.E. 1993. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet** **341**: 1103-1104.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J.M.; ALNEMRI, E.S.; BAEHRECKE, E.H.; BLAGOSKLONNY, M.V.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V.L.; EL-DEIRY, W.S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D.R.; HENGARTNER, M.O.; KEPP, O.; KNIGHT, R.A.; KUMAR, S.; LIPTON, S.A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUÑEZ, G.; PETER, M.E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D.C.; SHI, Y.; SIMON, H.U.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, **19**: 107-120.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. 2012. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, **2**: 1-9.

GLIŠIĆ, B.D.; DJURAN, M.I. 2014. Gold complexes as antimicrobial agents: an overview of different biological activities in relation to the oxidation state of the gold ion and the ligand structure. **Dalton Transactions**, **43**: 5950-5969.

GODINHO, J.L.P.; GEORGIKOPOULOU, K.; CALOGEROPOULOU, T.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. 2013. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity *in vitro* against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, **135**: 153-165.

GODINHO, J.L.P.; SIMAS-RODRIGUES, C.; SILVA, R.; ÜRMENYI, T.P.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. 2012. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **39**: 326-331.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, **126 (1)**: 131-138.

GUTIÉRREZ, V.; SEABRA, A.B.; REGUERA, R.M.; KHANDARE, J.; CALDERÓN, M. 2016. New approaches from nanomedicine for treating leishmaniasis. **Chemical Society Reviews**, **45**: 152-168.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S. 2011. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, **2011**: 1-23.

HANDLER, M.Z.; PATEL, P.A.; KAPILA, R.; AL-QUBATI, Y.; SCHWARTZ, R.A. 2015. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Clinical perspectives. **Journal of the American Academy of Dermatology**, **73**: 897-908.

HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ, E.L.; KATO, H.; MARTINI, L.R.; VELEZ, L.N.; UEZATO, H. 2016. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical Medicine and Health**, **44 (2)**: 1-9.

HOWARD, M.K.; SAYERS, G.; MILES, M.A. 1987. *Leishmania donovani* Metacyclic Promastigotes: Transformation *in vitro*, Lectin Agglutination, Complement Resistance, and Infectivity. **Experimental Parasitology**, **64**: 147-156.

INACIO, J.D.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. 2013. In Vitro and in Vivo Effects of (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, **76**: 1993-1996.

INDRAN, I.R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. 2011. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1807**: 735-745.

JAIN, M.V.; PACZULLA, A.M.; KLONISCH, T.; DIMGBA, F.N.D.; RAO, S.B.; ROBERG, K.; SCHWEIZER, F.; LENGGERKE, C.; DAVOODPOUR, P.; PALICHARLA, V.R.; MADDIKA, S.; ŁOS, M. 2013. Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **Journal of Cellular and Molecular Medicine** **17 (1)**: 12-29.

JIRMANUS, L.; GLESBY, M.J.; GUIMARÃES, L.H.; LAGO, E.; ROSA, M.E.; MACHADO, P.R.; CARVALHO, E.M. 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, **6(3)**: 426-433.

JUNG, H.J.; HWANG, I.A.; SUNG, W.S.; KANG, H.; KANG, B.S.; SEU, Y.B.; LEE, D.G. 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. **Archives of Pharmacal Research**, **28**: 557-560.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S.E. 2011. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, **4**: 1-8.

KAUR, S.; SACHDEVA, H.; DHURIA, S.; SHARMA, M; KAUR, T. 2010. Antileishmanial effect of cisplatin against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, **59**: 62-69.

KEDZIERSKI, L.; CURTIS, J.M.; KAMINSKA, M.; JODYNIS-LIEBERT, J.; MURIA, M. 2007. *In vitro* antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitology Research**, **102**: 91-97.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J. H. 2015. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics** **33**, 579-593.

KIEL, J.A.K.W. 2010. Autophagy in unicellular eukaryotes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, **365**: 819-830.

KIM, C.W.; HWANG, K.A.; CHOI, K.C. 2016. Anti-metastatic potential of resveratrol and its metabolites by the inhibition of epithelial-mesenchymal transition, migration, and invasion of malignant cancer cells. **Phytomedicine**, **23**: 1787-1796.

KIMA, P.E. 2014. *Leishmania* molecules that mediate intracellular pathogenesis. **Microbes and Infection**, **16**: 721-726.

KLINGBEIL, M.F.G. 2010. **Ação do *Viscum album* em cultivo celular de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço**. Dissertação acadêmica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil, 161p.

KUMAR, R.T.K.; LIU, S.; MINNA, J.D.; PRASAD, S. 2016. Monitoring drug induced apoptosis and treatment sensitivity in non-small cell lung carcinoma using dielectrophoresis. **Biochimica et Biophysica Acta**, **1860**: 1877-1883.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V.C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; SILVA, S.O. 2013. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, **60**: 17-28.

LAZO, R.F.S.; HASHIGUCHI, Y. 1994. Generalized cutaneous leishmaniasis: a parasitologically confirmed case in Ecuador. In: **Studies on New World leishmaniasis and its transmission with particular reference to Ecuador** (ed. Hashiguchi, Y.), vol. 4, p. 93-98.

LEE, S.; ZHANG, J.; CHOI, A.M.K.; KIM, H.P. 2013. Mitochondrial Dysfunction Induces Formation of Lipid Droplets as a Generalized Response to Stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, **2013**: 1-10.

LIEVIN-LE MOAL, V.; LOISEAU, P.M. 2016. *Leishmania* hijacking of the macrophage intracellular compartments. **FEBS Journal** **283**: 598-607.

LUCAS, I.K.; KOLODZIEJ, H. 2013. In vitro Antileishmanial Activity of Resveratrol Originates from its Cytotoxic Potential against Host Cells. **Biological and Pharmacological Activity**, **79 (1)**: 20-26.

LÜDER, C.G.K.; CAMPOS-SALINAS, J.C.; GONZALEZ-REY, E.; VAN ZANDBERGEN, G. 2010. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & Vectors**, **3**: 1-11.

LU, R.; SERRERO, G. 1999. Resveratrol, a Natural Product Derived From Grape, Exhibits Antiestrogenic Activity and Inhibits the Growth of Human Breast Cancer Cells. **Journal of Cellular Physiology**, **179**: 297-304.

MACHADO, P.A. 2013. **Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisómeros do resveratrol em *Leishmania amazonensis***. Dissertação acadêmica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, 88 p.

MACHADO, P.A.; HILÁRIO, F.F.; CARVALHO, L.O.; SILVEIRA, M.L.T.; ALVES, R.B.; FREITAS, R.P.; COIMBRA, E.S. 2012. Effect of 3-Alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues in *Leishmania* Species Related to American Cutaneous Leishmaniasis. **Chemical Biology and Drug Design**, **80**: 745-751.

MALLICK, S.; DEY, S.; MANDAL, S.; DUTTA, A.; MUKHERJEE, D.; BISWAS, G.; CHATTERJEE, S.; MALLICK, S.; LAI, T.K.; ACHARYA, K.; PAL, C. 2015. A novel triterpene from *Astraeus hygrometricus* induces reactive oxygen species leading to death in *Leishmania donovani*. **Future Microbiology**, **10 (5)**: 763-789.

MALTEZOU, H.C. 2010. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, **2010**: 1-8.

MARINHO, F.A.; GONÇALVES, K.C.S.; OLIVEIRA, S.S.; GONÇALVES, D.S.; MATTEOLI, F.P.; SEABRA, S.H.; OLIVEIRA, A.C.S.C.; BELLIO, M.; OLIVEIRA, S.S.; SOUTO-PADRÓN, T.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H. 2014. The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Plos One**, **9 (1)**: e87659.

MARINHO, F.A.; GONÇALVES, K.C.S.; OLIVEIRA, S.S.; OLIVEIRA, A.C.S.C.; BELLIO, M.; D'AVILA-LEVY, C.M.; SANTOS, A.L.S.; BRANQUINHA, M.H. 2011. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106 (4)**: 507-509.

MATTE, C.; MARQUIS, J.F.; BLANCHETTE, J.; GROS, P.; FAURE, R.; POSNER, B. I.; OLIVIER, M. 2000. Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. **European Journal of Immunology**, **30**: 2555-2564.

MASANGO, M.G.; ELLIS, C.E.; BOTHA, C.J. 2015. Characterization of cell death caused by diploidiatoxin and dipmatol, toxic metabolites of *Stenocarpella maydis*. **Toxicon**, **102**: 14-24.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. 2014. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJM: An International Journal of Medicine**, **107**: 7-14.

MEARS, E.R.; MODABBER, F.; DON, R.; JOHNSON, G.E. 2015. A Review: The Current *In Vivo* Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **9(9)**: e0003889.

MEDINA, J.J.M.; NASO, L.G.; PÉREZ, A.L.; RIZZI, A.; FERRER, E.G.; WILLIAMS, P.A.M. 2017. Antioxidant and anticancer effects and bioavailability studies of the flavonoid baicalin and its oxidovanadium (IV) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **166**: 150-161.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; DE CASTRO, S. L. 2014. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International**, **2014**: 1-14.

MENNA-BARRETO, R.F.S.; GONCALVES, R.L.; COSTA, E.M.; SILVA, R.S.; PINTO, A.V.; OLIVEIRA, M.F.; DE CASTRO, S.L. 2009. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. **Free Radical Biology & Medicine**, **47(5)**: 644-653.

MESQUITA, J.T. 2013. **Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum***. Dissertação acadêmica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, 105 p.

MESQUITA, J.T.; PINTO, E.G.; TANIWAKI, N.N.; GALISTEO JR, A.J.; TEMPONE, A.G. 2013. Lethal action of the nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania (L.) infantum*. **Acta Tropica** **128**: 666-673.

MESQUITA-RODRIGUES, C.; MENNA-BARRETO, R.F.; SABÓIA-VAHIA, L.; DA-SILVA, S.A.; DE SOUZA, E.M.; WAGHABI, M.C.; CUERVO, P.; DE JESUS, J.B. 2013. Cellular growth and mitochondrial ultrastructure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* promastigotes are affected by the iron chelator 2,2-dipyridyl. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, **7 (10)**: 1-15.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Diagnóstico Clínico e Diferencial**. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf. Acesso em 12 de novembro de 2016.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE 2014. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de Vigilância em Saúde**. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/novembro/27/guia-vigilancia-saude-linkado-27-11-14.pdf>. Acesso em 12 de novembro de 2016.
- MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. 2013. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Drugs**, **73**: 1889-1920.
- MONZOTE, L.; LACKOVA, A.; STANIEK, K.; STEINBAUER, S.; PICHLER, G.; JÄGER, W.; GILLE, L. 2016. The antileishmanial activity of xanthohumol is mediated by mitochondrial inhibition. **Parasitology**, : 1 13.
- MOOKERJEE BASU, J.; MOOKERJEE, A.; SEN, P.; BHAUMIK, S.; SEN, P.; BANERJEE, S.; NASKAR, K.; CHOUDHURI, S.K.; SAHA, B.; RAHA, S.; ROY, S. 2006. Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase activation in *Leishmania donovani* infected macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **50 (5)**: 1788-1797.
- MORAIS-TEIXEIRA, E.; DAMASCENO, Q.S.; GALUPPO, M.K.; ROMANHA, A.J.; RABELLO, A. 2011. The *in vitro* leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106 (4)**: 475-478.
- MOSSMAN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.
- MORRIS, R.E.; AIRD, R.E.; MURDOCH, M.S.; CHEN, H.; CUMMINGS, J.; HUGHES, N.D.; PARSONS, S.; PARKIN, A.; BOYD, G.; JODRELL, D.I.; SADLER, P.J. 2001. Inhibition of Cancer Cell Growth by Ruthenium(II) Arene Complexes. **Journal of Medicinal Chemistry**, **44 (22)**: 3616-3621.
- MURRAY, H.W.; OCA, M.J.; GRANGER, A.M.; SCHREIBER, R.D. 1989. Requirement for T cells and effect of lymphokines in successful chemotherapy for an intracellular infection. Experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**, **83 (4)**: 1253–1257.
- MUYLDER, G.; ANG, K.K.H.; CHEN, S.; ARKIN, M.R.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. 2011. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **5 (7)**: e1253.
- NASCIMENTO, A.A.S. 2011. **Atividade lítica pelo sistema complemento em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum* frente a componentes salivares de *Lutzomyia (Lutzomyia) longipalpis* (Diptera: Psychodidae)**. Dissertação acadêmica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 61p.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, **97 (16)**: 8841-8848.

NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. 2010. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, **15**: 1070-1078.

NYUNT, K.S.; ELKHATEEB, A.; TOSA, Y.; NABATA, K.; KATAKURA, K.; MATSUURA, H. 2012. Isolation of antitrypanosomal compounds from *Vitis repens*, a medicinal plant of Myanmar. **Natural Product Communications**, **7 (5)**: 609-610.

OKWOR, I.; UZONNA, J.E. 2016. Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, **309**: 32-36.

OZKOC, S.; TUNCAY, S.; DELIBAS, S.B.; AKISU, C. 2009. *In vitro* effects of resveratrol on *Trichinella spiralis*. **Parasitology Research**, **105**: 1139-1143.

PALADI, C.S.; PIMENTEL, I.A.S.; KATZ, S.; CUNHA, R.L.O.R.; JUDICE, W.A.S.; CAIRES, A.C.F.; BARBIÉRI, C.L. 2012. *In Vitro* and *In Vivo* Activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Plos One**, **6 (5)**: e1626

PALOQUE, L.; HEMMERT, C.; VALENTIN, A.; GORNITZKA, H. 2015. Synthesis, characterization, and antileishmanial activities of gold(I) complexes involving quinoline functionalized N-heterocyclic carbenes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **94**: 22-29.

PASSOS, C.L.A.; FERREIRA, C.; SOARES, D.C.; SARAIVA, E.M. 2015. Leishmanicidal Effect of Synthetic trans Resveratrol Analogs. **Plos One**, **10(10)**: e0141778.

PATEL, K.R.; SCOTT, E.; BROWN, V.A.; GESCHER, A.J.; STEWARD, W.P.; BROWN, K. 2011. Clinical trials of resveratrol. **Annals of the New York Academy of Sciences**, **1215**: 161-169.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, **10 (1)**: 111-129.

PROTO, W.R.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. 2013. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? **Nature Reviews**, **11**: 58-66.

RABITO, M.F.; BRITTA, E.A.; PELEGRINI, B.L.; SCARIOT, D.B.; ALMEIDA, M.B.; NIXDORF, S.L.; NAKAMURA, C.V.; FERREIRA, I.C.P. 2014. *In vitro* and *in vivo* antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. **Experimental Parasitology**, **143**: 18-23.

RAJASEKARAN, R.; CHEN, Y. P. (2015). Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. **Drug Discovery Today**, **20**: 959-968.

RAUF, M.K.; YASEEN, S.; BADSHAH, A.; ZAIB, S.; ARSHAD, R.; DIN, I.; TAHIR, M.N.; IQBAL, J. 2015. Synthesis, characterization and urease inhibition, in vitro anticancer and antileishmanial studies of Ni(II) complexes with *N,N,N'*-trisubstituted thioureas. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, **20**: 541-554.

RIBEIRO, G. A. 2011. **Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis***. Dissertação acadêmica, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 100 p.

RIBEIRO, G. A.; CUNHA-JÚNIOR, E.F.; PINHEIRO, R.O.; DA-SILVA, S.A.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; DA SILVA, A.J.; COSTA, P.R.; NETTO, C.D.; MELO, R.C., ALMEIDA-AMARAL, E.E.; TORRES-SANTOS, E.C. 2013. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **68** (4): 789-99.

RODRIGUES, A.P.D.; FARIAS, L.H.S.; CARVALHO, A.S.C.; SANTOS, A.S.; NASCIMENTO, J.L.M.; SILVA, E.O. 2014. A Novel Function for Kojic Acid, a Secondary Metabolite from *Aspergillus* Fungi, as Antileishmanial Agent. **Plos One**, **(9) 3**: e91259.

RODRIGUES, I.A., MAZOTTO, A.M.; CARDOSO, V.; ALVES, R.L.; AMARAL, A.C.F.; SILVA, J.R.A.; PINHEIRO, A.S.; VERMELHO, A.B. 2015. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, **2015**: 1-12.

RODRÍGUEZ, N.E.; WILSON, M.E. 2014. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. **Immunological Research**, **59**: 129-141.

SAAD, H.A.; SOLIMAN, M.I.; AZZAM, A.M.; MOSTAFA, B. 2015. Antiparasitic activity of silver and copper oxide nanoparticles against *Entamoeba histolytica* and *Cryptosporidium parvum* cysts. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology** **45** (3): 593-602.

SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHER, A. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. **The Journal of Immunology**, **135** (1): 564-569.

SAINI, A.K.; KUMARI, P.; SHARMA, V.; MATHUR, P.; MOBIN, S.M. 2016. Varying structural motifs in the salen based metal complexes of Co(II), Ni(II) and Cu(II): synthesis, crystal structures, molecular dynamics and biological activities. **Dalton Transactions**, **45**: 19096-19108.

SÁNCHEZ-MORENO, M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; SANZ, A.M.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; YUNTA, M.J.R. 2011. *In vitro* leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **67** (2): 387-397.

SANTOS, C.S.; BRODSKYN, C.I. 2014. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, **2** (165): 1-6.

SARDAR, A.H.; DAS, S.; AGNIHORTI, S.; KUMAR, M.; GHOSH, A.K.; ABHISHEK, K.; KUMAR, A.; PURKAIT, B.; ANSARI, M.Y.; DAS, P. 2013. Spinigerin induces apoptotic like cell death in a caspase independent manner in *Leishmania donovani*. **Experimental Parasitology**, **135**: 715-725.

SAVOIA, S. 2015. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **The Journal of Infection in Developing Countries**, **9 (6)**: 588-596.

SCOTT, P.; NOVAIS, F.O. 2016. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, **16 (9)**: 581-592.

SEN, R.; BANDYOPADHYAY, S.; DUTTA, A.; MANDAL, G.; GANGULY, S.; SAHA, P.; CHATTERJEE, M. 2007. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, **56**: 1213-1218.

SHANG, Y.J.; QIAN, Y.P.; LIU, X.D.; DAI, F.; SHANG, X.L.; JIA, W.Q.; LIU, Q.; FANG, J.G.; ZHOU, B. 2009. Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. **The Journal of Organic Chemistry**, **74**: 5025-5031.

SINHA, P.K.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; NATH, D.; MUKHERJEE, S.; ADITYA, A.K.; SUNDAR, S. 2011. Phase 4 Pharmacovigilance Trial of Paromomycin Injection for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India. **Journal of Tropical Medicine**, **2011**: 1-7.

SINGH, O.P.; SUNDAR, S. 2014. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. **Frontiers in Immunology**, **5**: artigo 296, 1-9.

SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; RUIZ, A.J.; SCOULICA, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. 2010. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & Vectors**, **3**: 1-15.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. 2004. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **40**: 139-149.

SON, I.H.; CHUNG, I.M.; LEE, S.; MOON, H.I. 2007. Antiplasmodial activity of novel stilbene derivatives isolated from *Parthenocissus tricuspidata* from South Korea. **Parasitology Research**, **101**: 237-241.

SOUSA, A.Q.; POMPEU, M.M.L.; SÓLON, F.R.N.; FRUTUOSO, M.S.; TEIXEIRA, M.J.; SILVA, T.M.J. 2006. Disseminated cutaneous leishmaniasis: a patient with 749 lesions. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, **10**: 230-0.

STEBUT, E.V. 2015. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology**, **13 (3)**: 191-201.

- STEFANELLO, T.F.; PANICE, M.R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M.H.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C.V. 2014. *N*-Butyl-[1-(4-Methoxy)Phenyl-9*H*-Carboline]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **58 (12)**: 7112-7120.
- SU, Z., YANG, Z., XU, Y., CHEN, Y. AND YU, Q. 2015. Apoptosis, autophagy, necroptosis and cancer metastasis. **Molecular Cancer**, **48**: 1-14.
- TIUMAN, T.S.; BREZANA, M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D., CORTEZA, D.A.G.; NAKAMURA, C.V. 2012. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mamea A/BB. **Phytomedicine**, **19**: 1196-1199.
- TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALONSO, A.; NAKAMURA, C.V. 2014. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. **BMC Microbiology**, **14**: 1-12.
- TOLOMEO, M.; ROBERTI, M.; SCAPOZZA, L.; TARANTELLI, C.; GIACOMINI, E.; LUCINA TITONE, L.; SAPORITO, L.; DI CARLO, P.; COLOMBA, C. 2013. TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, **133**: 37-43.
- TRIPATHI, A.; GUPTA, C.M. 2003. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. **Molecular & Biochemical Parasitology** **128**: 1-9.
- TURETZ, M.L.; MACHADO, P.R.; KO, A.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R.P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W.D., CARVALHO, E.M. 2002. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, **186**: 1829-1834.
- VAKIL, N.H.; FUJINAMI, N.; SHAH, P.J. 2015. Pharmacotherapy for Leishmaniasis in the United States: Focus on Miltefosine. **Pharmacotherapy**, **35(5)**: 536-545.
- VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**, **51**: 337-351.
- VERMA, N.K.; DEY, C.S. 2004. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **48 (8)**: 3010-3015.
- VOLPATO, H.; DESOTI, V.C.; COGO, J.; PANICE, M.R.; SARRAGIOTTO, M.H.; SILVA, S.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V. 2013. The Effects of *N*-Butyl-1-(4-di-methylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* Are Mediated by Mitochondrial Dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, **2013**: 1-7.

VRIES, H.J.C.; REEDIJK, S.H.; SCHALLIG, H.D.F.H. 2015. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, **16 (2)**: 99-109.

WANDERLEY, J.L.M.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M.E.C.; BARCINSKI, M.A. 2005. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/*Leishmania* interplay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **38**: 807-812.

WANG, C.; QIN, X.; HUANG, B.; HE, F.; ZENG, C. 2010. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine-cyanurate complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, **402 (4)**: 773-777.

WHO 2010. Technical Report Series, 949. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 10 de novembro de 2016.

WHO 2015. World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 15 julho 2015.

WHO 2016. **Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014**. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>. Acesso em 25 de novembro de 2016.

WHO 2017. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em 17 de janeiro de 2017.

ZHANG, N.; KIMA, P.E. 2016. *Leishmania* infection engages non-Receptor Protein Kinases Differentially to Persist in infected Hosts. **Frontiers in Immunology**, **7**: 1-5.

ZHANG, Z.; WANG, H.; YAN, M.; WANG, H.; ZHANG, C. 2016. Novel copper complexes as potential proteasome inhibitors for cancer treatment (Review). **Molecular Medicine Reports**, **15 (1)**: 3-11.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. 2004. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, **19**: 124-128.

ANEXO I

Certificados de aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora.

APÊNDICE I

Artigo publicado:

Vinicius Zamprogno Mota; Gustavo Senra Gonçalves de Carvalho; Adilson David da Silva; Luiz Antônio Sodré Costa; Patrícia de Almeida Machado; Elaine Soares Coimbra; Carmen Veríssima Ferreira; Silvia Mika Shishido; Alexandre Cuin. **Gold complexes with benzimidazole derivatives: synthesis, characterization and biological studies.** Revista Biometals, 2014.

APÊNDICE II

Artigo publicado:

Patrícia de Almeida Machado; Vinícius Zamprogno Mota; Ana Clara de Lima Cavalli; Gustavo Senra Gonçalves de Carvalho; Adilson David Da Silva; Jacy Gameiro; Alexandre Cuin; Elaine Soares Coimbra. **High selective antileishmanial activity of vanadium complex with stilbene derivative.** Revista Acta Tropica, 2015.

APÊNDICE III

Artigo submetido:

Patricia de Almeida Machado; Jessica O. F. Morais; Gustavo S. G. Carvalho; Wallace P. Lima; Gilson C. Macedo; Elizandra A. Britta; Celso V. Nakamura; Adilson D. da Silva; Alexandre Cuin; Elaine Soares Coimbra. **Further evidence of the leishmanicidal effect of VOSalophen, a vanadium complex with a stilbene derivative: induction of apoptosis, autophagy and efficiency in experimental cutaneous leishmaniasis.** Revista Parasitology, 2017.