

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS

**Stephane Lima Calixto**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE DERIVADOS DE 4-AMINO-7-  
CLOROQUINOLINA EM *Leishmania* sp E POSSÍVEIS MECANISMOS  
DE MORTE DO PARASITO**

Juiz de Fora  
2018

**STEPHANE LIMA CALIXTO**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DE DERIVADOS DE 4- AMINO-7-  
CLOROQUINOLINA EM *Leishmania* sp E POSSÍVEIS MECANISMOS  
DE MORTE DO PARASITO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elaine Soares Coimbra  
Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva**

Juiz de Fora

2018

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

Calixto, Stephane Lima.

ATIVIDADE IN VITRO DE DERIVADOS DE 4-AMINO-7  
CLOROQUINOLINA EM *Leishmania* sp E POSSÍVEIS  
MECANISMOS DE MORTE DO PARASITO / Stephane Lima

Calixto. -- 2018.

98 f. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2018.

1. Quinolinas. 2. 4-amino-7-cloroquinolinas. 3. *L. amazonensis*. 4. Apoptose-like. 5. Mitocôndria. I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. Silva, Adilson David da, coorient. III. Título.

**STEPHANE LIMA CALIXTO**

**ATIVIDADE IN VITRO DE DERIVADOS DE 4-AMINO-7-CLOQUINOLINA EM  
*Leishmania* sp E POSSÍVEIS MECANISMOS DE MORTE DO PARASITO**

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22 / 02 / 2018.

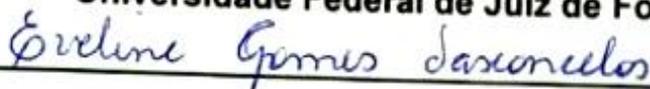
**BANCA EXAMINADORA:**



**Prof.ª Dr.ª Elaine Soares Coimbra**

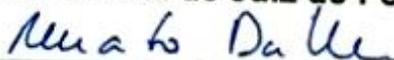
**Orientadora**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Prof.ª Dr.ª Eveline Gomes Vasconcelos**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**



**Prof. Dr. Renato Augusto DaMatta**

**Universidade Estadual do Norte Fluminense**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por toda proteção e inspiração, por iluminar a minha vida, me dando forças para alcançar os meus objetivos.

À minha mãe, Cleuza, e ao meu pai, Calixto, por todo amor, carinho, dedicação e incentivo. Por sempre acreditarem em mim, e estarem ao meu lado na realização de mais um sonho.

Ao Axel, por todo amor, paciência e compreensão.

À Professora Elaine por toda orientação, dedicação, incentivo e carinho, tornando a jornada mais amena.

À Dra. Patrícia Machado e Dra. Luciana Antinarelli, por todo conhecimento transmitido e disponibilidade, essenciais para a conclusão deste trabalho.

À todos os membros do NUPEP, por todas as conversas e risadas, que tornaram os meus dias mais divertido.

À Juliana Granato, pelo companheirismo desde o início, por ter sido amiga e parceira de trabalho, essencial para que eu chegasse até ao fim.

Ao Professor Adilson e ao aluno Nicolás, pela síntese dos compostos químicos avaliados nessa dissertação.

Aos Professores Gilson Macedo e Renato DaMatta, por colaborarem com o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os meus amigos e familiares, pelo apoio, paciência e incentivo.

À UFJF, Capes, FAPEMIG, FAPERJ e CNPq pelo apoio financeiro ao trabalho.

E a todos aqueles que contribuíram para realização deste trabalho de alguma forma.

*“Se consegui ver mais longe  
é porque estava aos ombros de gigantes”.*  
(Isaac Newton)

## RESUMO

As leishmanioses são doenças infecciosas, porém não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os fármacos atualmente empregados para o tratamento das leishmanioses apresentam inúmeros problemas, como alta toxicidade, são dispendiosos, além de mostrarem baixa eficácia em áreas endêmicas devido à resistência observada de várias espécies do parasito. Visto derivados de quinolinas apresentarem como uma classe de moléculas promissoras para o tratamento das leishmanioses, este trabalho teve como objetivo analisar o efeito antileishmanial de novos derivados 4-amino-7-cloroquinolina e a toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos. Objetivou-se também avaliar o modo de ação do composto mais efetivo. Dentre os três compostos avaliados, genericamente denominados de derivados de quinolina (DQ), o composto mais promissor foi o DQ3 (CI<sub>50</sub> de 43,25 e 39,19 µM para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente; CC<sub>50</sub> de 226,79 µM; e CI<sub>50</sub> de 5,62 e 5,48 para amastigotas de *L. amazonensis* PH8 e GFP, respectivamente), sendo então o escolhido para os estudos dos possíveis mecanismos de morte celular. Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com o composto DQ3 e posteriormente as células foram analisadas quanto a vários parâmetros morfológicos, ultraestruturais e bioquímicos. O tratamento dos promastigotas com o composto DQ3 induziu redução do potencial de membrana mitocondrial, observado pelas marcações com JC-1 e rodamina 123, inchaço mitocondrial observado pela MET e aumento da produção de ROS (marcação com H<sub>2</sub>DCDFA), sugerindo que o composto tem a mitocôndria como um alvo importante. Além disso, induziu externalização de fosfatidilserina (marcação com anexina V), aumento na população de células na fase sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, indução de núcleo apoptótico e alterações morfológicas (corpos arredondados e redução do volume celular). Esses dados sugerem que o composto possa induzir apoptose-like em *L. amazonensis*. Descartou-se a hipótese de morte por necrose e autofagia, visto que a membrana plasmática se manteve íntegra e não foi observado, pela marcação com MDC, a formação de vacúolos autofágicos. O tratamento dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* induziu aumento na produção de ROS, entretanto o mesmo não foi observado em macrófagos não infectados, sugerindo o estresse oxidativo como um modo de ação deste composto. Também, o tratamento induziu alterações morfológicas nos amastigotas intracelulares. Os resultados obtidos, *in vitro*, mostram que o composto DQ3 apresenta potencial para ser um agente antileishmanial, estimulando a continuidade da pesquisa no modelo *in vivo*.

Palavras-chave: Quinolinas. 4-amino-7-cloroquinolinas. *L. amazonensis*. Apoptose-like. Mitocôndria.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious but non-contagious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. The drugs currently used for the treatment of leishmaniasis present numerous problems, such as high toxicity, are expensive, and show low efficacy in endemic areas due to the observed resistance of several species of the parasite. Given quinolines derivatives as a class of promising molecules for the treatment of leishmaniasis, this work aimed to analyze the antileishmanial effect of new 4-amino-7-chloroquinoline derivatives and the toxicity in mouse peritoneal macrophages. The objective of this study was also to evaluate the mode of action of the most effective compound. Among the three evaluated compounds, generically denominated quinoline derivatives (DQ), the most promising compound was DQ3 (IC<sub>50</sub> of 43.25 and 39.19  $\mu$ M for *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes, respectively, CC<sub>50</sub> of 226.79  $\mu$ M, and IC<sub>50</sub> of 5.62 and 5.48 for amastigotes of *L. amazonensis* PH8 and GFP, respectively), being then chosen for the studies of the possible mechanisms of cell death. Promastigotes of *L. amazonensis* were treated with the compound DQ3 and later the cells were analyzed for several morphological, ultrastructural and biochemical parameters. Treatment of the promastigotes with the DQ3 compound induced reduction of the mitochondrial membrane potential observed by the JC-1 and rhodamine-123 markers, mitochondrial swelling observed by MET and increased ROS production (H<sub>2</sub>DCDFA labeling), suggesting that the compound has the mitochondria as an important target. In addition, it induced phosphatidylserine externalization (annexin V labeling), increase in cell population in the sub G0/G1 phase, induction of apoptotic nucleus and morphological changes (rounded bodies and reduction of cell volume). These data suggest that the compound may induce apoptosis-like in *L. amazonensis*. The hypothesis of death due to necrosis and autophagy was discarded, since the plasma membrane remained intact and the formation of autophagic vacuoles was not observed by MDC labeling. The treatment of macrophages infected with *L. amazonensis* induced an increase in the production of ROS, but the same was not observed in uninfected macrophages, suggesting oxidative stress as a mode of action of this compound. Also, the treatment induced morphological changes in intracellular amastigotes. The results obtained, *in vitro*, show that the compound DQ3 presents potential to be an antileishmanial agent, stimulating the continuity of the research in the *in vivo* model.

Keywords: Quinolines. 4-amino-7-chloroquinolines. *L. amazonensis*. Apoptosis-like. Mitochondria.

## LISTA DE FIGURA

Figura 1: Leishmaniose Cutânea no Brasil .....	19
Figura 2: Leishmaniose Visceral no Brasil .....	21
Figura 3: Taxonomia da família Trypanosomatidae .....	23
Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. (A) Macrófagos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	24
Figura 5: Ciclo biológico do parasito <i>Leishmania</i> .....	27
Figura 6: Estrutura química e nome comercial das principais drogas usadas para o tratamento das leishmanioses .....	32
Figura 7: Estrutura do derivado de 4-amino-7-cloroquinolina que originou os compostos utilizados neste trabalho .....	40
Figura 8: Delineamento experimental do trabalho .....	43
Figura 9: Efeito do composto DQ3 sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 72 horas de tratamento .....	61
Figura 10: Percentual de inibição de crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 24 horas de tratamento com o composto DQ3 .....	63
Figura 11: Fotomicrografia ilustrativa do efeito do tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M), após 24 horas, em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	64
Figura 12: Volume dos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas .....	65
Figura 13: Alterações do $\Delta\Psi_m$ de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas e avaliadas pela marcação com JC-1. ....	66
Figura 14: Alterações do $\Delta\Psi_m$ de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas e avaliadas pela marcação com rodamina 123 .....	67
Figura 15: Produção de ROS em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas, e marcados com H <sub>2</sub> DCFDA.....	69
Figura 16: Externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas, e duplamente marcado com Anexina V e PI.....	70
Figura 17: Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas e marcação com PI.....	71

<b>Figura 18: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 <math>\mu</math>M) por 24 horas, através da marcação com PI .....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 19: Avaliação da ocorrência de autofagia em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 <math>\mu</math>M) por 24 horas e marcação com MDC .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 20: Produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i>, e tratados com o composto DQ3.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 21: Imagens ultraestruturais de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o composto DQ3.....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 22: Mecanismo de morte proposto para o composto DQ3 em formas promastigotas, e alterações provocadas em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i>.....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE TABELA

Tabela 1: Nome e estrutura química dos compostos derivados de quinolina (DQ). .....	44
Tabela 2: Efeito dos compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em macrófagos peritoneais, promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp .....	60
Tabela 3: IS e IE do composto DQ3 em <i>L. amazonensis</i> .....	62
Tabela 4: Cálculo do índice de variação (IV) de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 $\mu$ M) por 24 horas e avaliadas pela marcação com rodamina 123. ....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BHI	“Brain Heart Infusion” Infusão de coração e cérebro
CBR	Centro de Biologia da Reprodução
CC <sub>50</sub>	Concentração citotóxica do composto que mata 50% das células
CEEA	Comitê de Ética em experimentação Animal
CI <sub>50</sub>	Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário
DNA	“Deoxyribonucleic acid” Ácido desoxirribonucleico
DQ	Derivado de Quinolina
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
FCCP	Carboxicianeto-4-(trifluorometoxi)-fenilhidrazona
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	“Forward scatter”
GFP	“Green Fluorescent Protein” Proteína verde fluorescente
H <sub>2</sub> DCFDA	2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato
IE	Índice de especificidade
IM	Intramuscular
IS	Índice de seletividade
IV	Índice de Variação
IVE	Via intravenosa
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
MC	Mediana de fluorescência dos parasitos do controle negativo
MDC	Monodansilcadaverina
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MT	Mediana de fluorescência dos parasitos tratados
MTT	3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

OMS Organização Mundial de Saúde  
PBS "Phosphate Buffer Saline" Salina Tampão Fosfato  
PI "Propidium Iodide" Iodeto de Propídio  
ROS "Reactive oxygen species" Espécies reativas de oxigênio  
RPMI "Roswell Park Memorial Institute" Instituto Parque Memorial Roswell  
Sb+3 Antimonial trivalente  
Sb+5 Antimonial pentavalente  
SBF Soro bovino fetal  
TNF "Tumor necrosis fator" Fator de Necrose Tumoral  
UFJF Universidade Federal de Juiz de Fora  
VP Vacúolo parasitóforo  
 $\Delta\Psi_m$  Potencial de membrana mitocondrial

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	17
1.1 Leishmanioses .....	17
1.2 O parasito <i>Leishmania</i> .....	22
1.3 Manifestações clínicas .....	27
1.4 Tratamentos das leishmanioses.....	31
1.5 Morte celular em <i>Leishmania</i> sp .....	36
1.6 Quinolinas .....	39
2 OBJETIVOS .....	41
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos .....	41
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	43
3.1 Compostos utilizados .....	43
3.2 Cultivo dos parasitos .....	44
3.3 Seleção das formas promastigotas fluorescentes de <i>L. amazonensis</i> transfectada com GFP .....	45
3.4 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas de <i>Leishmania</i> sp. .....	45
3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em macrófagos .....	46
3.6 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp.....	48
3.7 Determinação do índice de seletividade (IS) e do índice de especificidade (IE) do composto DQ3 .....	50
3.8 Determinação do mecanismo de morte em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	50
3.8.1 Avaliação da morfologia e do volume de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	51
3.8.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto DQ3 .....	52
3.8.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3.....	53

3.8.4 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	53
3.8.5 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	54
3.8.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	54
3.8.7 Análise quanto a formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	55
3.9 Avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados por amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , e tratados com o composto DQ3 .....	56
3.10 Avaliação ultraestrutural de promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	57
3.11 Análise estatística .....	58
3.12 Considerações éticas .....	58
4 RESULTADOS .....	59
4.1 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas, e amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> sp e em macrófagos .....	59
4.2 Índice de seletividade (IS) e especificidade (IE) do composto DQ3 .....	61
4.3 Determinação do mecanismo de morte em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	62
4.3.1 Avaliação da morfologia e do volume de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	63
4.3.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto DQ3 .....	65
4.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	68
4.3.4 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	69
4.3.5 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	70
4.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	71
4.3.7 Análise quanto a formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	72
4.4 Avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , e tratados com o composto DQ3 .....	73

4.5 Avaliação ultraestrutural de promastigotas e amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> tratados com o composto DQ3 .....	74
5 DISCUSSÃO .....	76
6 CONCLUSÕES .....	85
7 REFERÊNCIAS.....	86
APÊNDICE A: “ <i>In vitro</i> activity and death mechanism of quinoline derivatives in <i>Leishmania</i> spp.” (Artigo submetido).....	96
APÊNDICE B: Trabalhos indiretos .....	97
ANEXO A: Certificados CEUA.....	98

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças infecciosas, porém não contagiosas, causadas por protozoários intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*, e que estão amplamente distribuídas em áreas tropicais e subtropicais, afetando cerca de 98 países na Europa, África, Ásia e América (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; STEVERDING, 2017). As leishmanioses estão associadas a desnutrição, moradia precária, sistema imunológico deprimido e falta de recursos financeiros, afetando, principalmente, regiões mais pobres, e por isso são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2012; WHO, 2016). A OMS também aponta que as leishmanioses estão na categoria de doenças emergentes e não controladas (DE VRIES et al., 2015).

As estimativas recentes mostram que existem, em todo o mundo, cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e 350 milhões de pessoas expostas ao risco de contrair a doença (WHO, 2012). A incidência anual de morte é cerca de 20-30 mil pessoas (é a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias, ficando atrás apenas da Malária), e de novos casos é de aproximadamente 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (LV) e 0,7 a 1,2 milhões de leishmaniose cutânea (LC), porém, devido à subnotificação, a incidência e prevalência real da doença pode ser significativamente maior (WHO, 2017; ALVAR et al., 2012; STEVERDING, 2017). Desses novos casos, cerca de 90% ocorrem nos países como Afeganistão, Argélia, Quênia, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão do Sul, Sudão, Síria e Somália (WHO, 2016).

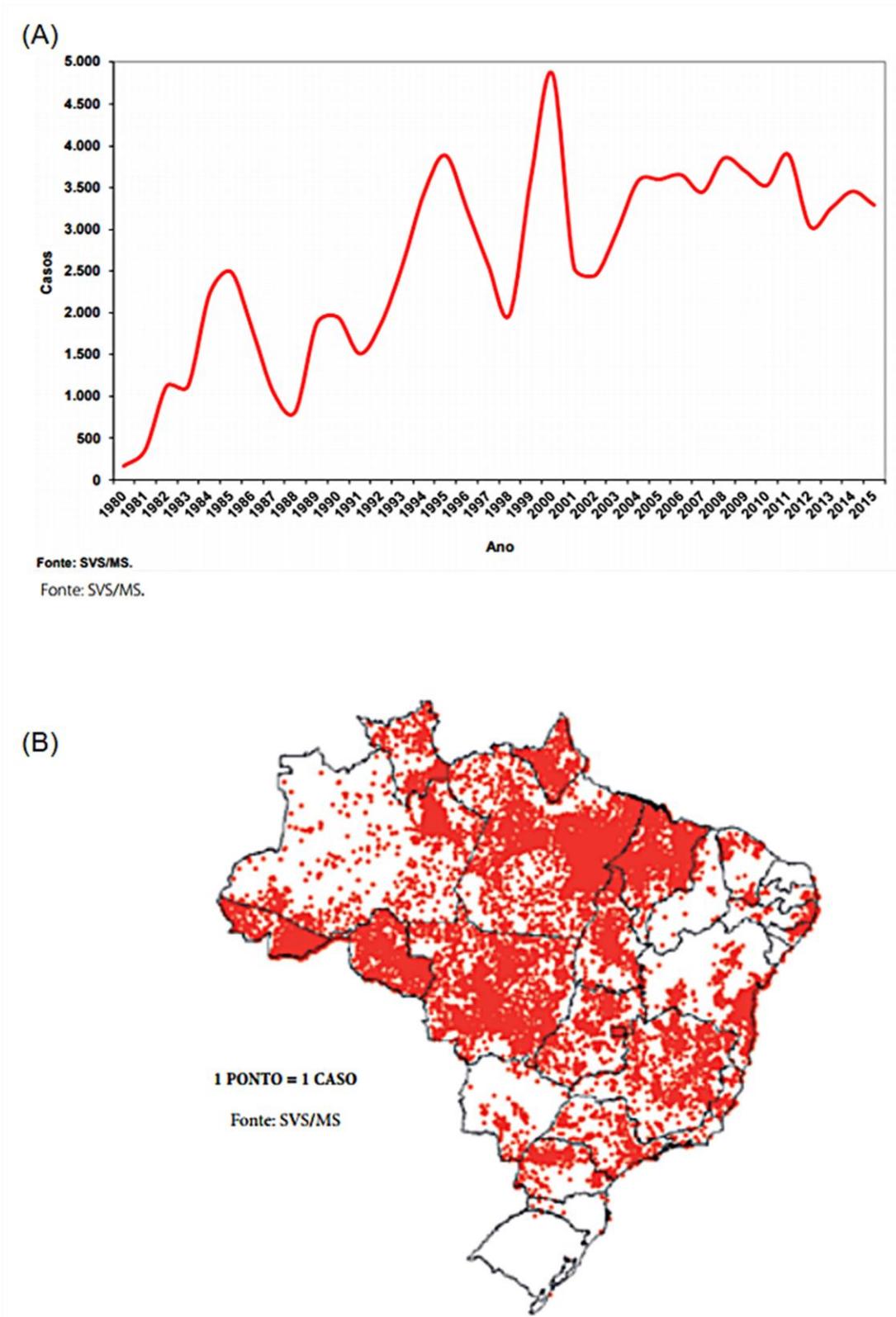
Aproximadamente 53 espécies de *Leishmania* são descritas na literatura, dentre elas 31 são conhecidas por infectar mamíferos (que podem funcionar como reservatórios), e 20 são patogênicas ao homem (VON STEBUT, 2015; AKHOUNDI et al., 2016). As leishmanioses podem apresentar desde infecções assintomáticas em indivíduos aparentemente sadios ou se apresentar como duas formas principais, leishmaniose visceral (LV) ou leishmaniose cutânea (LC). Independente da forma clínica, pacientes imunossuprimidos, crianças e idosos apresentam maior tendência

a desenvolver a doença de uma forma mais severa (VON STEBUT, 2015; STEVERDING, 2017).

A transmissão do parasito ocorre através da picada de fêmeas de insetos vetores denominados flebotomíneos, infectadas com *Leishmania* sp. Muitas espécies dos gêneros *Phlebotomus*, responsável pela transmissão no “Velho Mundo”, e *Lutzomyia*, no “Novo Mundo”, já foram descritos como vetores comprovados ou suspeitos de transmitir leishmaniose ao homem (HASHIGUCHI et al., 2016; STEVERDING, 2017). Os flebotomíneos apresentam apenas 2 mm de largura, sendo muito menor quando comparado a um mosquito doméstico, e possuem hábitos noturnos, evitam o vento e só conseguem voar distâncias curtas. Esses vetores, quando estão infectados com o parasito *Leishmania*, apresentam um método adaptativo, que é a tendência de sondar o mesmo hospedeiro várias vezes, que conseqüentemente, aumenta as chances de transmissão. Eles podem ser encontrados por todo o mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (VON STEBUT, 2015). A presença do inseto vetor em várias regiões do planeta associado ao seu pequeno tamanho, entre outros fatores, dificultam o controle vetorial.

Nas Américas, o Brasil é considerado como um dos países com maior número de casos de leishmanioses. No país, estas doenças eram consideradas inicialmente zoonoses de animais silvestres, acometendo principalmente pessoas que residiam em áreas rurais. No entanto, nos últimos anos, observou-se uma mudança nesse perfil, ocorrendo um aumento no número de casos em regiões periurbanas e urbanas no Brasil (BRASIL, 2016).

Em relação a LC, apresentam casos registrados em todas as regiões do Brasil, sendo que no período de 1995 a 2014 a média anual de novos casos foi de 25.763, e o coeficiente de detecção médio de 14,7 casos por 100 mil habitantes. Tem maior predominância na faixa etária superior a 10 anos (92,5% do total de casos) e no sexo masculino (74% no ano de 2014), apesar de ocorrer em todas as faixas etárias e sexo (Brasil, 2017). Na Figura 1A, observa-se que a partir de 1985 existem alguns picos de aumento no número de casos, no entanto, depois do ano 2000, ocorre uma tendência de redução desse número. Na Figura 1B encontra-se a distribuição dos casos de LC pelo Brasil, com maior concentração do número de casos nas regiões Centro-Oeste e Norte do país (BRASIL, 2015; 2016; 2017).

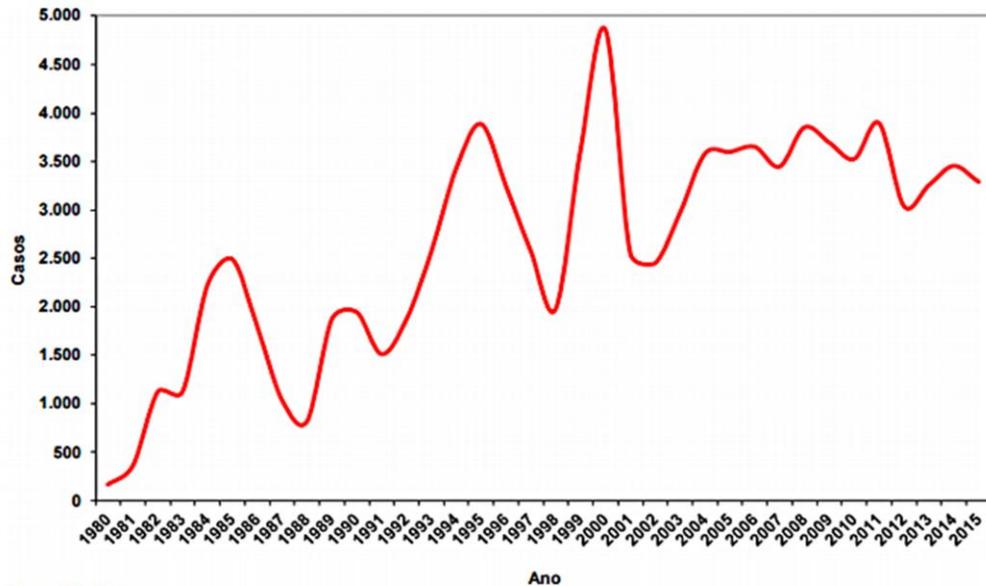


**Figura 1: Leishmaniose Cutânea no Brasil.** (A) Casos confirmados de leishmaniose cutânea, Brasil – 1980 a 2014. (B) Casos de leishmaniose cutânea por município, Brasil – 2015. Fonte: Brasil, 2017.

A LV é amplamente distribuída em todo o país, acometendo 21 estados, e as cinco regiões brasileiras. Entre os anos de 2000 e 2013, a média do número de

casos anual foi de 3.454 casos, e o coeficiente de incidência de 1,9 casos por 100 mil habitantes. A doença ocorre com maior frequência em crianças menores de 10 anos (41,9%) e no sexo masculino (62,8%) (BRASIL, 2015; 2016). Na Figura 2A tem-se o número de casos de LV confirmados no Brasil desde 1980 até 2015, onde observa-se picos de aumento no número de casos a cada 5 anos, e a partir de 2004 uma diminuição dos casos registrados. A distribuição de casos de LV no Brasil está representada na Figura 2B, onde observa-se um maior número na região nordeste (Portal da Saúde- Ministério da saúde, 2017). Ressalta-se entretanto que apesar desta região ainda ter o maior número de casos de LV, quando se compara com o final da década de 1990 onde eram registrados 90% dos casos no país, percebe-se uma mudança nos últimos anos e, em 2013 essa região concentrava 53,6% do total de casos do Brasil, ocorrendo um aumento de casos na região Centro-oeste, Norte e Sudeste. É importante ressaltar que nos últimos dez anos, a LV atingiu regiões periurbanas e grandes centros urbanos, como já citado anteriormente, dado evidenciado pelos surtos ocorridos em Natal (RN), Belo Horizonte (MG), Teresina (PI), Fortaleza (CE), Rio de Janeiro (RJ), Santarém (PA), Camaçari (BA), Araçatuba (SP), Corumbá (MS), São Luís (MA) e mais recentemente, Palmas (TO), Campo Grande (MS) e Três Lagoas (MS). Outro dado importante é o aumento na taxa de letalidade que tem ocorrido nos últimos anos, sendo que no ano de 2000, essa taxa era de 3,2%, e aumentou para 7,1% em 2013 (BRASIL 2015; 2016).

(A)



(B)



**Figura 2: Leishmaniose Visceral no Brasil.** (A) Casos confirmados de leishmaniose visceral, Brasil – 1980 a 2015. (B) Casos de leishmaniose visceral por município, Brasil – 2015. Fonte: Portal da Saúde- Ministério da saúde, 2017.

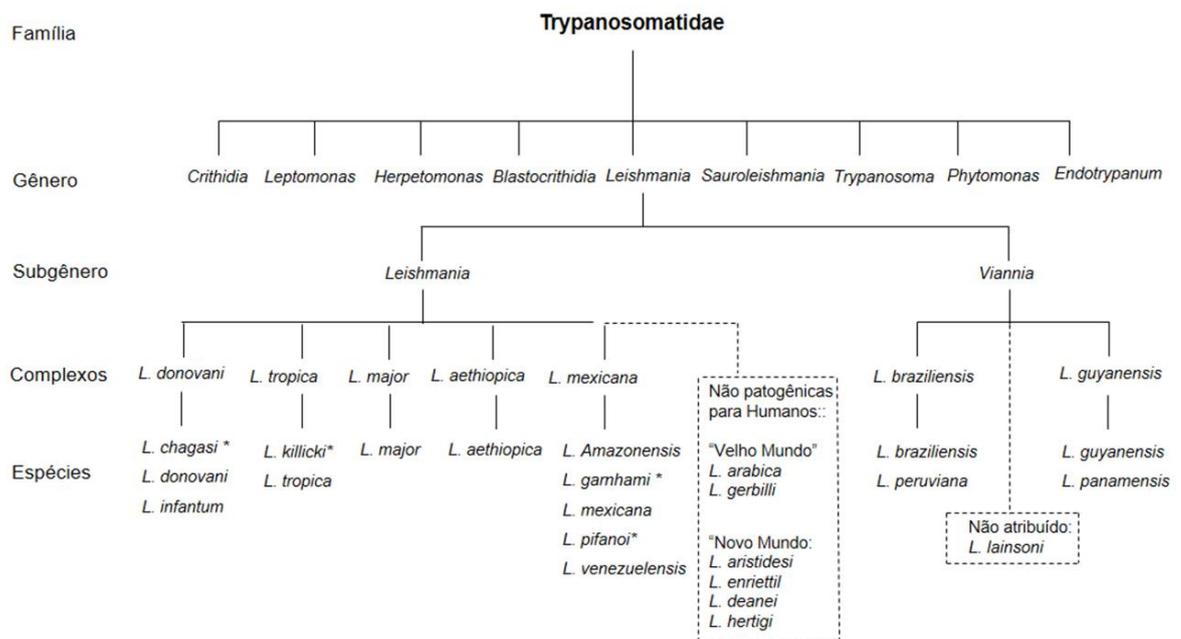
As estratégias de controle das leishmanioses, tanto pelo Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Tegumentar, como o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral, se baseiam no diagnóstico e tratamento precoce dos casos humanos, além da tentativa de redução dos flebotomíneos, eliminação dos reservatórios e educação em saúde, sendo muito importante que essas estratégias ocorram de maneira integrada, uma vez que elas isoladamente não são capazes de prevenir e controlar as doenças (SOARES et al., 2017; ZUBEM; DONALÍSIO, 2016). Entretanto, as estratégias de controle não têm sido eficientes devido a inúmeros fatores encontrados pelos Programas, tais como as dificuldades relacionadas à insuficiência de recursos humanos, materiais e financeiros, a rejeição da atividade de eutanásia de cães por parte da comunidade, a descontinuidade da realização do controle químico por falta de recursos materiais e/ou humanos, e a desvalorização das atividades de educação em saúde, que muitas vezes são realizadas por técnicos não formados na área e que estão envolvidos na eutanásia de cães, resultando em descrédito e oposição ao invés da colaboração das comunidades (ZUBEM; DONALÍSIO, 2016). Assim, o controle das leishmanioses continua um desafio para as políticas públicas em saúde.

## **1.2 O parasito *Leishmania***

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares, eucarióticos e flagelados, que pertencem à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. A principal característica dos parasitos que pertencem a esta ordem é a presença de uma mitocôndria única e do cinetoplasto. O cinetoplasto corresponde a uma região especializada, localizada no interior da mitocôndria, próxima ao corpo basal do flagelo e rica em DNA mitocondrial, material genético chamado de kDNA (TAGOE; KALEJAIYE; KONING, 2015; NOVO et al., 2016).

O gênero *Leishmania* apresenta um grande número de espécies, o que torna sua classificação um processo contínuo, podendo ser classificados em subgêneros e complexos (SCHÖNIAN; MAURICIO; CUPOLILLO, 2010). Inicialmente, para classificar esse gênero, foram utilizados critérios como vetores, distribuição geográfica e manifestações clínicas. No entanto, análises moleculares mostraram que esses critérios eram inadequados, e critérios como os padrões de polimorfismo

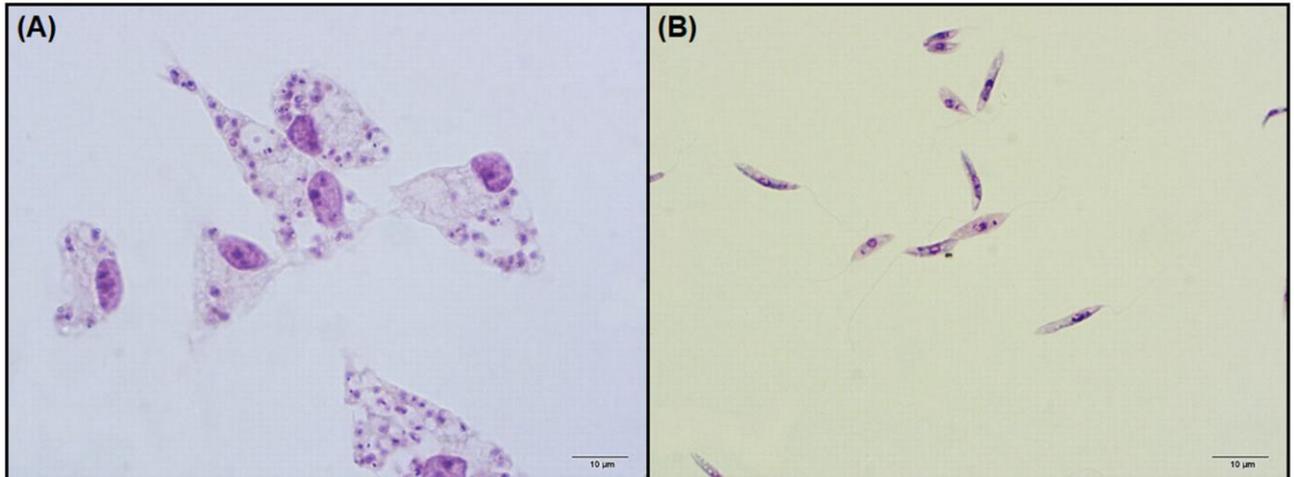
exibidos pelo kDNA foram usados (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007). Atualmente, as espécies de *Leishmania* que são patogênicas ao homem estão classificadas em dois subgêneros de acordo com sua localização no intestino do flebotomíneo. O subgênero *Leishmania* inclui os promastigotas que se desenvolvem na parte média e anterior do intestino do flebotomíneo, e o subgênero *Viannia*, os promastigotas que se desenvolvem primeiramente na porção posterior do intestino, e depois migram para as porções média e anterior do vetor (LAINSON, SHAW e SILVEIRA, 1987). Na Figura 3 encontra-se a classificação quanto aos gêneros, subgêneros, complexos e espécies de *Leishmania* sp.



**Figura 3: Taxonomia da família Trypanosomatidae.** \*Status das espécies está em discussão. \**L. chagasi* no "Novo Mundo" é a mesma espécie *L. infantum*. Fonte: WHO, 2010 (Adaptado).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam, durante seu ciclo biológico, dois estágios básicos, promastigotas e amastigotas (Figura 4) (PACE, 2014; LI et al., 2017). Os promastigotas são as formas extracelulares, que se encontram no intestino do inseto vetor. São células alongadas, com presença de flagelo (que fornece motilidade), e medem aproximadamente de 15 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento e de 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de largura (ALIANÇA, 2012; PACE, 2014). Os amastigotas são células ovaladas, com um pequeno flagelo que raramente ultrapassa a abertura

flagelar e não é visualizado pela microscopia ótica. Estas formas medem cerca de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3  $\mu\text{m}$  de largura e são intracelulares obrigatórias, parasitando principalmente células do sistema monocítico fagocitário do hospedeiro mamífero (ALIANÇA, 2012; PACE, 2014; KIEFFER et al., 2015).



**Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa das formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. (B) Promastigotas de *L. amazonensis*. Aumento de 1000x. Fonte: Do autor**

A alternância entre as formas biológicas nos hospedeiros vertebrados e no inseto vetor é um pré-requisito para a sobrevivência do parasito, porém, ainda não é conhecido a base molecular destas transformações, mas sabe-se que fatores ambientais, como pH e temperatura, desencadeiam esse processo. Além disso, a expressão diferencial de vários genes e alterações na superfície dos parasitos também estão envolvidos (WU et al., 2000). Assim, pode-se observar expressões gênicas diferentes em suas formas evolutivas. Como exemplos dessas diferenças, pode-se citar a expressão dos genes A2, que é um dos fatores candidatos a virulência do parasito, que consiste em uma família de genes abundantemente transcritos e traduzidos na fase amastigota de *Leishmania* do complexo *L. donovani*, mas que estão ausentes na fase promastigotas (OLIVEIRA et al., 2011; LI et al., 2017). A proteína de membrana Gp46 é um dos principais componentes da membrana, e o gene que codifica essa proteína é altamente abundante em formas promastigotas, enquanto que em amastigotas se encontra ausente (LI et al., 2017). Além dessas diferenças, observam-se ainda alterações que ocorrem nas propriedades da superfície celular, principalmente quando a forma promastigota se

desenvolve em amastigota, como a perda da camada de lipofosfoglicano, e as proteínas de superfície, denominadas amastinas, que estão com a expressão aumentada (FIEBIG; KELLY; GLUENZ, 2015).

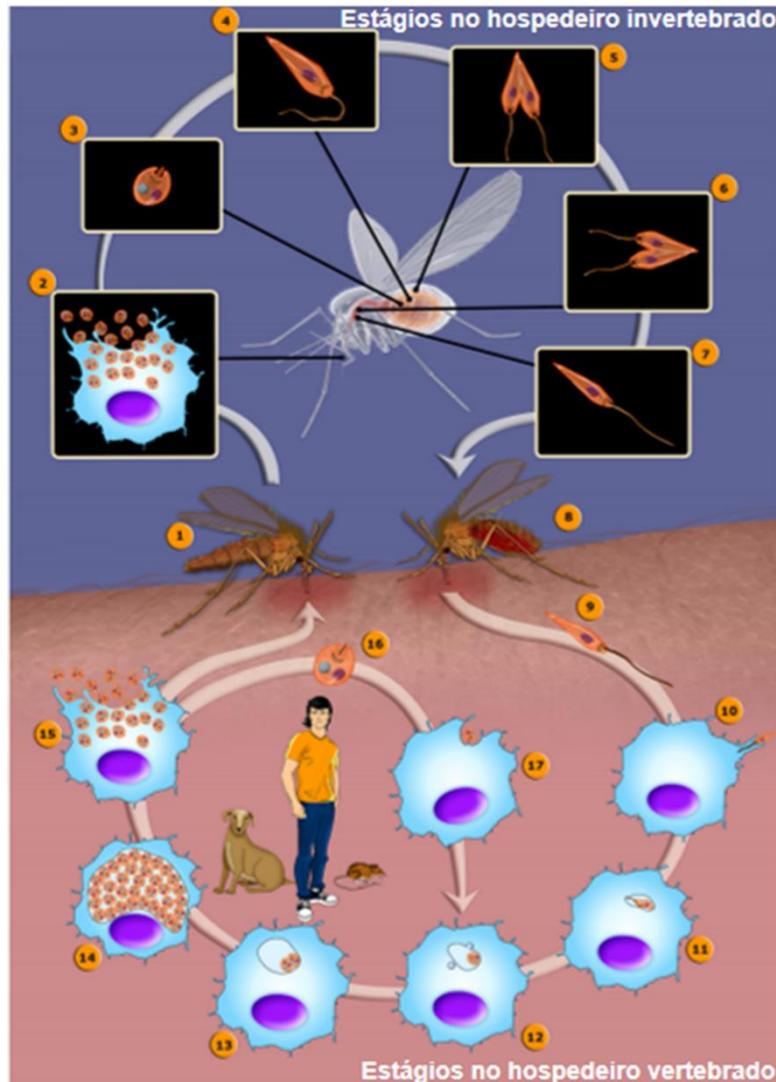
O ciclo biológico do parasito *Leishmania* ocorre de maneira semelhante para todas as espécies (Figura 5). Os parasitos são transmitidos ao homem ou outro hospedeiro mamífero através do repasto sanguíneo de fêmeas de flebotomíneos infectadas, ou seja, durante a picada o inseto vetor regurgita formas promastigotas metacíclicas, formas infecciosas para o hospedeiro vertebrado, juntamente com sua saliva, na pele do hospedeiro. A saliva do inseto vetor é extremamente importante, pois contribui não apenas para que o sangue não coagule, mas também possui efeito imunossupressor facilitando a sobrevivência do parasito (TEIXEIRA et al., 2013; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Após a picada do inseto vetor infectado e introdução dos parasitos, algumas substâncias como quimiocinas e citocinas são liberadas e atraem células do sistema imunológico, como neutrófilos, células dendríticas e macrófagos. Os neutrófilos são atraídos de uma maneira muito rápida, sendo essas células as primeiras a serem infectadas pelos promastigotas metacíclicos (DE MORAIS et al., 2015). Os parasitos conseguem sobreviver no interior de neutrófilos, no entanto, não são capazes de se diferenciarem em amastigotas ou se multiplicarem. Por isso, os neutrófilos são vistos como “Cavalo de Tróia”, uma vez que essas células sofrem apoptose e os corpos apoptóticos são fagocitados pelos macrófagos, resultando na entrada silenciosa do parasito em macrófagos, que são células extremamente importantes para o estabelecimento e sucesso da infecção (TEIXEIRA et al., 2013; DE MORAIS et al., 2015).

O parasito se adere à superfície do macrófago através da interação entre vários receptores presentes na superfície dessas células (como receptores do complemento (CR) 1, CR3 (Mac-1), o receptor de fibronectina e o receptor de manose) e moléculas expostas na superfície do parasito, como os lipofosfoglicanos e a glicoproteína gp63 (LIU; UZONNA, 2012; TEIXEIRA et al., 2013; DE MORAIS et al., 2015). O processo de internalização via fagocitose se inicia com a formação de pseudópodes, e após a ligação do parasito ao macrófago, este é internalizado em um vacúolo parasitóforo (VP). No interior deste vacúolo, ocorre a diferenciação do promastigota metacíclico em amastigota, com posterior fusão de lisossomos ao VP.

Os amastigotas conseguem sobreviver ao ambiente ácido e se dividem por divisão binária simples (TEIXEIRA et al., 2013; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). Dependendo da espécie de *Leishmania*, o VP pode ser grande e largo, contendo vários amastigotas, ou ser pequeno, com pouco espaço para os parasitos intracelulares (REAL; MORTARA; RABINOVITCH, 2010). Também, os amastigotas podem se ligar à membrana do vacúolo ou permanecerem livres no interior do mesmo onde se multiplicam intensamente. Posteriormente o macrófago se rompe, liberando os amastigotas. Estes amastigotas liberados, podem infectar novos macrófagos, repetindo esse processo, ou podem ser ingeridos por uma nova fêmea do inseto vetor durante o repasto sanguíneo (TEIXEIRA et al., 2013).

Quando um novo hospedeiro invertebrado picar um homem ou outros mamíferos infectados, serão ingeridas as formas amastigotas que foram liberadas e/ou macrófagos infectados juntamente com o sangue. No intestino do inseto vetor ocorrerá o rompimento da membrana dos macrófagos e os amastigotas se transformarão em promastigotas procíclicos, formas não infectantes do parasito. Os promastigotas procíclicos migrarão para o epitélio do trato digestório e começarão a se multiplicar. Após a multiplicação, irão migrar para a válvula estomodeal, localizada na porção anterior do intestino, reiniciando o processo de divisão celular. Em seguida, sofrerão um processo denominado metaciclogênese, no qual se diferenciarão em promastigotas metacíclicos. Devido a danificação da válvula estomodeal, as promastigotas serão regurgitadas durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, sendo transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado, e reiniciando o ciclo de vida do parasito (TEIXEIRA et al., 2013; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014; GEIGER et al., 2016).



**Figura 5: Ciclo biológico do parasito *Leishmania*.** (1) Flebotomíneo fêmea pica um mamífero infectado durante o repasto sanguíneo. Macrófagos infectados (2) com as formas amastigotas. (3) Forma amastigota. (4) Amastigota se transforma em promastigota procíclico. (5) Promastigotas procíclicas se multiplicam no intestino médio. (6) Promastigotas migram para a válvula estomodeal no intestino médio anterior e reiniciam o processo de divisão. (7) Promastigotas se transformam em promastigotas metacíclicas infectivas. (8) A fêmea do inseto vetor libera os promastigotas metacíclicos em um novo hospedeiro mamífero através de regurgitação durante o repasto sanguíneo. (9) Promastigotas metacíclicos. (10) Promastigotas metacíclicos são fagocitados pelos macrófagos. (11) Os promastigotas metacíclicos se transformam em amastigotas dentro do vacúolo endocítico. (12) Amastigotas no vacúolo parasitóforo. (13) Amastigotas se multiplicam no vacúolo. (14) Multiplicação intensa de amastigotas. (15) Rompimento da célula hospedeira e liberação dos amastigotas. (16) Forma amastigota. (17) Amastigota sendo fagocitado pelo macrófago. Fonte: TEIXEIRA et al., 2013 (Adaptado).

### 1.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas das leishmanioses podem variar desde assintomáticas a letais, e são dependentes de fatores como a espécie do parasito,

do vetor, estado imunológico, carga genética e nutricional do hospedeiro, idade, local de inoculação e carga parasitária (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A partir destas complexas interações parasito-hospedeiro, as manifestações clínicas podem se desenvolver e, no geral, podem ser classificadas como leishmaniose visceral ou cutânea. A leishmaniose visceral (LV) é também conhecida por calazar (“doença negra”), e é resultado da disseminação do parasito do local da picada na pele para órgãos viscerais, como fígado, baço e medula óssea, e da intensa proliferação (BEATTIE; KAYE, 2011; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). É uma infecção crônica e pode ser fatal dentro de 2 anos caso não seja tratada. É caracterizada por febre progressiva, perda de peso, hepatoesplenomegalia, palidez, tosse, diarreia, fraqueza, epistaxe, anemia e retardo do crescimento em crianças. Em alguns pacientes, pode-se notar a presença de uma pigmentação escura na pele, o que explica o nome de “doença negra” (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; VON STEBUT, 2015; FEIJÓ et al., 2016). Podem ser observadas anormalidades laboratoriais como anemia, trombocitopenia, neutropenia, aumento de transaminases, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A maior incidência é em crianças de 1 a 4 anos, porém, o número de adultos acometidos tem se elevado, uma vez que o número de imunocomprometidos e imunossuprimidos tem aumentado (MANSUETO et al., 2014; PACE, 2014). É endêmica em mais de 60 países, no “velho e novo mundo”, porém, os países que mais preocupam são Índia, Nepal, Bangladesh, Etiópia, Sudão e Brasil visto a incidência ser maior nestes países (MANSUETO et al., 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As principais espécies de *Leishmania* que causam a LV são *L. infantum* na bacia do mediterrâneo e *L. donovani* no subcontinente indiano, Ásia, e África oriental. Nas Américas, a *L. chagasi* (sinonímia de *L. infantum*) é a responsável pela LV (MANSUETO et al., 2014).

Pode ocorrer uma complicação da LV, que é chamada de leishmaniose dérmica pós-calazar. É caracterizada por erupção macular, maculopapular ou nodular por todas as partes do corpo, apresentando uma hipopigmentação. Normalmente essa forma se manifesta após 6 meses a 1 ou mais anos após a cura aparente da LV. Em alguns casos, essa forma ocorre simultaneamente com a LV. É considerado uma fonte ativa de infecção. Essa forma ocorre, principalmente, na África Oriental e Índia, onde a principal espécie é a *L. donovani*. É considerado um reservatório para os parasitos, apresentando um papel importante na manutenção e

contribuição para a transmissão da doença (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; VON STEBUT, 2015).

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença, sendo caracterizada por lesões que afetam a pele e mucosas (REVEIZ et al., 2013; FEIJÓ et al., 2016). A mortalidade associada a LC não é significativa, porém, pode ser crônica e desfigurante, podendo produzir lesões múltiplas e infecções secundárias. Em áreas endêmicas, muitas pessoas acreditam que essa forma da doença pode ser transmitida através do contato, resultando em forte rejeição social, causando impactos prejudiciais na qualidade de vida, saúde e mental da pessoa acometida pela LC (STOCKDALE; NEWTON, 2013; ALAM et al., 2016). Cerca de 70 a 90% dos casos de LC ocorrem nos países Afeganistão, Paquistão, Irã, Síria, Arábia Saudita, Sudão, Etiópia, Argélia, Nicarágua, Colômbia, Brasil e Peru (REVEIZ et al., 2013; STOCKDALE; NEWTON, 2013). As principais formas clínicas da LC são a LC localizada, LC disseminada, LC difusa e a leishmaniose mucocutânea (LMC) (FEIJÓ et al., 2016).

LC localizada acomete cerca de 90% dos pacientes e o período de incubação dura, em média, de 2 semanas a 3 meses. Ocorre, geralmente, o desenvolvimento inicial de uma pápula indolor no local da picada do inseto, preferencialmente em áreas expostas, acessível ao inseto vetor, como face, pescoço e membros. Essa pápula pode progredir para um nódulo, semanas ou meses após a infecção, que continua a crescer nas próximas semanas, podendo eventualmente ulcerar. As bordas da lesão se apresentam levantadas (“sinal de vulcão”) e endurecidas, e em pacientes imunocompetentes a lesão pode cicatrizar após 6 a 18 meses. Também pode ocorrer impetiginização secundária (PACE, 2014; VON STEBUT, 2015; FEIJÓ et al., 2016). É causada, principalmente, pelas espécies *L. tropica*, *L. aethiopica* e *L. major* no “Velho Mundo”, e *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* no “Novo Mundo” (FEIJÓ et al., 2016).

A LC disseminada é caracterizada pela presença de um grande número de lesões cutâneas acneiformes e papulosas em diferentes regiões do corpo (como face, membros e troncos), devido a disseminação do parasito por vias hematogênicas ou linfáticas. Pode ser acompanhada por envolvimento das mucosas, e apresenta tendência a recaídas, se tornando crônica. As lesões da LC

disseminada aparecem junto ou secundariamente a uma lesão ulceradas da LC localizada. As principais espécies que causam a LC disseminada são *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (WHO, 2010; FIGUEIREDO, 2012; HASHIGUCHI et al., 2016).

A LC difusa é também conhecida por leishmaniose anérgica ou lepromatosa. É caracterizada por pápulas ou nódulos cutâneos que não sofrem ulcerações e grande número de parasitos na lesão (FIGUEIREDO, 2012; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). As lesões se espalham por todo o corpo, exceto em áreas como couro cabeludo, axila, prega inguinal, palmas das mãos e solas dos pés (HASHIGUCHI et al., 2016). Ocorre um processo anérgico, isto é, a resposta celular é inexistente ou muito prejudicada (FIGUEIREDO, 2012). É uma forma muito rara, e no Brasil são diagnosticados cerca de 1 a 2 casos por ano (HASHIGUCHI et al., 2016). A LC difusa não cura espontaneamente, e as recaídas são frequentes após o tratamento. As principais espécies associadas a esta forma da doença são *L. aethiopica* no “Velho Mundo” e *L. mexicana* e *L. amazonensis* no “Novo Mundo” (WHO, 2010; HASHIGUCHI et al., 2016).

A LMC é resultante da disseminação hematogênica ou linfática do parasito de uma lesão cutânea, podendo ocorrer simultaneamente ou meses a anos mais tarde. É caracterizada por infecção da mucosa nasal e orofaríngea, ocorrendo eritema e edema da mucosa, acompanhado de ulceração com exsudato mucopurulento. Essa forma não cura espontaneamente, e pode causar complicações permanentes, como destruição ulcerativa do nariz, boca, faringe, laringe, palato, lábio superior e perfuração do septo nasal (MANSUETO et al., 2014; PACE, 2014). Está associada a ausência ou insuficiência do tratamento da infecção primária, e atinge com maior frequência homens e indivíduos que desenvolveram múltiplas lesões primárias (VON STEBUT, 2015). Geralmente, a LMC acontece em 1 a 10% dos casos de LC, e de 1 a 5 anos após a cura da infecção primária (MANSUETO et al., 2014). As principais espécies envolvidas com essa forma de LC são a *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (FEIJÓ et al., 2016).

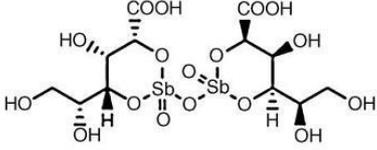
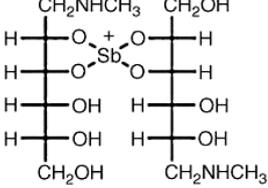
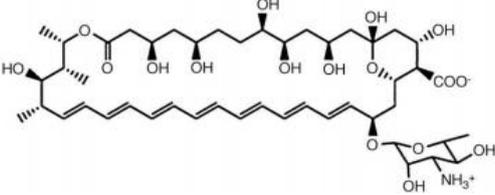
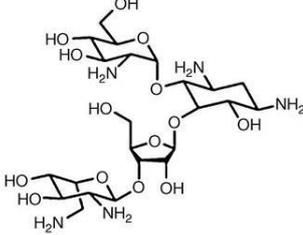
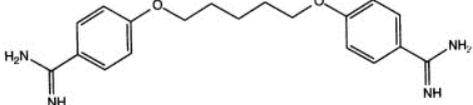
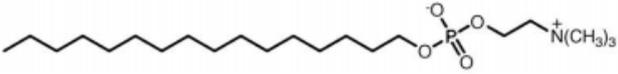
Neste trabalho, foram utilizadas as espécies de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Essas duas espécies são as principais envolvidas nas manifestações cutâneas das leishmanioses no Brasil. A *L. amazonensis* está associada, principalmente, à lesões cutâneas localizadas ou difusas, enquanto que a *L. braziliensis*, associada à lesões cutâneas localizadas e mucocutâneas (GOMES et

al., 2017). As lesões causadas por espécies do subgênero *Viannia*, como a *L. braziliensis*, são normalmente mais agressivas e, em alguns casos, podem ocorrer após o tratamento. Já as causadas por espécie do subgênero *Leishmania*, como a *L. amazonensis*, tendem a ser menos severas, e mais propensas a cura após o tratamento, ou até mesmo espontaneamente (VOLPINI et al., 2004).

#### **1.4 Tratamentos das leishmanioses**

O número de estudos que busca desenvolver uma vacina eficaz para as leishmanioses em humanos aumentou muito nesses últimos anos, principalmente após o esclarecimento dos mecanismos imunes mediados por células para controlar a infecção. No entanto, até hoje não obtiveram muito sucesso e, por isso, ainda não há uma vacina disponível para uso em humanos contra qualquer forma das leishmanioses (SRIVASTAVA et al., 2016).

Os tratamentos empregados atualmente para as leishmanioses se baseiam no uso de quimioterápicos, que apresentam características em comum como alta toxicidade, administração de longa duração, muitos efeitos adversos, são dispendiosos, além de mostrarem baixa eficácia em algumas áreas endêmicas devido à resistência observada de espécies do parasito (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014; SRIVASTAVA et al., 2016). Os principais quimioterápicos utilizados no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes (Sb+5), que constituem o tratamento de primeira linha, e a anfotericina B, miltefosina, paromomicina e pentamidina que são os fármacos de segunda linha (DE MORAIS et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2016). Na Figura 6 constam as estruturas químicas e nomes comerciais dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

Fármaco	Estrutura
Estibogluconato de sódio (Pentostam®)	
Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)	
Anfotericina B (Fungizon®)	
Paramomicina (Humatin®)	
Pentamidina (Lomidina®)	
Miltefosina	

**Figura 6: Estrutura química e nome comercial das principais drogas usadas para o tratamento das leishmanioses.** Fonte: SANTOS et al., 2008; NAVARRO et al., 2010 (Adaptado).

Os antimoniais são utilizados desde 1940 para o tratamento da LV e LC, sendo os primeiros fármacos a serem usados para tratar leishmanioses (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; SCARIOT et al., 2017). As duas formulações disponíveis são o antimoniato

de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), sendo que este último não é comercializado no Brasil. As principais vias de administração para ambos são injetáveis, seja intravenosa (IVE) ou intramuscular (IM), entretanto, a via intralesional também é permitida (BRASIL, 2017). Os compostos atingem seus valores máximos no intervalo de 2h e 50% do fármaco é excretado pelos rins durante as primeiras 24 horas (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; SOLEIMANIFARD, 2017). Até 1970, o tratamento indicado era a administração de uma dose de Sb+5 de 10 mg/Kg/dia (no máximo 600 mg) por 6 a 10 dias. Porém, houve falha na cura em 30% dos casos, e a OMS, em 1984, propôs um novo esquema de tratamento, onde são administrados uma dose de 20 mg/Kg/dia (no máximo 850 mg) por 20 dias (SOLEIMANIFARD, 2017).

Os pacientes em uso desses medicamentos necessitam ser hospitalizados e monitorados, uma vez que apresentam alta cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade, podendo ser necessário suspender o tratamento. Devido a essa alta toxicidade, podem surgir efeitos adversos como vômito, náusea, anorexia, mialgia, dor abdominal, cefaléia, artralgia e letargia (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; MENEZES et al., 2015).

Os antimoniais parecem apresentar um amplo mecanismo de ação e que ainda não foi completamente elucidado. Há indícios que o Sb+5, considerado uma pró-fármaco, penetre nas células hospedeiras, atravesse a membrana fagolisossômica e sofra conversão metabólica intramacrofágica para antimônio trivalente (Sb+3), sendo este o elemento tóxico a *Leishmania* sp na forma intracelular. Assim, o Sb+3 atua nas formas amastigotas comprometendo o potencial redox tiol do parasito, induzindo o efluxo de tióis intracelulares e, conseqüentemente, inibindo a tripanotona redutase, acarretando em estresse oxidativo. O Sb+3 pode também interferir no processo de  $\beta$ -oxidação de ácido graxos e glicólise do parasito, provocando uma depleção dos níveis de ATP intracelular. Nas formas amastigotas existe uma metaloprotease dependente de zinco, essencial para o desenvolvimento do parasito, e estudos sugerem que esta enzima poderia ser inativada caso o Sb+3 substituísse o zinco. Já a forma Sb+5 pode também ocasionar a morte do parasito através de mecanismos indiretos, como por exemplo o aumento dos níveis de citocinas. Os antimoniais também podem induzir danos ao DNA e inibir a enzima DNA-topoisomerase I, impedindo assim a replicação do DNA do parasito (RATH et al., 2003; FREITAS-JUNIOR et al., 2012).

Mais de seis décadas de uso de antimoniais têm permitido o parasito desenvolver resistência a esses medicamentos por diversos mecanismos, como por exemplo, pela alta expressão do transportador ABC, um membro da subfamília ABCI (LABCI4), que é capaz de promover o efluxo de  $Sb^{+3}$  e de tióis, levando então a redução intracelular de antimoniais. Outras alterações que são frequentes em parasitos de *Leishmania* resistentes é a alta expressão de enzimas limitantes da biossíntese do tiol, como a ornitina descarboxilase e  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase, que gera uma alta taxa de tióis intracelulares, diminuição da concentração de  $Sb^{+3}$  livre intracelular e proteção extra contra o estresse oxidativo provocado pelo medicamento. Além disso, o gene que codifica o transportador de glicose encontra-se com baixa expressão em *L. amazonensis* resistentes, sugerindo uma diminuição na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) como resultado da redução da absorção de glicose, contribuindo para a sobrevivência do parasito (FRÉZARD; MONTE-NETO; REIS, 2014).

Essa resistência crescente torna, juntamente com o fato da eficácia do tratamento contra LV e LC ser muito variado, dependendo da espécie do parasito e da região geográfica, obstáculos para o sucesso dessa terapia. Um exemplo disso foi o ocorrido no subcontinente indiano, onde 65% dos pacientes com LV apresentaram resistência aos antimoniais, ocasionando a proibição desse fármaco em Bihar, na Índia (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; CHÁVEZ-FUMAGALLI et al., 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

A anfotericina B é um antifúngico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus* (RATH et al., 2003), que tem sido altamente ativo no tratamento da LV, e atua por dois mecanismos diferentes, sendo eles a auto-oxidação da anfotericina B, que causa a produção de radicais livres, e o outro se dá através da sua ligação ao ergosterol presente na membrana do parasito, criando poros que causam um desequilíbrio no balanço iônico e conseqüentemente a morte do parasito (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

É um fármaco administrado via IVE, e a dosagem recomendada é de 0,5 a 1 mg/kg/dia durante 15 a 20 dias. Apresenta alta toxicidade, podendo causar calafrios, febre, hipocalcemia, anemia e rigor, associada a miocardite e nefrotoxicidade, e por isso é necessário monitoramento laboratorial da função renal e níveis de eletrólitos (MENEZES et al., 2015; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015).

Para melhorar a biodisponibilidade e as propriedades farmacocinéticas, a fim de reduzir os efeitos adversos, foram desenvolvidas formulações lipídicas da anfotericina B. A formulação lipossomal (AmBisome) é um tratamento aprovado para LV, e foi utilizada na Índia para controlar o número crescente de casos de LV. Apresenta toxicidade reduzida, tempo de meia vida melhor e ótima eficácia, com uma taxa de cura de aproximadamente 90%. No entanto, as principais limitações deste tratamento são o seu alto custo, via de administração e falta de estabilidade a alta temperatura (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; MENEZES et al., 2015).

A pentamidina, uma diamina aromática, é outro tratamento alternativo existente. É também utilizada para tratamentos de doenças causadas por outros protozoários e fungos, como *Pneumocystis carinii* e espécies de tripanossomas africanos. Nas leishmanioses, é utilizada como primeira linha para *L. guyanensis* na Guiana Francesa, Suriname e Brasil. Apresenta menos eficácia contra *L. braziliensis*, sendo a taxa de cura relatada variando entre 35 a 90%. O fármaco é administrado via IM ou IVE, com dosagem sugerida de 2 a 4 mg/Kg/dia em um total de 2 a 7 doses (MANSUETO et al., 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Ainda não está bem esclarecido qual seria o mecanismo de ação da pentamidina, porém, evidências mostram o envolvimento de interferências das funções mitocondriais do parasito (DE MORAIS et al., 2015). Alguns efeitos adversos são relatados, como hiperglicemia persistente, elevação da creatina quinase, cardiotoxicidade, hipotensão, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, e por isso é recomendado a avaliação laboratorial antes do início da terapêutica e antes de cada administração (MANSUETO et al., 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A paramomicina é um antimicrobiano da classe de aminoglicosídeo natural. Sua formulação parentérica é utilizada para o tratamento de LV, enquanto que sua formulação tópica e parentérica, usada para tratamento de LC (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Quando usado por via tópica, os efeitos adversos são limitados a irritação local e prurido, porém, a formulação parenteral pode causar nefrotoxicidade e ototoxicidade, e em alguns casos hepatotoxicidade (MENEZES et al., 2015; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Esse fármaco interfere na atividade ribossomal, inibindo a síntese proteica e alterando o potencial de membrana mitocondrial, privando o parasito de energia. Além disso, também altera a fluidez da membrana e o metabolismo lipídico (FREITAS-JUNIOR et al., 2012; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

A miltefosina é um anticancerígeno, análogo de fosfocolina, e o único tratamento disponível, por via oral, para leishmanioses. Foi aprovada pela primeira vez na Índia, e foi utilizada, nesta última década, em 14 países para o tratamento de LV e LC (VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). É um fármaco que apresenta um tempo de meia-vida muito prolongado (150 horas), que traz como consequências o aumento de teratogenicidade e resistência do parasito (RODRIGUES et al., 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016). Apresenta efeito diferente entre as espécies de *Leishmania*, e sua dosagem recomendada é de 2,5 mg/Kg/dia durante 4 semanas. Podem ocorrer efeitos adversos como náuseas, vômitos, cefaléia, diarreia, e elevação da creatina quinase e das transaminases. É contraindicado em mulheres grávidas ou em período de amamentação (MANSUETO et al., 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). A miltefosina atua por diferentes mecanismos de ação, como inibidor da enzima citocromo C oxidase e imunomodulador em macrófagos (VAKIL; FUJINAMI; SHAH, 2015; TASLIMI; ZAHEDIFARD; RAFATI, 2016).

### **1.5 Morte celular em *Leishmania* sp**

O equilíbrio entre a sobrevivência celular e a morte celular é o que determina o desenvolvimento e a homeostase dos organismos multicelulares. A morte celular é compreendida como sendo um processo fundamental, e regulado (ou programada - por várias vias de sinalização interligadas) ou não regulado (BERGHE et al., 2014). Os tipos de morte celular são bem descritos em organismos multicelulares, e durante muito tempo foram considerados exclusivos desses organismos. No entanto, muitos estudos já demonstram que esses processos de morte celular podem ocorrer em outros organismos, como em tripanossomatídeos (LEE et al., 2002; ZANGGER; MOTTRAM; FASEL, 2002; LÜDER et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012). Os principais tipos de morte celular são apoptose, necrose e autofagia (LÜDER et al., 2010; ADADE et al., 2013).

A apoptose é um processo de “morte celular programada”, e foi descrita pela primeira vez, em 1972, por Kerr et.al. (KERR; WYLLIE; CURRIET, 1972; RODRIGUES; SEABRA; SOUZA, 2006). É um processo extremamente importante,

uma vez que está associado a eliminação eficiente de células, além de evitar o início de uma via inflamatória (BRUCHHAUS et al., 2007).

Alguns critérios morfológicos e bioquímicos que permitem a identificação da ocorrência de apoptose em metazoários têm sido amplamente relatadas em tripanossomatídeos, incluindo *Leishmania* sp, como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações no potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática, fragmentação do DNA, membrana plasmática íntegra, diminuição do volume (retração celular) e arredondamento da célula, além de liberação de citocromo c e aumento nos níveis de  $Ca^{+2}$  citosólico (RODRIGUES; SEABRA; SOUZA, 2006; LÜDER et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012).

Existem duas vias clássicas que conduzem a apoptose em metazoários, a via extrínseca e intrínseca. A via extrínseca envolve a ligação de receptores, presentes na superfície da membrana celular, aos seus respectivos ligantes. Esses receptores também são chamados de receptores de morte, e pertencem à família do receptor do Fator de Necrose Tumoral (TNF). Já a via intrínseca, ou também chamada de mitocondrial, ocorre pela permeabilização da membrana mitocondrial que é regulada por proteínas da família Bcl-2. É desencadeada por estímulos que afetam a mitocôndria, como privação de citocinas, danos ao DNA e estresse citotóxico. As duas vias culminam na ativação de proteases da família caspases, que provocam a degradação da célula observada na apoptose (BRUCHHAUS et al., 2007; SMIRLIS et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012).

Em tripanossomatídeos, a apoptose pode ser induzida por estímulos variados, como choque térmico, ROS, drogas antiparasitárias, prostaglandinas, peptídeos antimicrobianos, anticorpos, mutações em genes regulados pela célula (SMIRLIS et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012). A ausência nesses protozoários de homólogos aos reguladores-chaves de mamíferos ou moléculas efetoras de apoptose (como receptores de morte, Bcl-2 e caspases) indica que a maquinaria molecular envolvida no processo de apoptose se difere da descrita em metazoários. Apesar de não existir, em tripanossomatídeos, os genes que codificam as caspases, há relatos que existem outras proteases cisteína-dependente envolvidas na execução da apoptose, como as metacaspases. No entanto, as funções dessas

proteases ainda permanecem controversas e aguardando confirmação (ZANGGER; MOTTRAM; FASEL, 2002; SMIRLIS et al., 2010).

Ressalta-se também que tem sido descrito na literatura que o parasito *Leishmania* sp, assim como outros protozoários, como *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi*, além de vírus como citomegalovírus, são capazes de evadir do sistema imunológico do hospedeiro por meio de um mecanismo conhecido por mimetismo apoptótico. Neste mecanismo, os organismos patogênicos translocam a fosfatidilserina para a membrana externa, “imitando” um fenótipo de células apoptóticas, evitando sua morte. Então, em *Leishmania* por exemplo, esse mecanismo inibe a capacidade leishmanicida dos macrófagos, inibindo a produção de óxido nítrico, aumentando a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF $\beta$ , e diminuindo a da citocina proinflamatória TNF- $\alpha$ , garantindo então a sobrevivência do parasito. Alguns autores relatam que esse mecanismo ocorre apenas em formas amastigotas (WANDERLEY et al., 2005; VAN ZANDBERGEN et al., 2006; WANDERLEY; BARCINSKI, 2010).

Assim, em meio a controvérsias, o termo considerado mais adequado para se referir à apoptose em protozoários tem sido *apoptose-like*, devido à falta de alguns eventos moleculares cruciais que estão presentes em metazoários (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Desta forma, este trabalho também utilizará essa terminologia.

A autofagia também representa um processo de morte celular programada. Foi descrita inicialmente como um mecanismo de sobrevivência em resposta ao estresse, onde ocorre a autodigestão limitada de materiais intracelulares, incluindo organelas, e com isso fornece à célula energia para o turnover de organelas, ou para remodelar uma célula durante a diferenciação, contribuindo para a sobrevivência. Porém, se as condições do meio em que as células se encontram não melhoram, a autodigestão continua, acarretando em morte celular autofágica (BRUCHHAUS et al., 2007; LÜDER et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012). Desta forma, a morte celular autofágica é caracterizada pelo sequestro do citoplasma e organelas em vesículas duplas ou multimembranares (autofagossomos), e ocorre fusão da sua membrana externa com a membrana lisossomal, formando o vacúolo autofágico. A membrana interna do autofagolisossomo é rompida, pela ação de hidrolases lisossômicas, antes que ocorra a degradação do seu conteúdo. Os produtos da

degradação são então reciclados para o citosol através da ação de permeases dentro da membrana lisossômica (ELMORE, 2007; DUSZENKO et al., 2011). Esses vacúolos autofágicos podem ser identificados por meio da marcação com MDC. O processo de autofagia é lento e pode ter duração de vários dias. E além disso, depende de presença de ATP e síntese contínua de proteínas (BRUCHHAUS et al., 2007; ELMORE, 2007).

A necrose é um processo não regulado e passivo, uma vez que a morte ocorre independentemente de energia. Inicialmente, foi considerada uma morte não programada, no entanto, hoje em dia já se sabe que a necrose pode também ser um processo programado. Para se referenciar à necrose programada, tem sido usado termos como autólise, oncose, necrapoptose e necroptose (RODRIGUES; SEABRA; SOUZA, 2006; ZONG; THOMPSON, 2006; LÜDER et al., 2010; VANDEN BERGHE et al., 2014). É caracterizada por alterações morfológicas como inchaço celular e de organelas, perda da integridade da membrana celular e condensação moderada da cromatina (ELMORE, 2007; LÜDER et al., 2010). Essa ruptura da membrana celular promove uma reação inflamatória local, uma vez que ocorre a liberação do conteúdo citoplasmático para os tecidos circundantes e sinais quimiotáticos são enviados, e conseqüentemente acontece o recrutamento de células inflamatórias (ELMORE, 2007; RIBEIRO, 2011).

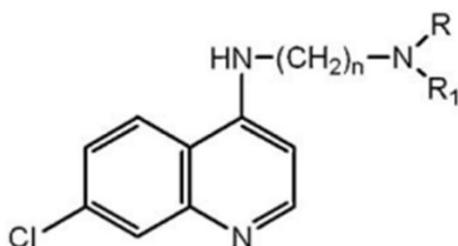
## 1.6 Quinolinas

A quinolina e seus derivados sempre atraíram a atenção de pesquisadores devido a sua diversidade química e biológica. O anel de quinolina é encontrado em vários produtos naturais, especialmente em alcalóides, e além disso, é frequentemente empregado na síntese de compostos sintéticos com diversas propriedades farmacológicas. Já foram relatadas propriedades como anticancerígenos, antimicrobiana, antituberculose, anticonvulsivante, anti-inflamatória, cardiovascular, antimalárica, antiprotozoários, antifúngica e antiviral (KUMAR; BAWA; GUPTA, 2009; COIMBRA et al., 2011; ANTINARELLI et al., 2015).

Muitos estudos demonstraram que, além dessas propriedades já citadas, as quinolinas também apresentam atividade antileishmanial. O exemplo mais importante é sitamaquina (WR6026, GlaxoSmithKline), um 8-aminoquinolina,

análogo da primaquina. A forma de administração é oral, e já concluíram os ensaios de Fase II na Índia e Quênia. Foi observado, na Índia, que dosagens de 1,75 e 2 mg/Kg/dia por 28 dias levou a uma taxa de cura de 89 e 100%, respectivamente. Já no Quênia, tratamentos com dosagens de 2,0; 2,5 e 3,0 mg/Kg/dia, obtiveram, respectivamente, uma taxa de cura de 80, 82 e 91%. O fármaco apresentou nefrotoxicidade em doses superiores a 2 mg/Kg (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013). Estudos demonstram que o mecanismo de ação da sitamaquina envolve a inibição do complexo II da cadeia respiratória, que conseqüentemente causa um estresse oxidativo e induz apoptose na *Leishmania* (CARVALHO et al., 2011). Um outro exemplo é a Tafenoquina, derivado da primaquina, que possui atividade antimalárica. Alguns estudos já demonstraram que além da propriedade antimalárica, este também apresenta atividade antileishmanial em modelo experimental com ratos, podendo representar um tratamento alternativo para leishmanioses (CARVALHO et al., 2010).

Trabalhos desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa tem verificado que derivados de quinolina, em especial as 4-amino-7-cloroquinolina (Figura 7) apresentam atividade antileishmanial *in vitro* promissora (CARMO et al., 2011; COIMBRA et al., 2013; ANTINARELLI et al., 2015, 2016). Estes resultados, associados a indiscutível necessidade de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses incentivaram o estudo desta classe de moléculas em *Leishmania*. Também, uma vez que estudos sobre o mecanismo de ação poderão fornecer informações importantes para o desenvolvimento de novos compostos com atividade antileishmanial, tentou-se analisar os possíveis alvos envolvidos na morte do parasito.



**Figura 7: Estrutura do derivado de 4-amino-7-cloroquinolina que originou os compostos utilizados neste trabalho.**  $n=2$ .  $R=R_1 = -C \equiv CH$ . Fonte: CARMO et al., 2011.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar, *in vitro*, a atividade antileishmanial de compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em diferentes espécies de *Leishmania*, bem como determinar o mecanismo de morte induzido pelo composto mais promissor.

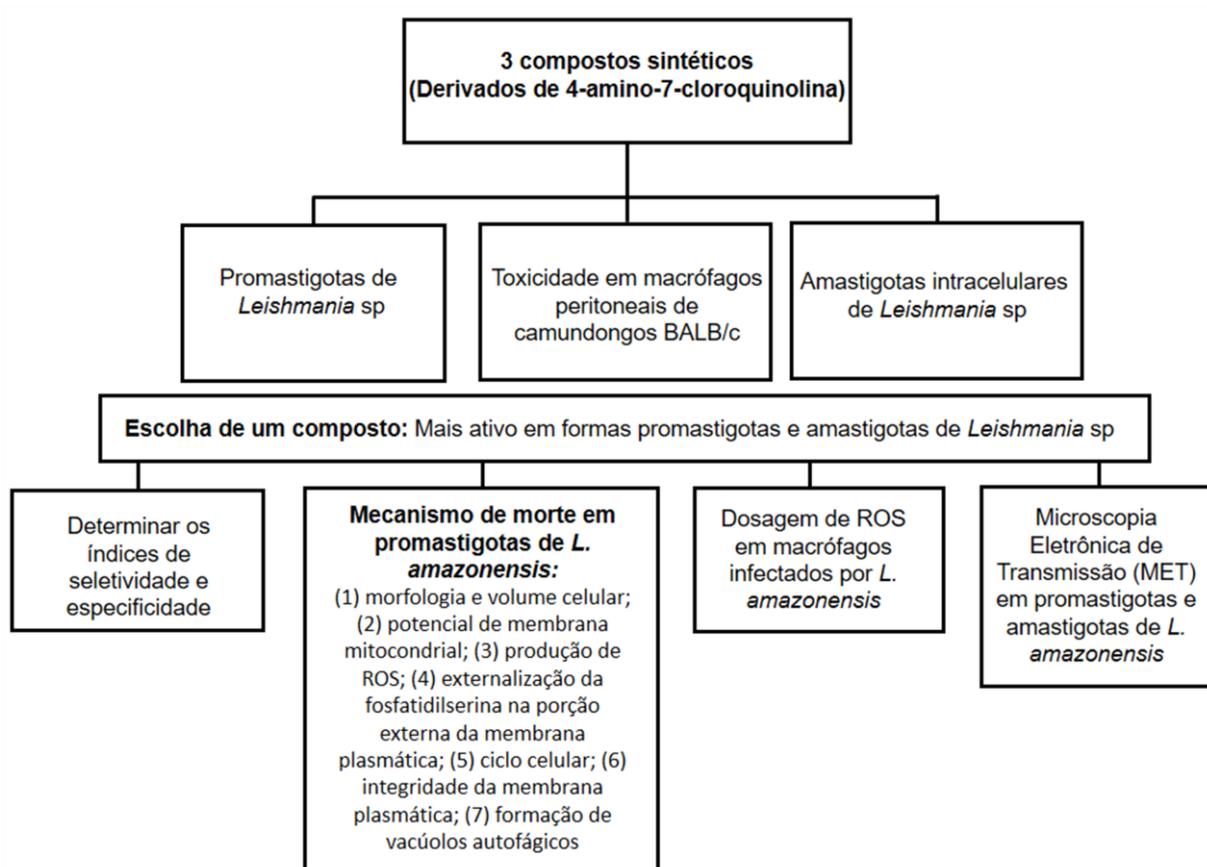
### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito antileishmanial dos compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos da linhagem BALB/c;
- Avaliar o efeito antileishmanial dos compostos em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- Determinar o índice de seletividade e especificidade do composto mais ativo;
- Determinar o mecanismo de morte induzido pelo composto mais ativo, em promastigotas de *L. amazonensis*, através dos seguintes parâmetros: (1) morfologia e volume celular; (2) potencial de membrana mitocondrial; (3) produção de ROS; (4) externalização da fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática; (5) ciclo celular; (6) integridade da membrana plasmática; (7) formação de vacúolos autofágicos;

- Avaliar o efeito do composto mais ativo na produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados por *L. amazonensis*;
- Analisar possíveis alterações ultraestruturais, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto mais ativo.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental encontra-se na Figura 8.



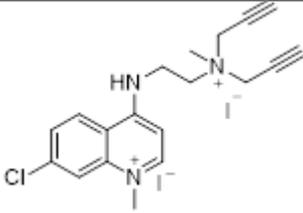
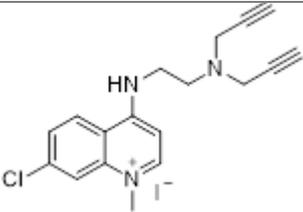
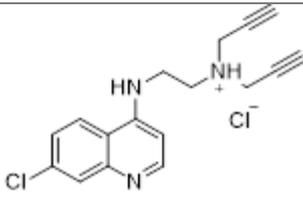
**Figura 8: Delineamento experimental do trabalho.** Três compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina foram testados em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp e em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c. A partir dos resultados obtidos, o composto mais ativo foi selecionado e então determinou-se os índices de seletividade e especificidade, o mecanismo de morte em promastigotas de *L. amazonensis* por meio da análise de parâmetros como morfologia e volume celular, potencial de membrana mitocondrial, produção de ROS, externalização da fosfatidilserina, ciclo celular, integridade da membrana plasmática e formação de vacúolos autofágicos, além da dosagem de ROS em macrófagos infectados e microscopia eletrônica de transmissão em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

#### 3.1 Compostos utilizados

Os compostos sintéticos utilizados neste trabalho são derivados de 4-amino-7-cloroquinolina, ou mais genericamente, derivados de quinolina (DQ). Todas as moléculas foram sintetizadas pelo Núcleo de Pesquisas Químicas (NUPEQ) pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química do Instituto de

Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Na Tabela 1 constam o nome e a estrutura química dos compostos testados.

**Tabela 1: Nome e estrutura química dos compostos derivados de quinolina (DQ).**

Composto	Estrutura química	Nome
DQ1		Iodeto de 7-cloro-1-metil-4-((2-metildi(prop-2-in-1-il)amônio)etil)amino)quinolin-1-íon
DQ2		Iodeto de N-(2-((7-cloroquinolin-4-il)amino)etil)-N-metil-N-(prop-2-in-1-il)prop-2-in-1-amina
DQ3		Cloridrato de N1-(7-cloroquinolin-4-il)-N2,N2-di(prop-2-in-1-il)etano-1,2-diamina

### 3.2 Cultivo dos parasitos

Neste trabalho foram utilizados duas cepas distintas da espécie *L. amazonensis* e uma de *L. braziliensis*. As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) foram cultivadas em meio Warren (infusão de coração e cérebro – meio BHI, suplementado com hemina (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) e ácido fólico (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA)). Os promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/Br/75/M2903) foram mantidos em meio BHI (Himedia, Mumbai, Maharashtra, Índia) suplementado com L-glutamina (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Também foi utilizada a cepa de *L. amazonensis* (WHOM/Br/75/Josefa) transfectada com o gene da proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent protein-GFP*), gentilmente cedida pelo Dra. Bartira Rossi-Bergman, da Universidade Federal

do Rio de Janeiro. Esses promastigotas foram cultivados em meio Warren suplementado, conforme descrito acima para *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8).

Todos os meios utilizados foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e 0,5% de solução de penicilina 10.000 U.I./mL mais estreptomicina 10 mg/mL (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA). Os parasitos foram mantidos em estufa a 25°C, e repiques foram realizados em intervalos de três a quatro dias.

### **3.3 Seleção das formas promastigotas fluorescentes de *L. amazonensis* transfectada com GFP**

A fim de manter a estabilidade da proteína fluorescente, a cada dez passagens em cultura, as formas promastigotas de *L. amazonensis*-GFP, em fase logarítmica de crescimento, foram selecionadas com o antibiótico geneticina (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), uma vez que apenas as leishmanias transfectadas resistem a este antibiótico, permanecendo vivas. A concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^7$  promastigotas/mL e incubados com 1 mg/mL do antibiótico por 72 horas a 25°C. Posteriormente, os parasitos foram transferidos para garrafas de cultura de 25 cm<sup>3</sup> e visualizados em microscópio invertido Eclipse TS 100 (Nikon, Minato, Tóquio, Japão), sendo observadas a fluorescência e motilidade dos parasitos.

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

Para a avaliação da atividade anti-promastigota dos compostos utilizou-se o método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA). O ensaio do MTT é baseado na capacidade das enzimas desidrogenases, presentes em mitocôndria de células

vivas, em reduzir o sal tetrazólio, solúvel em água, em formazan, produto insolúvel em água (MOSMANN, 1983). Desta forma, a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

As formas promastigotas, em fase logarítmica de crescimento, foram contadas em câmara de Neubauer, e em seguida adicionadas em placas de cultura de 96 poços na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL para *L. amazonensis* e  $3 \times 10^6$  células/mL para *L. braziliensis*. Após sucessivas diluições em água deionizada, os compostos foram adicionados nos primeiros poços, e em seguida foi realizado diluições seriadas (obtendo as concentrações finais de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125  $\mu$ M), em duplicata. Em alguns poços não houve adição de compostos (controle negativo). As placas foram incubadas em estufa a 25°C por 72 horas. Após esse tempo, foram adicionados 10  $\mu$ L de MTT a 5 mg/mL em cada poço, e as placas foram novamente incubadas por mais 4 horas, sob as mesmas condições. A reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de isopropanol (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)/ácido clorídrico (Isopropanol/HCl a 0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Multiskan EX–Thermo Electron Corporation, Waltham, Massachusetts, EUA e SpectraMax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, EUA) a 570 nm. A partir da densidade ótica foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento dos promastigotas em relação ao controle negativo. Posteriormente, foi determinada a concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) de cada composto, que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento parasitário. Os valores de  $CI_{50}$  foram estimados a partir de valores médios de três experimentos independentes, calculados com o auxílio do programa *GraFit 5* (versão 5.0, Erithacus Software Ltda., Horley, U.K), por meio de uma regressão não linear. A anfotericina B (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) e miltefosina (Cayman Chemical Company, Michigan, USA) foram utilizadas como fármacos de referência.

### **3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em macrófagos**

Para a avaliação da toxicidade dos compostos em células de mamíferos, utilizou-se macrófagos peritoneais de camundongos fêmeas BALB/c. Foi inoculado, via intraperitoneal, 2 mL de tioglicolato (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) a

3% em cada camundongo. Após 72 horas da inoculação, foi efetuada a eutanásia dos camundongos para a realização do lavado peritoneal. Depois de expor a cavidade peritoneal, foi injetado 6 mL de solução de Hank's (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) estéril no peritônio de cada animal. Ainda com a solução no peritônio, foi feita uma massagem e em seguida essa solução foi aspirada. Esse processo foi repetido com o objetivo de recuperar um maior número de células. A solução, contendo os macrófagos peritoneais, foi centrifugada a 1000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific D37520) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), onde foi retirada uma alíquota para contagem das células em câmara de Neubauer. Em seguida, as células foram suspensas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina, na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL para serem plaqueadas em placas de 96 poços. Essas placas permaneceram em uma estufa com 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) a  $33^\circ\text{C}$  por 16 horas, para a adesão dos macrófagos. Posteriormente, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada das células que não aderiram, e foi adicionado meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina, e na sequência, os compostos foram adicionados nos primeiros poços e em seguida realizadas diluições seriadas (obtendo as concentrações finais de 150; 75; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68  $\mu\text{M}$ ). Para determinar o  $\text{CC}_{50}$  do composto mais ativo, foram testados também concentrações de 1000; 500; 250; e 125  $\mu\text{M}$ . Em alguns poços não houve adição de compostos (controle negativo), permanecendo apenas 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 suplementado. As placas foram incubadas novamente em estufa com 5% de  $\text{CO}_2$  a  $33^\circ\text{C}$  por 72 horas. Após esse tempo, a viabilidade dos macrófagos peritoneais foi determinada pelo método do MTT, sendo adicionado 10  $\mu\text{L}$  de MTT a 5 mg/mL em cada poço e as placas incubadas na estufa sob as mesmas condições anterior. Após 2 horas de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu\text{L}$  de isopropanol/HCl (Isopropanol/HCl a 0,7%), e a leitura feita no espectrofotômetro a 570 nm. A partir da densidade ótica foi calculada a porcentagem de macrófagos mortos em relação ao controle negativo e com o auxílio do programa *GraFit 5*, por meio de uma regressão não linear, foi determinada a concentração citotóxica que mata 50% das células ( $\text{CC}_{50}$ ). Os valores de  $\text{CC}_{50}$  foram estimados a partir de valores médios de três experimentos

independentes, realizados em duplicata. A anfotericina B e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

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

Para a avaliação da atividade anti-amastigota dos compostos foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos fêmeas BALB/c, obtidos conforme descrito na seção anterior. As células obtidas através do lavado peritoneal, foram centrifugadas e contadas na câmara de Neubauer. Para *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foram adicionadas, sobre lamínulas de vidro (13 mm de diâmetro) que se encontravam em cada poço da placa de 24 poços, 300 µL de uma suspensão contendo  $2 \times 10^6$  macrófagos/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. Já para *L. amazonensis* GFP, foram adicionadas a mesma quantidade da suspensão com macrófagos, no entanto, diretamente nos poços, sem lamínulas, e o meio RPMI-1640 utilizado não continha fenol. As placas foram incubadas em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33°C por 16 horas para a adesão dos macrófagos. Após esse tempo, os poços foram lavados com PBS estéril para a retirada dos macrófagos que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de uma suspensão de  $20 \times 10^6$  (para *L. amazonensis*), ou  $40 \times 10^6$  promastigotas/mL (para *L. amazonensis*-GFP) em fase estacionária de crescimento, em meio RPMI-1640 (com ou sem fenol) suplementado. As placas foram incubadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 4 horas de interação entre macrófagos e parasitos, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada dos promastigotas que não foram fagocitados. Em cada poço foi adicionado 450 µL de meio RPMI-1640 (com ou sem fenol) suplementado e 50 µL dos compostos em diferentes concentrações (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µM), em duplicata, e as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33°C por 72 horas. Em alguns poços não houve adição de compostos, contendo apenas macrófagos infectados (controle negativo).

Após o tempo de tratamento, para *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), as lamínulas foram retiradas e fixadas com etanol absoluto (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), coradas com Giemsa (Doles, Goiânia, GO, Brasil) e desidratadas em bateria

de acetona (Neon, São Paulo, SP, Brasil)/xilol (Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em diferentes proporções (primeiro acetona pura, e na sequência 90% acetona/10% xilol, 50% acetona/50% xilol, 10% acetona/90% xilol, e xilol puro). Para a análise por microscopia de luz (Olympus BX41), as lamínulas foram montadas com bálsamo do Canadá sobre lâminas de vidro previamente identificadas. A atividade antiparasitária dos compostos foi avaliada a partir da contagem de amastigotas intracelulares dentro dos macrófagos parasitados em relação ao controle negativo. Foram contados um total de 200 macrófagos, infectados e não infectados, e o número de amastigotas que se encontravam nos macrófago parasitados. Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição da carga parasitária global de amastigotas em relação ao controle. Além disso, foi construído um gráfico expressando o índice de infecção do controle negativo e tratados com o composto DQ3. O índice de infecção foi calculado a partir da equação (% macrófagos infectadas x número médio de amastigotas por macrófago infectado) (PALADI et al., 2012).

Para *L. amazonensis*-GFP, o meio da placa foi descartado e adicionado 100 µL de água deionizada estéril em cada poço a fim de romper os macrófagos e liberar os amastigotas dessa cepa que são fluorescentes. Foi realizado raspagem em cada poço e a suspensão contendo os amastigotas foi transferida para uma placa negra de 96 poços, de fundo transparente. Esse processo foi repetido, totalizando 200 µL de suspensão na placa, os quais foram quantificados através de um espectrofluorímetro (FLx800, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA) nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528.

Os valores de  $CI_{50}$  foram estimados a partir de valores médios de três experimentos independentes, calculados com o auxílio do programa *GraFit 5*, por meio de uma regressão não linear. A anfotericina B e miltefosina foram utilizadas como fármacos de referência.

### **3.7 Determinação do índice de seletividade (IS) e do índice de especificidade (IE) do composto DQ3**

O IS é analisado a fim de determinar a relação entre toxicidade dos compostos para as formas amastigotas e células de mamíferos. Esse índice foi calculado a partir da razão entre o CC<sub>50</sub> em macrófagos peritoneais e o CI<sub>50</sub> em formas amastigotas de *Leishmania* (NWAKA et al., 2009; BRINGMANN et al., 2013).

O IE é analisado com o objetivo de determinar a especificidade dos compostos nas duas formas do parasito, promastigota e amastigota. Esse índice foi calculado a partir da razão entre o CI<sub>50</sub> em promastigotas e o CI<sub>50</sub> em amastigotas de *Leishmania* (MUYLDER et al., 2011).

### **3.8 Determinação do mecanismo de morte em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

Para a determinação do mecanismo de morte em promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foram analisados parâmetros como morfologia e volume celular, potencial de membrana mitocondrial, produção de ROS, externalização da fosfatidilserina, ciclo celular, integridade da membrana plasmática e formação de vacúolos autofágicos. Desta forma, para todos esses parâmetros analisados, inicialmente as formas promastigotas, em fase logarítmica de crescimento, com concentração de  $1 \times 10^7$  promastigotas/mL, foram tratadas ou não (controle negativo) com o composto DQ3, nas concentrações de 43 e 86  $\mu\text{M}$ , permanecendo incubadas a 25°C por 24 horas. Essas concentrações correspondem a 1 e 2 vezes o CI<sub>50</sub> em promastigotas de *Leishmania* dessa cepa após 72 horas de tratamento. Essas concentrações e o tempo de tratamento foram escolhidos devido ao fato de que o objetivo é identificar as alterações que ocorrem no início do tratamento, e conseqüentemente leva a morte celular, além de otimizar o tempo de experimento. Para isso, foi determinado o percentual de inibição de crescimento das células tratadas em relação ao controle negativo, e a miltefosina (42  $\mu\text{M}$ ) que foi utilizada como controle positivo.

### **3.8.1 Avaliação da morfologia e do volume de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

Para avaliação de alterações morfológicas, utilizou-se o protocolo padronizado em nosso laboratório, enquanto que para as alterações no volume dos promastigotas, teve-se como base o trabalho desenvolvido por Ribeiro (2011). Após o tempo de tratamento, como descrito na seção 3.8, para a avaliação da morfologia, alíquotas de 1 mL foram colocadas em microtubos e centrifugados a 2500 rpm, por 15 minutos. Em seguida as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Após esse tempo, os promastigotas foram lavados com PBS, e após a última lavagem, foram ressuspensos em meio de cultura. Alíquotas de 15 µL, em duplicata, foram transferidas para lâminas de vidro, previamente identificadas. Após a secagem das amostras, elas foram coradas com Giemsa por 20 minutos. As lâminas foram analisadas em microscópio (Olympus BX53, Shinjuku, Tóquio, Japão) e fotografadas (câmera Olympus DP73, Shinjuku, Tóquio, Japão).

A avaliação das alterações no volume dos promastigotas foi realizada por citometria de fluxo. Após o tempo de tratamento, as formas promastigotas foram lavadas, sendo inicialmente centrifugadas por 2500 rpm por 15 minutos, onde o sobrenadante foi descartado, e o sedimento ressuspensionado em 2 mL de PBS, e centrifugado novamente sob as mesmas condições (esse procedimento de lavagem foi realizado nos demais ensaios de mecanismo de morte). Esse processo se repetiu, e em seguida, a concentração celular foi ajustada para  $3 \times 10^6$  promastigotas/mL, e a leitura foi realizada em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) equipado com DIVA software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, CA, EUA). Foi analisado o parâmetro FSC (*Forward Scatter*), pois este apresenta uma correlação com o volume celular, e foi adquirido um total de 10.000 eventos. A miltefosina (42 µM) foi utilizada como controle positivo.

### 3.8.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto DQ3

Para a avaliação do  $\Delta\Psi_m$  de promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) tratadas com o composto DQ3, foi utilizado marcadores fluorescentes distintos, o JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) e rodamina 123 (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA). O protocolo do JC-1 foi desenvolvido a partir do trabalho de Ribeiro *et al.* (2013) com pequenas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), os parasitos foram lavados, como explicado no item 3.8.1, e a concentração celular ajustada para  $5 \times 10^6$  promastigotas em 1 mL de solução de Hank's, sendo incubados, no escuro, com 10  $\mu\text{g/mL}$  de JC-1 a  $37^\circ\text{C}$  por 20 minutos. Após esse período, as células foram lavadas três vezes com solução de Hank's, e ressuspendidas em 1 mL da mesma solução. Em uma placa negra de 96 poços, de fundo transparente, foram transferidos 200  $\mu\text{L}$  da solução contendo as células. Então foi realizada a leitura da placa em um espectrofluorímetro, nos comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/600 nm, fluorescência vermelha, e 485/528 nm, fluorescência verde. O  $\Delta\Psi_m$  foi determinado pela razão entre as fluorescências vermelha e verde. O FCCP (20  $\mu\text{M}$ ) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) foi usado como controle positivo.

O protocolo da rodamina 123 foi elaborado com base em Ribeiro *et al.* (2013) com algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), os promastigotas foram lavados, como explicado no item 3.8.1, e a concentração celular ajustada para  $3 \times 10^6$  promastigotas/mL em 300  $\mu\text{L}$  de PBS. As células foram incubadas, no escuro, com 0,5  $\mu\text{g/mL}$  de rodamina 123, à temperatura ambiente por 20 minutos. A leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto II, sendo o FITC o canal utilizado. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos. O Índice de Variação (IV), que permite quantificar alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123, foi determinado através da equação  $(\text{MT}-\text{MC})/\text{MC}$ , sendo MT a mediana de fluorescência dos parasitos tratados, e o MC a mediana de fluorescência dos parasitos do controle negativo. A miltefosina (42  $\mu\text{M}$ ) e FCCP (20  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como controles positivos.

### **3.8.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação da produção de ROS intracelular em *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) foi realizada através do uso do 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA) (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). Essa substância não apresenta fluorescência, no entanto, quando oxidada pela presença de ROS, se converte em um composto muito fluorescente, a diclorofluoresceína (SARDAR et al., 2013). O protocolo foi elaborado de acordo com Chandrasekaran *et al.* (2013), sendo necessárias algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), os promastigotas foram lavados (item 3.8.1). Em uma placa negra de 96 poços, de fundo transparente, a concentração celular foi ajustada para  $2 \times 10^7$  células em 200  $\mu$ L de PBS. Adicionou-se 4  $\mu$ L de uma solução contendo H<sub>2</sub>DCFDA a 1 mM e as células foram incubadas, no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. A intensidade de fluorescência foi medida através de um espectrofluorímetro, em comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm. A miltefosina (42  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo.

### **3.8.4 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação da externalização de fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática, em promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foi realizada através da marcação com anexina V (Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA) e PI. O protocolo utilizado tomou como base o estudo de Marinho et al. (2014), sendo realizadas algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), os promastigotas foram lavados, como explicado no item 3.8.1. Posteriormente, a concentração celular foi ajustada para  $5 \times 10^6$  promastigotas em 100  $\mu$ L de tampão de ligação (constituído de 10 mM de Hepes (Vetec, RJ, Brasil), 150 mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,8 mM de CaCl<sub>2</sub>). As células foram incubadas, no escuro, com 2,5  $\mu$ L de anexina V por 15 minutos, temperatura ambiente. Após esse tempo, as células foram novamente incubadas,

mas agora com 1 µg/mL de PI em tampão de ligação, por 15 minutos, no escuro. A leitura foi realizada através do citômetro de fluxo FACSCanto II, utilizando os canais FITC (para o marcador anexina V-FITC) e PE (para o marcador PI). Foi adquirido um total de 10.000 eventos. A miltefosina (42 µM) foi utilizada como controle positivo.

### **3.8.5 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação do ciclo celular, de promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foi realizado através da permeabilização da membrana plasmática das células, marcação com PI e determinação da intensidade de fluorescência por citometria de fluxo. O protocolo utilizado foi elaborado de acordo com Ribeiro (2011), com algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), as células foram lavadas, como explicado no item 3.8.1. Em seguida, foram ressuspensas em 1 mL de etanol 70%, e mantidas por 1 hora a -20°C. Os promastigotas foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 280 µL de solução de ribonuclease (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA) a 200 µg/mL, sendo incubado, no escuro, por 1 hora a 37°C. A concentração celular foi ajustada para  $3 \times 10^6$  promastigotas/ mL em 400 µL, e as células foram incubadas com 7 µg/mL de PI, no escuro, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Posteriormente, a leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto II, utilizando o canal PE, e foi adquirido um total de 10.000 eventos. A miltefosina (42 µM) foi utilizada como controle positivo.

### **3.8.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação da integridade da membrana dos promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) foi feita pela marcação com Iodeto de Propídio (PI) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada por duas técnicas diferentes, citometria de fluxo e fluorimetria. Os protocolos foram

executados de acordo com Tiuman et al. (2014) com algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), os promastigotas foram lavados, como explicado no item 3.8.1. Como controle positivo, as duas técnicas utilizaram promastigotas aquecidas em banho-maria, a 65 °C por 10 minutos.

Para a leitura realizada pela técnica de fluorimetria, após a lavagem, a concentração celular foi ajustada para  $1 \times 10^7$  promastigotas em 200  $\mu$ L de PBS. As células foram incubadas, no escuro, com 1  $\mu$ g/mL de PI à temperatura ambiente por 15 minutos. A intensidade de fluorescência foi determinada através de um espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação/emissão de 540/600 nm.

Na leitura feita pela técnica de citometria de fluxo, foi necessário ajustar a concentração celular, após a lavagem, para  $5 \times 10^6$  promastigotas em 400  $\mu$ L de PBS. As células foram incubadas com 1  $\mu$ g/mL de PI, no escuro, por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura foi feita em citômetro de fluxo FACSCanto II, utilizando o canal PE, e foi adquirido um total de 10.000 eventos.

### **3.8.7 Análise quanto a formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação da formação de vacúolos autofágicos, em promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foi feita a partir da marcação com monodansilcadaverina (MDC) (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), uma substância auto fluorescente. O protocolo foi elaborado de acordo com Adade et al. (2013), com algumas modificações. Após o tempo de tratamento (seção 3.8), as células foram lavadas, como explicado no item 3.8.1. A concentração de promastigotas foi ajustada, após a lavagem, para  $1 \times 10^7$  células em 1 mL de PBS. As células foram incubadas, no escuro, com 100  $\mu$ M de MDC por 1 hora à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as células foram novamente lavadas, duas vezes, com PBS, e depois da última lavagem, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 1 mL de PBS, e a concentração foi ajustada para  $5 \times 10^6$  promastigotas em 400  $\mu$ L. Posteriormente, foi realizado a leitura em citômetro de

fluxo FACSCanto II, utilizando o canal AmCyan-A, e um total de 10.000 eventos. Para controle positivo, promastigotas foram incubados por 24 horas em condições de privação de aminoácidos, isto é, foram incubados em PBS.

### **3.9 Avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados por amastigotas de *L. amazonensis*, e tratados com o composto DQ3**

Para a avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados por amastigotas de *L. amazonensis*, teve-se como base o estudo desenvolvido por Fonseca-Silva *et al.* (2013). Os macrófagos peritoneais foram obtidos de camundongos BALB/c, como descrito na seção 3.5. Posteriormente, em uma placa de 96 poços, foram adicionados, em cada poço, 100  $\mu$ L de uma suspensão contendo  $1 \times 10^6$  macrófagos/mL em meio RPMI-1640 suplementado com 10% SBF e 0,5% de penicilina/estreptomicina. A placa permaneceu incubada em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33 °C por 16 horas para adesão dos macrófagos. Após esse tempo, os poços foram lavados com PBS estéril para a retirada dos macrófagos que não aderiram. Posteriormente, foram adicionados 100  $\mu$ L de uma suspensão de  $1 \times 10^7$  promastigotas/mL (proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago) de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), em fase estacionária de crescimento, em meio RPMI-1640 suplementado. As placas foram incubadas novamente, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após 4 horas de interação entre macrófagos e parasitos, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada dos promastigotas que não foram fagocitados. Em seguida, cada poço foi plaqueado novamente com 100  $\mu$ L de meio RPMI-1640 suplementado, e o composto DQ3 foi adicionado nas concentrações de 5,62 e 11,24  $\mu$ M (concentrações que correspondem a 1 e 2 vezes o CI<sub>50</sub> em amastigotas dessa cepa após 72 horas de tratamento). A miltefosina (concentração de 4,15  $\mu$ M, CI<sub>50</sub> em amastigotas após 72 horas de tratamento) foi utilizada como controle positivo e em alguns poços não houve adição de compostos, contendo apenas macrófagos infectados. A placa permaneceu incubada em uma estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33 °C por 24 horas.

Com o objetivo de também avaliar a produção de ROS em macrófagos não infectados, alguns poços permaneceram apenas com os macrófagos, não sendo

realizado a infecção com promastigotas de *Leishmania*. Assim sendo, esses poços foram plaqueados com 100 µL de meio RPMI-1640 suplementado, e os compostos DQ3 (concentrações de 5,62 e 11,24 µM) e miltefosina (4,15 µM) foram adicionados. Em alguns poços não houve adição de compostos, contendo apenas macrófagos não infectados e a placa também foi mantida em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33 °C por 24 horas.

Após o tempo de tratamento, a placa foi lavada com PBS e foram adicionados, em cada poço, 200 µL de PBS e 4 µL de uma solução contendo H<sub>2</sub>DCFDA a 1 mM. As células foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 33 °C por 60 minutos, no escuro. A intensidade de fluorescência foi medida através de um espectrofluorímetro, em comprimentos de onda de excitação/emissão de 485/528 nm.

### **3.10 Avaliação ultraestrutural de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

A avaliação ultraestrutural foi realizada em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8). Para promastigotas, 1×10<sup>7</sup> células/mL foram tratadas ou não com o composto DQ3 na concentração de 86 µM por 24 horas. Já em formas amastigotas, inicialmente os macrófagos (concentração de 5×10<sup>6</sup> células/mL) foram colocados em garrafas com filtro por 16 horas para que ocorresse a adesão dos mesmos. Posteriormente, as garrafas foram lavadas, e foi realizada a infecção com promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento, na proporção de 10 *Leishmanias* para 1 macrófago. Então as células foram tratadas com o composto DQ3 na concentração de 5,62 µM.

Após o tempo de tratamento, os parasitos foram fixados com paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora e após a fixação, as células foram lavadas com tampão de cacodilato de sódio. Posteriormente, as células foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio a 0,8% e 5 mM de cloreto de cálcio. Após desidratação em acetona, as

células foram embebidas em resina Epon. Os cortes ultra-finos foram corados com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo e as amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1400 PLUS TEM). Essa técnica foi realizada em parceria com o Professor Renato DaMatta, na Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

### 3.11 Análise estatística

Para a determinação do  $CI_{50}$ , em promastigotas e amastigotas, e  $CC_{50}$  dos compostos em estudo, foi utilizado o programa *GraFit 5* versão 5.0 (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K), onde foram determinados graficamente a partir de uma curva de regressão não linear, com intervalo de confiança de 95%.

Os gráficos expressando as possíveis alterações provocadas pelo composto DQ3 em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8), foram construídos e analisados, estatisticamente, por meio da análise de variância (One-way Anova), utilizando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para comparação entre os grupos, as diferenças estatisticamente significantes foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett. Apenas a análise estatística do gráfico de avaliação do ciclo celular, foi feita por meio da análise de variância Two-way Anova, e as diferenças estatisticamente significantes analisadas pelo pós-teste de Bonferroni.

### 3.12 Considerações éticas

Os camundongos da linhagem BALB/c foram obtidos do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Todos os protocolos envolvendo esses animais foram aprovados pela Comitê de Ética em experimentação Animal (CEEAA) da UFJF (Protocolos nº 012/2015 e 013/2015).

## 4 RESULTADOS

Os resultados abaixo apresentados fazem parte do manuscrito intitulado “*In vitro* activity and death mechanism of quinoline derivatives in *Leishmania* spp.”, submetido para publicação (apêndice A).

### 4.1 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas, e amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp e em macrófagos

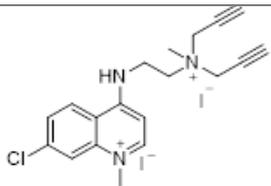
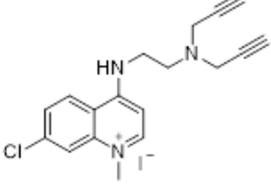
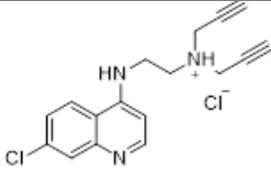
Para avaliação da toxicidade em promastigotas e macrófagos foi utilizado o método colorimétrico MTT. Os compostos foram testados em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Observando a Tabela 2, verifica-se que o composto DQ1, nas duas espécies avaliadas, e o composto DQ2, na espécie *L. braziliensis*, não foram ativos até a maior concentração testada (100,00  $\mu\text{M}$ ). O composto DQ2, mostrou atividade apenas na espécie *L. amazonensis*, com  $\text{CI}_{50}$  de 71,32  $\mu\text{M}$ . Já o composto DQ3, foi o único composto, dentre os testados, que apresentou atividade em ambas espécies de *Leishmania* avaliadas, exibindo  $\text{CI}_{50}$  de 43,25 e 39,19  $\mu\text{M}$  em *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, respectivamente.

Os compostos testados DQ1 e DQ2 não apresentaram toxicidade aos macrófagos peritoneais até a máxima concentração testada dos compostos (150,00  $\mu\text{M}$ ). Para o composto DQ3, concentrações maiores (1000; 500; 250  $\mu\text{M}$ ), além das testadas para os demais compostos, foram avaliadas para a obtenção do  $\text{CC}_{50}$ , e este foi de 226,79  $\mu\text{M}$ . Os fármacos de referência, anfotericina B e miltefosina, utilizados para o tratamento de leishmanioses, se mostraram mais tóxicos que os compostos testados, apresentando  $\text{CC}_{50}$  de 85,81 e 131,99  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Ao verificar que os compostos não foram tóxicos para as células hospedeiras, buscou-se avaliar sua atividade em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

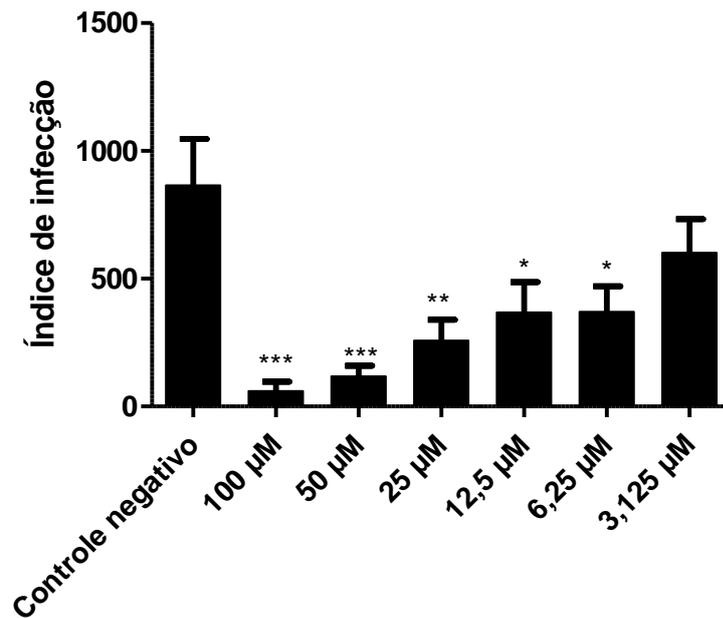
Inicialmente, amastigotas de *L. amazonensis*-GFP foram usados para avaliar a atividade anti-amastigota de todos os compostos, e como mostrado na Tabela 2, pode-se verificar que apenas o composto DQ3 foi ativo, com um  $\text{CI}_{50}$  de 5,48  $\mu\text{M}$ . Os outros compostos, DQ1 e DQ2, não apresentaram atividade até a máxima concentração testada dos compostos (100,00  $\mu\text{M}$ ). Desta forma, o composto DQ3 foi escolhido para dar continuidade aos experimentos deste trabalho, e então foi

realizado teste anti-amastigota com *L. amazonensis* ("selvagem", não transfectado), obtendo um  $CI_{50}$  de 5,62  $\mu M$ , resultado que se encontra na Tabela 2. Além disso, também foi calculado o índice de infecção após o tratamento com o composto DQ3. Na Figura 9, pode-se observar que o composto induziu uma redução, estatisticamente significativa, até a concentração de 6,25  $\mu M$  no índice de infecção quando comparado ao controle negativo, e essa redução foi de modo dose dependente. As reduções foram de 92,97%; 86,4%; 70,22%; 57,50%; 57,20%; e 30,45% nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; e 3,125  $\mu M$ , respectivamente.

**Tabela 2: Efeito dos compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em macrófagos peritoneais, promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp.**

Composto	Estrutura química	* $CI_{50}$ ( $\mu M$ )		** $CC_{50}$ ( $\mu M$ )		* $CI_{50}$ ( $\mu M$ )	
		Promastigota		Macrófagos peritoneais		Amastigota	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. amazonensis</i> GFP	<i>L. amazonensis</i> (selvagem)		
DQ1		>100,00	>100,00	>150,00	>100,0	—	
DQ2		71,32 ( $\pm 5,21$ )	>100,00	>150,00	>100,0	—	
DQ3		43,25 ( $\pm 2,68$ )	39,19 ( $\pm 1,08$ )	226,79 ( $\pm 0,09$ )	5,48 ( $\pm 0,31$ )	5,62 ( $\pm 1,74$ )	
Anfotericina B	—	0,10 ( $\pm 0,02$ )	0,40 ( $\pm 0,06$ )	85,81 ( $\pm 30,49$ )	—	0,18 ( $\pm 0,19$ )	
Miltefosina	—	21,39 ( $\pm 1,18$ )	28,07 ( $\pm 0,47$ )	131,99 ( $\pm 3,95$ )	4,05 ( $\pm 1,79$ )	4,15 ( $\pm 4,43$ )	

\* $CI_{50}$  e \*\* $CC_{50}$  de cada composto corresponde à média de 3 experimentos  $\pm$  erro padrão. Calculado pelo programa Grafit5.



**Figura 9: Efeito do composto DQ3 sobre amastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento.** O índice de infecção foi calculado pela equação (% macrófagos infectadas x número médio de amastigotas por macrófago infectado). As análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ ; (\*\*)  $P > 0,01$ ; (\*)  $P > 0,05$ .

#### 4.2 Índice de seletividade (IS) e especificidade (IE) do composto DQ3

A fim de avaliar a seletividade e especificidade do composto DQ3, foram determinados os IS e IE, conforme descrito na seção 3.7.

O IS determina se o composto foi mais seletivo, isto é, apresentou maior toxicidade para as formas amastigotas de *Leishmania* ou para a célula hospedeira. Quando os valores de IS são maiores que vinte, indicam que o composto foi mais seletivo para o parasito, no entanto, quando menor que vinte, a seletividade foi maior para os macrófagos (NWAKA et al., 2009; BRINGMANN et al., 2013). De acordo com a Tabela 3, pode-se verificar que, para a forma amastigota, o IS foi superior a vinte, demonstrando então, que o composto DQ3 apresentou maior seletividade para o parasito.

O IE foi calculado para a atividade do composto DQ3 em *L. amazonensis* (selvagem), determinando então, em qual forma evolutiva do parasito, promastigota

ou amastigota, o composto foi mais ativo. Em um estudo desenvolvido por Muylder et al. (2011), foi proposto uma classificação para o IE, onde valores superiores a 2,0 sugerem que o composto apresentou maior atividade em amastigotas intracelulares; valores inferiores a 0,4 indicam maior atividade em promastigotas; e valores entre 0,4 e 2,0 sugerem atividade em ambos estágios evolutivos. De acordo com a Tabela 3, observa-se que o IE determinado foi de 7,70, podendo concluir então, que o composto DQ3 foi mais específico para as formas amastigotas intracelulares do que para as formas promastigotas dessa espécie de *Leishmania*. Pode-se observar também na Tabela 3, os IS e IE da miltefosina e anfotericina B, fármacos utilizados em tratamento de leishmanioses.

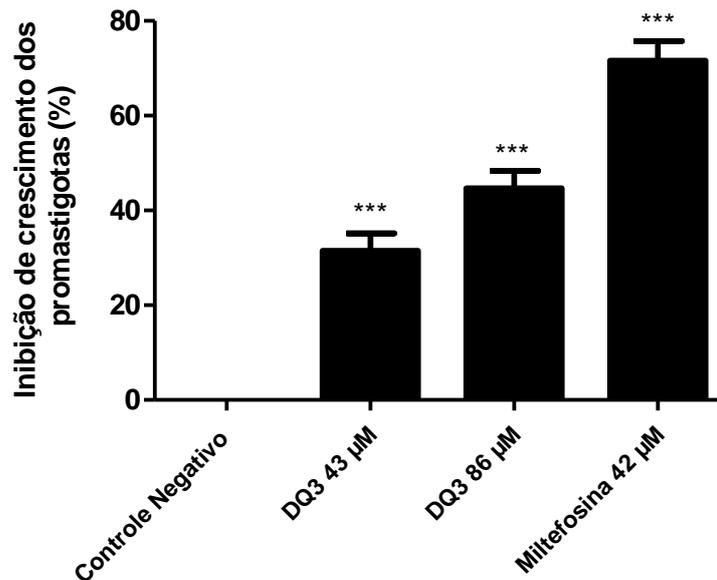
**Tabela 3: IS e IE do composto DQ3 em *L. amazonensis*.**

		<b>DQ3</b>	<b>Miltefosina</b>	<b>Anfotericina B</b>
<i>L. amazonensis</i> (selvagem)	IS (amastigota)	40,35	31,80	476,72
	IE	7,70	5,15	0,56

#### **4.3 Determinação do mecanismo de morte em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

Os experimentos realizados para determinação do mecanismo de morte envolvido após o tratamento com o composto DQ3 foram realizados em promastigotas de *L. amazonensis*. Os promastigotas, por serem extracelulares, são de fácil cultivo e uma alternativa de baixo custo para triagem de novos compostos com possível atividade antileishmanial. Além disso, com essas formas é possível observar o efeito do composto diretamente no parasito, sem interferência da célula hospedeira como no caso de amastigotas intracelulares, sendo assim observado o efeito no complexo macrófago-*Leishmania*. Optou-se por um tempo menor de tratamento de 24 horas, e as concentrações testadas do composto foram de 43 e 86  $\mu\text{M}$ , que correspondem a 1 e 2 vezes o  $\text{CI}_{50}$  em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento por 72 horas. Inicialmente, os parasitos foram tratados nas

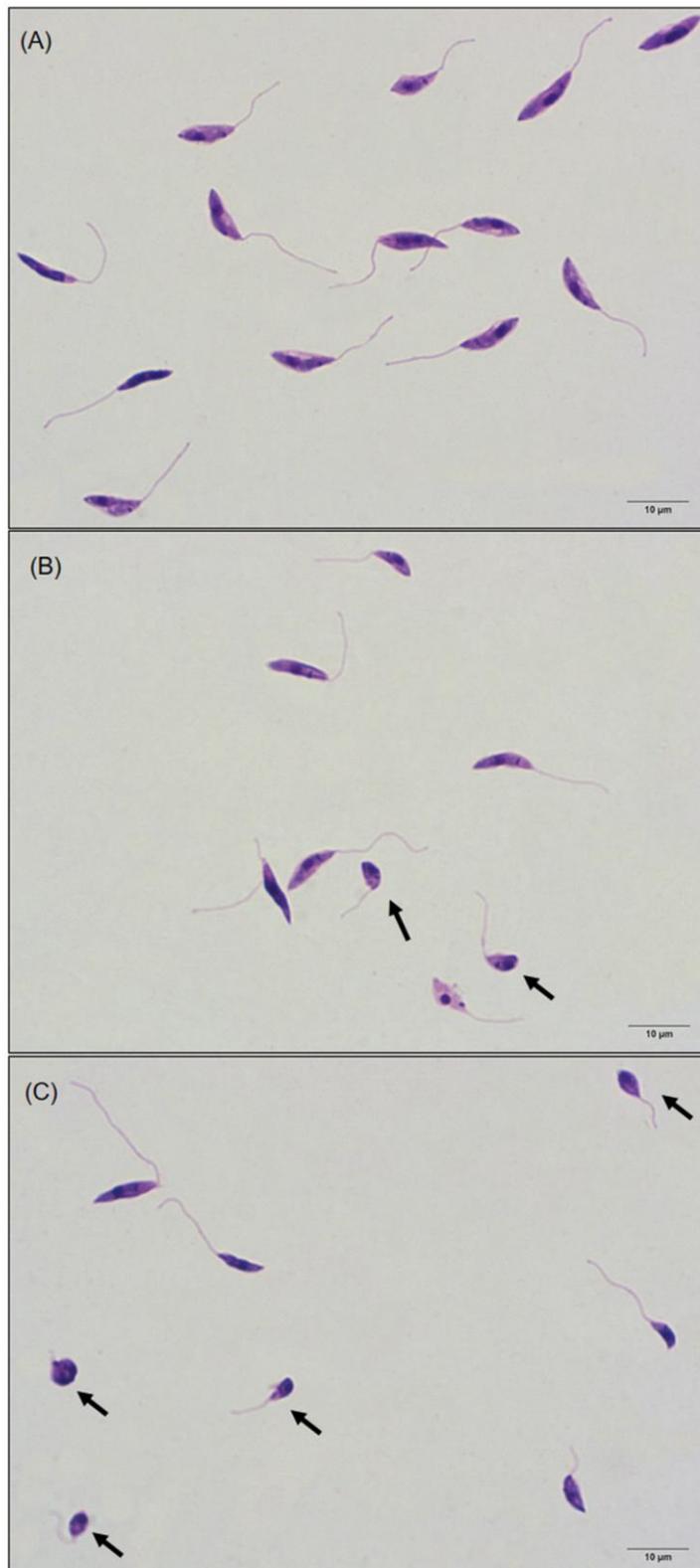
concentrações e tempo acima citados. Como pode ser verificado na Figura 10, após o tratamento dos promastigotas com o composto DQ3 nas concentrações de 43 e 86  $\mu\text{M}$ , houve uma inibição de crescimento de 31,50% e 44,69%, respectivamente. A miltefosina foi utilizada como controle positivo, e após 24 horas, houve uma inibição de 71,65%.



**Figura 10: Percentual de inibição de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24 horas de tratamento com o composto DQ3.** As análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 8 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ .

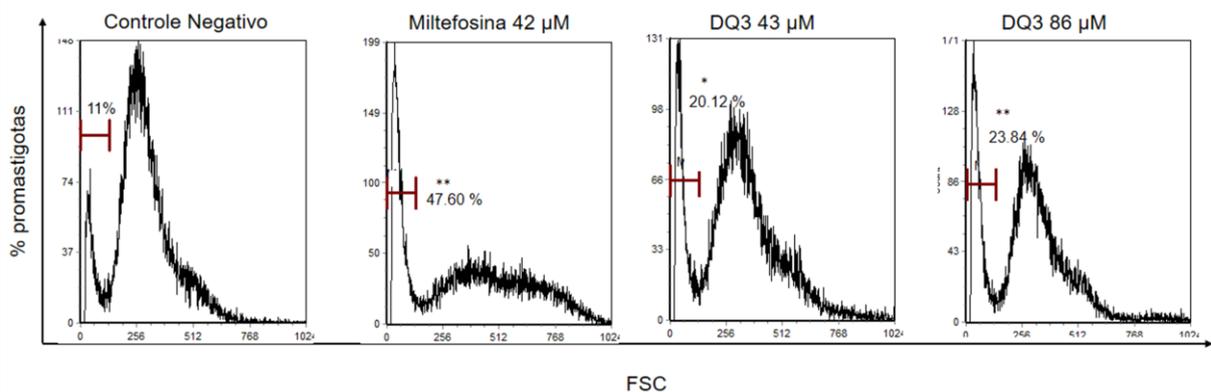
#### 4.3.1 Avaliação da morfologia e do volume de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3

Avaliou-se o aspecto morfológico e o volume dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3, nas concentrações de 43 e 86  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Na Figura 11, pode-se notar que, após o tratamento, as formas promastigotas assumiram o formato do corpo arredondado em ambas concentrações testadas do composto DQ3 (Figura 11B e C), sendo esta a principal alteração morfológica quando comparado ao controle negativo (Figura 11A). Além disso, é possível observar uma redução do volume celular, também nas duas concentrações do composto.



**Figura 11: Fotomicrografia ilustrativa do efeito do tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu\text{M}$ ), após 24 horas, em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Controle (B) DQ3 43  $\mu\text{M}$  (C) DQ3 86  $\mu\text{M}$ . Promastigotas com o corpo arredondado (setas). Aumento de 1000x. Escala da barra = 10  $\mu\text{m}$ .**

A fim de confirmar a ocorrência da redução do volume celular citada anteriormente, foi realizada a avaliação do parâmetro FSC, através de citometria de fluxo, uma vez que este possui correlação com o volume celular. Os resultados estão expressos na Figura 12 e, como pode ser verificado, os tratamentos com o composto DQ3, em ambas concentrações, induziram redução do volume dos promastigotas de *L. amazonensis* quando comparado ao controle negativo. Ao analisar a população de células marcadas no primeiro pico dos histogramas, nota-se que o percentual de células do controle negativo foi de 11%, e após o tratamento com o composto DQ3, 43 e 86  $\mu\text{M}$ , houve um aumento dessa população, para 20,12% e 23,84%, respectivamente. A miltefosina foi utilizada como controle positivo, e provocou um aumento para 47,60%.

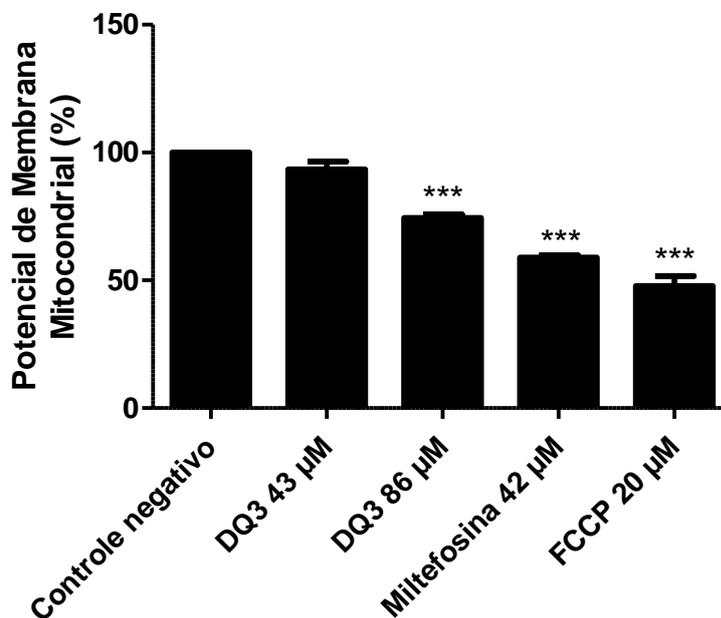


**Figura 12: Volume dos promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas.** O tamanho celular foi avaliado através de citometria de fluxo, onde 10.000 eventos foram analisados, observando o FSC (Forward Scatter), que tem relação com o volume da célula. Análises foram obtidas no FCS Express V3. As análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*)  $P > 0,01$ ; (\*)  $P > 0,05$ .

#### 4.3.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto DQ3

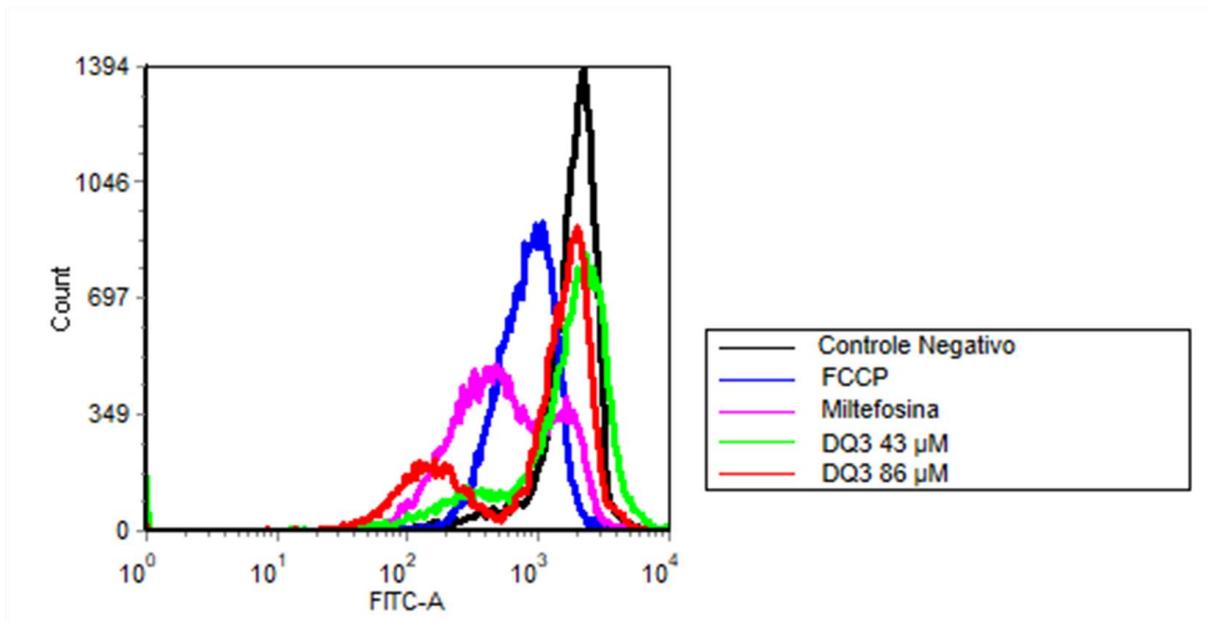
O JC-1 é um corante catiônico lipofílico que penetra na mitocôndria, e de acordo com o  $\Delta\Psi_m$  interno, pode emitir fluorescência vermelha, que é quando, em células saudáveis, o corante se concentra na matriz mitocondrial e se apresenta na forma de J-agregado, ou fluorescência verde que, em células com baixo a médio

$\Delta\Psi_m$ , o corante fica disperso pelo citoplasma, se encontrando na forma de monômero (COSSARIZZA et al., 1993; CHAZOTTE, 2011). O  $\Delta\Psi_m$  foi determinado pela razão entre as fluorescências vermelha e verde. Como pode ser observado na Figura 13, o tratamento dos parasitos com o composto DQ3 na concentração de 43  $\mu\text{M}$  induziu uma redução de 6,55% no  $\Delta\Psi_m$ , não apresentando diferença estatisticamente quando comparado ao grupo controle. No entanto, após o tratamento com o composto na concentração de 86  $\mu\text{M}$ , observou-se uma redução estatisticamente significativa no  $\Delta\Psi_m$ , de 25,57%, quando comparado ao controle negativo. O FCCP (20  $\mu\text{M}$ ) e a miltefosina (42  $\mu\text{M}$ ) foram utilizados como controle positivo, e induziram uma redução de 41,11% e 52,23%, respectivamente. Estes resultados sugerem que o tratamento com o composto DQ3 na concentração de 86  $\mu\text{M}$  em formas promastigotas de *L. amazonensis* induz uma despolarização do  $\Delta\Psi_m$ , e os percentuais do  $\Delta\Psi_m$  estão representados na Figura 13. O  $\Delta\Psi_m$  dos promastigotas não tratados, ou seja, do grupo controle negativo, considera-se 100%.



**Figura 13:** Alterações do  $\Delta\Psi_m$  de formas promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e avaliadas pela marcação com JC-1. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ .

A Rodamina 123 é um corante fluorescente catiônico que se difunde passivamente através da membrana plasmática e se liga à membrana mitocondrial de células viáveis, isto é, que conservaram seu  $\Delta\Psi_m$  normal. Quando ocorre uma redução na fluorescência, significa que não houve deposição do corante, e isso aconteceu devido à perda no  $\Delta\Psi_m$  (CHEN *et al.*, 1982; CHAZOTTE, 2011). Ao observar a Figura 14, nota-se uma pequena redução da fluorescência, principalmente nos tratamentos com o composto DQ3 86  $\mu\text{M}$ , Miltefosina e o FCCP. Esse deslocamento para a esquerda é indicativo de diminuição do  $\Delta\Psi_m$ . O IV para cada tratado foi calculado (Tabela 4) e este permite quantificar as alterações na intensidade de fluorescência após a marcação com a rodamina 123, sendo que valores negativos indicam despolarização do  $\Delta\Psi_m$  (RIBEIRO *et al.*, 2013). Assim, verifica-se redução de 73,0% (Miltetofosina 42  $\mu\text{M}$ ) e 42,7% (FCCP 20  $\mu\text{M}$ ) para os controles positivos, e 4,3% e 28,0%, para os tratamentos com o composto DQ3 43  $\mu\text{M}$  e 86  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 14: Alterações do  $\Delta\Psi_m$  de formas promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e avaliadas pela marcação com rodamina 123. Resultado expresso por um histograma representativo da intensidade de fluorescência para rodamina 123. Análises foram obtidas no FCS Express V3.**

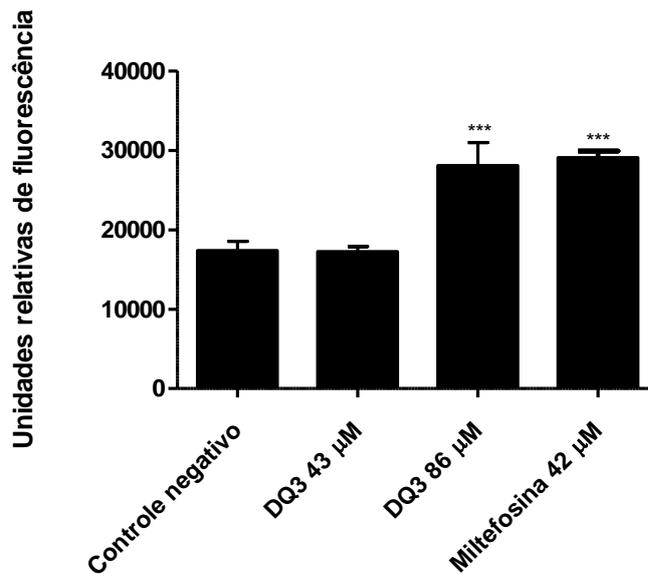
**Tabela 4: Cálculo do índice de variação (IV) de formas promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas e avaliadas pela marcação com rodamina 123.**

Composto	Índice de variação (IV)
Controle Negativo	0
FCCP 20 $\mu\text{M}$	-0,427 ***
Miltefosina 42 $\mu\text{M}$	- 0,730 ***
DQ3 43 $\mu\text{M}$	- 0,043
DQ3 86 $\mu\text{M}$	- 0,280 ***

O cálculo do índice de variação (IV), foi 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. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ .

#### **4.3.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

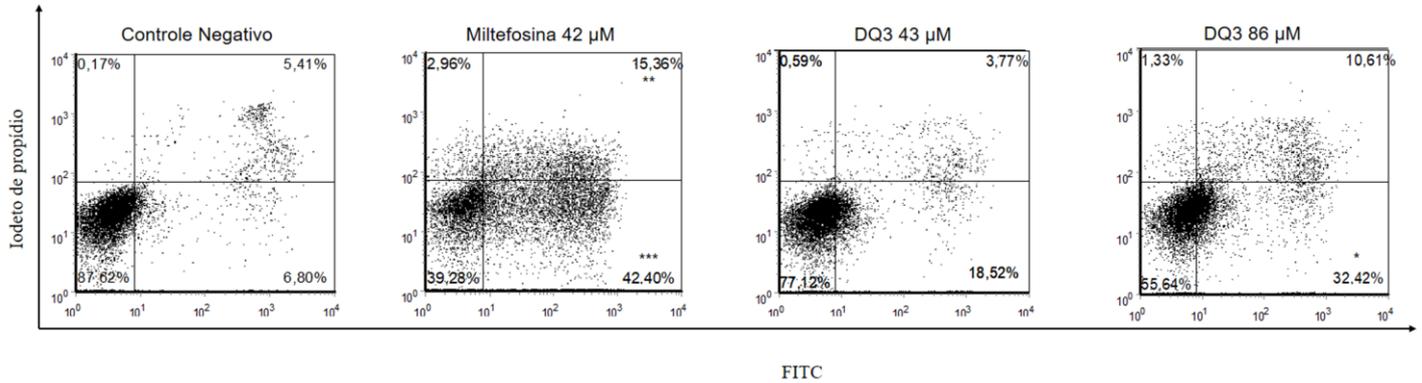
A mitocôndria é considerada como uma das principais organelas produtoras de ROS em *Leishmania* sp e o desequilíbrio entre essas moléculas e a capacidade de defesa antioxidante do organismo é conhecido como estresse oxidativo. Desta forma, buscou-se avaliar, por meio da marcação com  $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , se os tratamentos provocariam um estresse oxidativo, elevando a produção de ROS. Os resultados estão expressos na Figura 15. Após o tratamento das formas promastigotas com o composto DQ3, concentrações de 43  $\mu\text{M}$  e 86  $\mu\text{M}$ , nota-se que apenas a concentração de 86  $\mu\text{M}$  ocasionou um aumento (61,67%) na produção de ROS quando comparado ao controle negativo. A miltefosina foi utilizada como controle positivo, provocando um aumento de 67,55% na produção de ROS.



**Figura 15: Produção de ROS em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86  $\mu$ M) por 24 horas, e marcados com H<sub>2</sub>DCFDA. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*) P > 0,001.**

#### **4.3.4 Avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

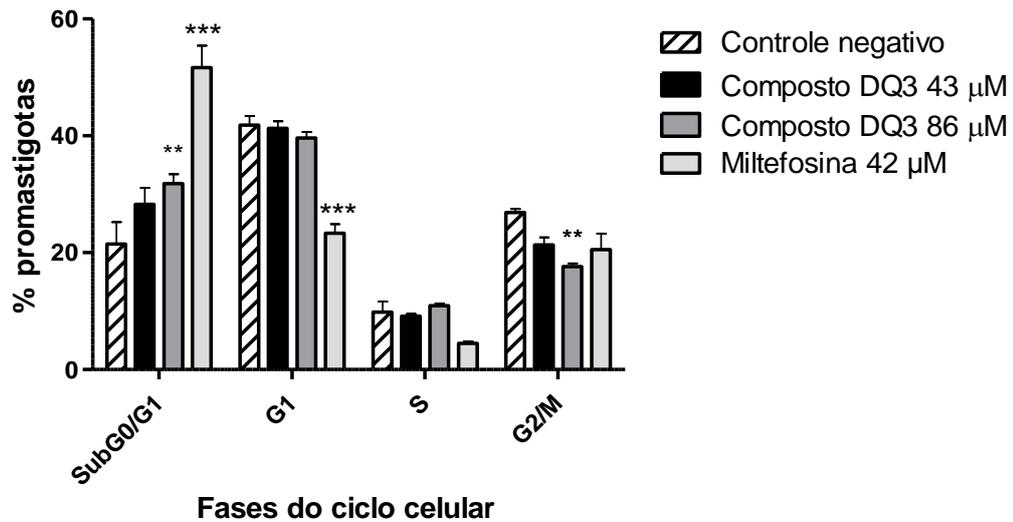
Essa avaliação foi realizada por meio da marcação com anexina V, uma sonda fluorescente capaz de se ligar à fosfatidilserina após o translocamento deste fosfolípido para o folheto externo da membrana celular. Normalmente, fosfatidilserina é encontrada no folheto interno da membrana plasmática e é translocada em células em processo de apoptose. Para assegurar que esse marcador não estava se ligando a fosfatidilserina presente na porção interna da membrana plasmática dos parasitos, foi também realizada uma marcação com PI, consequentemente garantindo que a membrana plasmática das células se manteve íntegra. Na figura 16, observa-se que dentre os tratamentos com o composto DQ3, apenas ocorreu aumento significativo da exposição da fosfatidilserina, em formas promastigotas de *L. amazonensis*, com o composto na concentração de 86  $\mu$ M. A Miltefosina (42  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo, aumentando expressivamente a exposição da fosfatidilserina.



**Figura 16: Externalização de fosfatidilserina em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 µM) por 24 horas, e duplamente marcado com Anexina V e PI. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dot plots são representativos de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*) P > 0,001; (\*\*) P > 0,01; (\*) P > 0,05.**

#### **4.3.5 Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3**

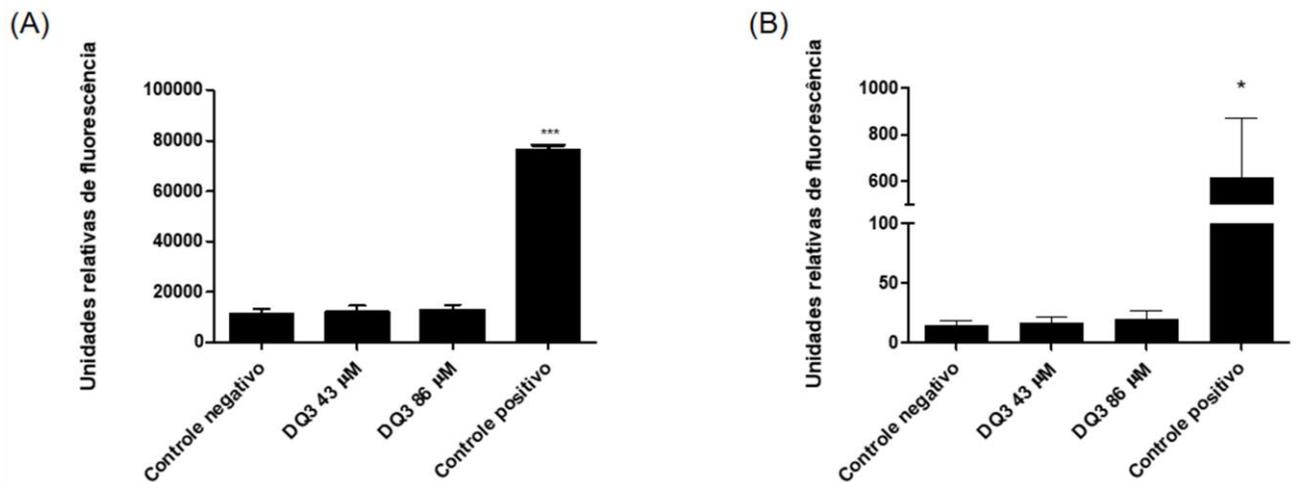
O ciclo celular dos parasitos tratados foi avaliado analisando variações no conteúdo de DNA. O marcador utilizado foi o PI, e como já citado na seção 4.3.4 este se liga ao DNA celular, permitindo então sua quantificação. As células com fragmentação do DNA apresentam-se com intensidade de fluorescência menor do que as células que se encontram na fase G1, e por isso são visualizadas em um região denominada sub G0/G1 (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). Na Figura 17, observa-se que, na fase sub G0/G1, ocorreu um aumento significativo no percentual de células após o tratamento com o composto DQ3 86 µM (31,82%) e miltefosina (51,70%), quando comparado ao controle negativo (21,45%). Esse aumento foi acompanhado por uma redução na porcentagem de células encontradas na fase G2/M, sendo que no grupo controle, aproximadamente 26,89% dos promastigotas se encontravam nessa fase, e após o tratamento com o composto DQ3 86 µM, apenas 17,60% das células estavam nessa mesma fase. Além disso, nota-se também uma redução na população de G1 após o tratamento com miltefosina (23,32%) quando comparado ao controle negativo (41,84%).



**Figura 17: Avaliação do ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 µM) por 24 horas e marcação com PI.** Porcentagem de células presentes em cada fase do ciclo celular. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ ; (\*\*)  $P > 0,01$ .

#### 4.3.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3

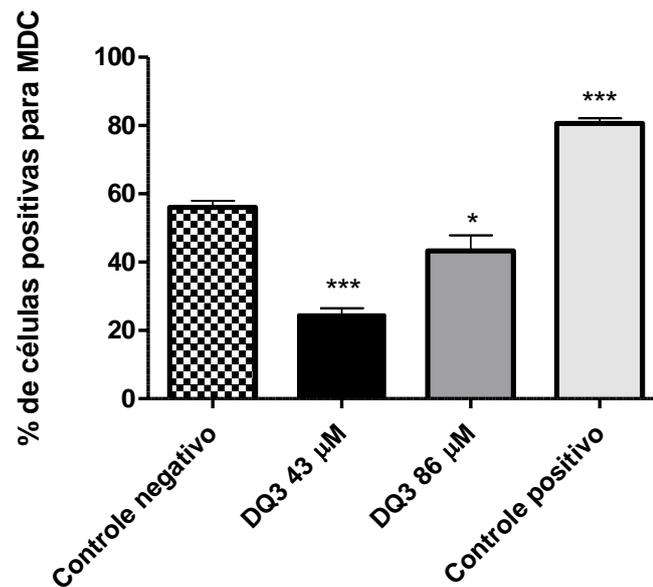
Para avaliar a integridade da membrana plasmática das formas promastigotas de *L. amazonensis*, foi utilizado o marcador iodeto de propídio (PI). Esse corante fluorescente é incapaz de atravessar a membrana plasmática íntegra, porém, quando ocorre alguma ruptura na mesma, permite-se a entrada do marcador e sua ligação ao DNA celular (SCARIOT et al., 2017). Após a marcação com PI, procedeu a análise por fluorimetria (Figura 18A) e citometria de fluxo (Figura 18B). Em ambas figuras, pode-se verificar que não ocorreu diferença nas intensidades de fluorescência do PI entre o grupo controle negativo e dos tratamentos com o composto DQ3 nas concentrações de 43 e 86 µM. Como controle positivo, foram usados promastigotas aquecidos a 65°C por 10 minutos, a fim de que ocorresse ruptura na membrana plasmática, e conseqüentemente, um aumento da fluorescência.



**Figura 18: Avaliação da integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 μM) por 24 horas, através da marcação com PI.** (A) Análise realizada por fluorimetria. (B) Análise realizada por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ ; (\*)  $P > 0,05$ .

#### 4.3.7 Análise quanto a formação de vacúolos autofágicos em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3

Para avaliar possíveis alterações quanto a formação de vacúolos autofágicos foi utilizado o monodansilcadaverina (MDC), que é um composto fluorescente utilizado para marcar vacúolos autofágicos dentro das células (YIN; YE; TAN, 2010). Pode-se notar pela Figura 19, que promastigotas tratados com o composto DQ3 43 μM e 86 μM, reduzem 56,23% e 22,73%, respectivamente, o percentual de células positivas para MDC quando comparado ao controle negativo. Já as células do controle positivo, isto é, promastigotas que foram incubados por 24 horas em condições de privação de aminoácidos (incubados em PBS), observou-se um aumento de 60% de células positivas para MDC quando comparado ao controle negativo.



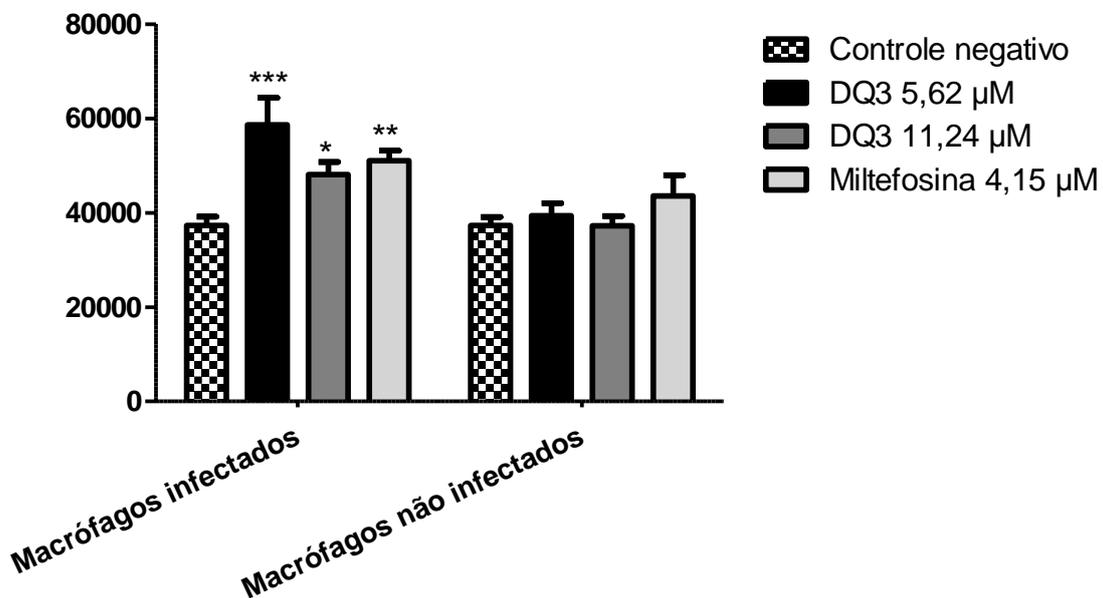
**Figura 19: Avaliação da ocorrência de autofagia em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o composto DQ3 (43 e 86 µM) por 24 horas e marcação com MDC.** Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ ; (\*)  $P > 0,05$ .

#### 4.4 Avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, e tratados com o composto DQ3

Após o tratamento com o composto DQ3 em formas promastigotas, verificou-se que uma das principais alterações observadas foi o aumento da produção de ROS. Desta forma, buscou avaliar se em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com este composto, também ocorreria aumento dessas espécies reativas. Além disso, também foi realizado a dosagem de ROS em macrófagos não infectados. Assim, os macrófagos, infectados e não infectados, foram tratados com o composto DQ3 nas concentrações de 5,62 e 11,24 µM (concentrações correspondentes a 1 e 2 vezes o  $CI_{50}$  em amastigotas de *L. amazonensis*) por 24 horas. A miltefosina (4,15 µM,  $CI_{50}$  em amastigotas de *L. amazonensis*) foi utilizada como controle positivo.

Pode-se observar na Figura 20, que após o tratamento com o composto DQ3, houve um aumento significativo na produção de ROS em macrófagos infectados e

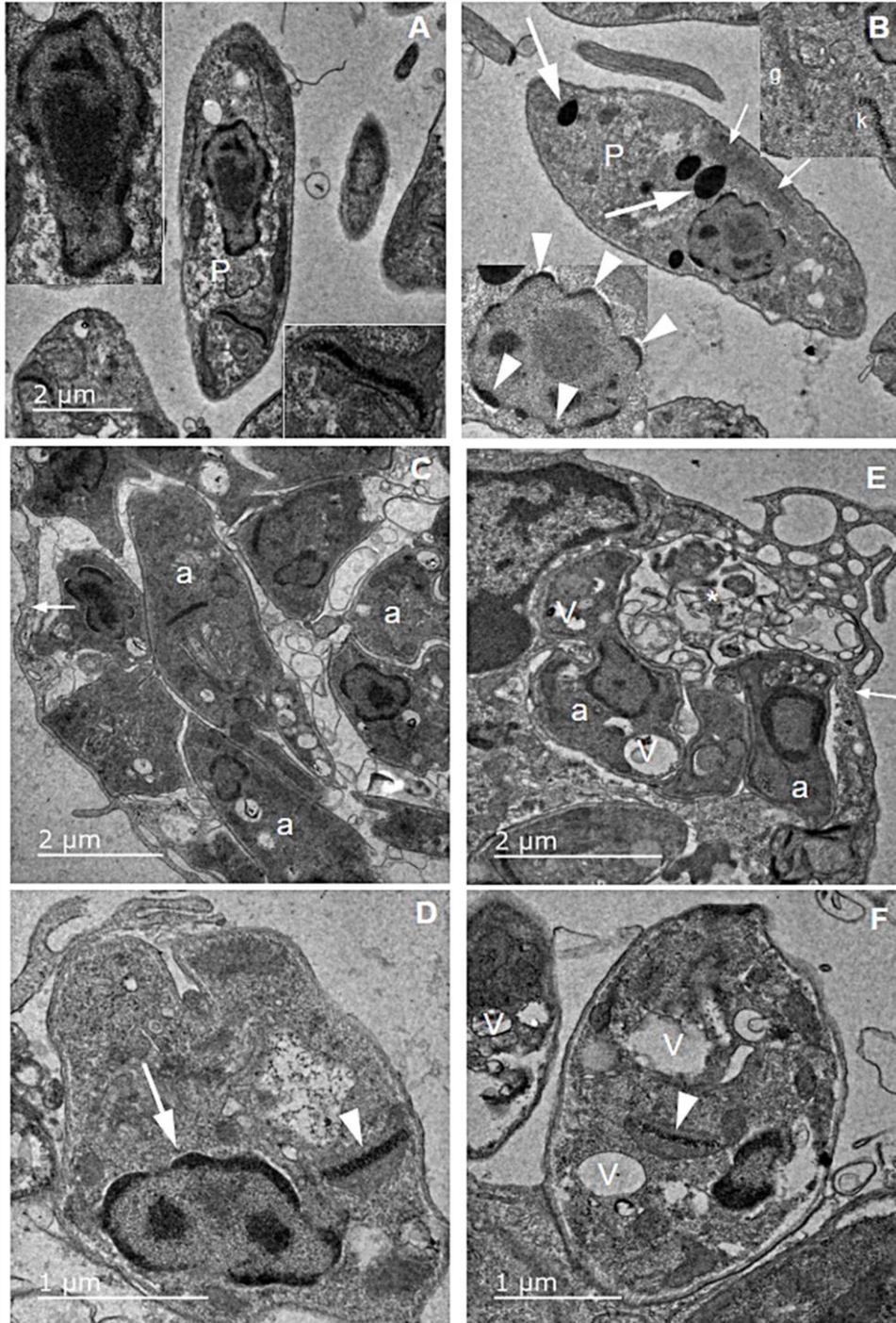
tratados com o composto nas concentrações de 5,62  $\mu\text{M}$  (57%) e 11,24  $\mu\text{M}$  (28,82%) quando comparado aos macrófagos infectados não tratados. A miltefosina (4,15  $\mu\text{M}$ ), utilizada como controle positivo, induziu um aumento de 36,64% na produção de ROS. Além disso, pode-se verificar também, que em macrófagos não infectados e tratados com o composto, assim como na miltefosina, não foi observado aumento significativo dessas espécies reativas, o que sugere que ambos compostos induzem aumento na produção de ROS apenas em células infectadas com amastigotas intracelulares.



**Figura 20: Produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, e tratados com o composto DQ3.** Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Análises estatísticas foram obtidas no GraphPad Prism versão 5.0. Os dados foram obtidos a partir de 3 experimentos independentes. Asteriscos (\*) indicam diferenças significativas em comparação com o controle negativo: (\*\*\*)  $P > 0,001$ ; (\*\*)  $P > 0,01$ ; (\*)  $P > 0,05$ .

#### 4.5 Avaliação ultraestrutural de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* tratados com o composto DQ3

A avaliação ultraestrutural de promastigotas e amastigotas intracelulares tratados com o composto DQ3 foi realizada por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), representada na Figura 21.



**Figura 21: Imagens ultraestruturais de *L. amazonensis* após tratamento com o composto DQ3.**

A - Promastigotas (P) cultivados sem tratamento durante 24 horas. A maior ampliação de núcleos e cinetoplasto é mostrada nas inserções; B - Promastigotas tratados com o composto DQ3 (86  $\mu\text{M}$ ) por 24 horas. Os corpúsculos lipídicos altamente eletrondensos (seta), a mitocôndria inflada (pequena flecha), o complexo de Golgi inalterado (g), o cinetoplasto (k) e o núcleo com uma morfologia apoptótica (ponta de seta) podem ser vistos. A barra em "A" é a mesma para "B". C - Amastigotas (a) em macrófagos (flecha) cultivados por 24 horas sem tratamento. D - Maior ampliação do amastigota sem tratamento; núcleos (seta) e cinetoplasto (ponta de seta) podem ser vistos; E - Amastigotas (a) em macrófagos (flecha) cultivados por 24 horas com tratamento DQ3 (5,62  $\mu\text{M}$ ). Vacuolização (V) e agregados (\*) dentro do vacúolo parasitóforo; F - Ampliação maior do amastigota com tratamento DQ3 (5,62  $\mu\text{M}$ ); O cinetoplasto (ponta de flecha) com morfologia preservada e vacuolização (V) podem ser visto.

Na Figura 21A e 21B, encontram-se as formas promastigotas não tratadas e tratadas com o composto DQ3 (86  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. Nota-se que os promastigotas não tratados apresentam morfologia normal, no entanto, em promastigotas tratados, verifica-se a mitocôndria inchada, cinetoplasto com alteração e sem membrana de mitocondrial aparente em volta, aumento de corpúsculos lipídicos altamente eletrondensos e o núcleo com características apoptóticas. Não houve alteração no complexo de Golgi.

Na Figura 21C e 21D, encontram-se macrófagos infectados não tratados (controle negativo), e pode-se observar um grande número de amastigotas no interior desses macrófagos, além dos amastigotas apresentarem morfologia normal, com estruturas preservadas. Já na Figura 21E e 21F, encontram-se macrófagos infectados e tratados com o composto DQ3 (5,62  $\mu\text{M}$ ), e é possível observar um menor número de amastigotas no interior desses macrófagos. Nota-se ainda intensa vacuolização e agregados dentro do vacúolo parasitóforo, provavelmente resultante de debris celulares dos parasitos mortos. Em ambas imagens, observa-se amastigotas com morfologia alterada e presença de grandes vacúolos nos parasitos intracelulares. Não foi observada alteração no cinetoplasto.

## 5 DISCUSSÃO

Os compostos atualmente utilizados para o tratamento de leishmanioses apresentam algumas desvantagens, como alta toxicidade, forma de administração, tempo de duração e custo elevado do tratamento, além da resistência de algumas cepas do parasito (ANTINARELLI et al., 2015; SRIVASTAVA et al., 2017). Conseqüentemente, a busca por novas formas de tratamento eficazes tornou-se uma prioridade. Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antileishmanial, baixa toxicidade e custo acessível desperta grande interesse em pesquisadores (COSTA DUARTE et al., 2016).

Alguns estudos já demonstraram que certas classes de moléculas e seus derivados apresentam ampla atividade biológica, incluindo a antileishmanial, despertando o interesse quanto a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos ativos. Neste sentido, os derivados de quinolina tem sido objeto de estudos em

pesquisas, tanto por outros grupos, quanto pelo nosso (COIMBRA et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013; ANTINARELLI et al., 2015).

No presente estudo, foram testados três compostos derivados de 4-amino-7-cloroquinolina em ambos estágios de *Leishmania* sp: promastigota, que apesar de ser encontrada no inseto vetor, tem sido muito utilizada nos testes antileishmaniais *in vitro* pela facilidade de cultivo; e as formas amastigotas, presentes no hospedeiro vertebrado e consideradas como "modelo-ouro" para a pesquisa de novas alternativas no tratamento das leishmanioses (VERMEERSCH et al., 2009). No ensaio para avaliar a atividade anti-promastigota, notou-se que o único composto que apresentou atividade em ambas espécies testadas, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*, foi o composto DQ3, exibindo um  $CI_{50}$  de 43,25 e 39,19  $\mu$ M, respectivamente. Já os outros compostos, ou não apresentou atividade em nenhuma espécie ou apenas em *L. amazonensis*, como ocorreu com o composto DQ2. Estes resultados ressaltam variações do efeito dos compostos nas diferentes espécies de *Leishmania*, as quais podem apresentar sensibilidades diferentes a um mesmo composto. Variações de sensibilidade a diferentes espécies de *Leishmania* já são bem relatadas, incluindo com as drogas de referência como antimoniais pentavalentes, anfotericina B ou miltefosina. Inclusive, o entusiasmo inicial quanto ao uso da miltefosina como primeira droga oral para o tratamento das leishmanioses nas Américas foi reduzido quando as espécies de *Leishmania* de países do Novo Mundo mostraram ser menos sensíveis a esta droga (YARDLEY et al., 2005; CHAKRAVARTY; SUNDAR, 2010). Neste sentido, convém salientar a promissora atividade do composto DQ3, que apresentou atividade em espécies distintas de *Leishmania*.

Como todos os compostos não foram citotóxicos em macrófagos peritoneais até a máxima concentração testada (150  $\mu$ M), foi então realizado o teste anti-amastigota, sendo que a maior concentração avaliada (100  $\mu$ M) foi inferior a máxima concentração utilizada no teste de citotoxicidade, garantindo então que os compostos não seriam tóxicos às células hospedeiras. O ensaio onde se avalia o efeito dos compostos em formas amastigotas intracelulares é um dos mais importantes para a triagem primária de novos compostos contra *Leishmania*, uma vez que esse estágio do parasito é designado como o alvo mais relevante (MUYLDER et al., 2011). Neste trabalho este teste foi realizado apenas em *L.*

*amazonensis*, já que os melhores resultados na avaliação anti-promastigota foram obtidos com esta espécie. A *L. amazonensis* tem sido associada a inúmeras manifestações clínicas da leishmaniose humana, incluindo a leishmaniose cutânea e difusa no Brasil. Além dessas manifestações cutâneas, essa espécie tem sido associada à forma visceral, uma manifestação clínica considerada fatal se não tratada (BARRAL et al., 1991).

O composto que apresentou atividade anti-amastigota foi somente o composto DQ3 e foi interessante notar que esta atividade foi mantida mesmo utilizando cepas diferentes de *L. amazonensis*, transfectadas ou não (CI<sub>50</sub> de 5,62 e 5,48 µM para *L. amazonensis*-cepa PH8 e *L. amazonensis*-cepa Josefa transfectada com GFP, respectivamente). Além disso, esse composto, quando comparado ao controle negativo, foi capaz de reduzir estatisticamente o índice de infecção até a concentração de 6,25 µM. Esse índice é variante do percentual de macrófagos infectados e do número médio de amastigotas por macrófagos infectados (PALADI et al., 2012). A redução do número de parasitos intracelulares foi também observada pela MET. Inclusive, houve intensa vacuolização dentro do vacúolo contendo os parasitos, o que pode ser reflexo da destruição dos amastigotas.

Como o composto DQ3 foi o que apresentou resultados mais promissores, foi então determinado o seu CC<sub>50</sub>, sendo encontrado um valor de 226,79 µM. Quando comparado aos fármacos de referências, verifica-se que o CC<sub>50</sub> deste composto, é superior ao CC<sub>50</sub> da anfotericina B e miltefosina, o que mostra que o composto DQ3 poderia ser utilizado, *in vitro*, em concentrações maiores (até 226,79 µM), se necessário, sem provocar danos às células hospedeiras do parasito. Além disso, foi analisado sua seletividade, e o composto DQ3 apresentou o IS de 40,35 para *L. amazonensis* PH8, evidenciando que o composto é mais de 40 vezes mais tóxico para as formas amastigotas do que para as células hospedeiras, os macrófagos. É importante lembrar que o IS considerado como satisfatório *in vitro* deve ser superior a 20,0 (NWAKA et al., 2009; BRINGMANN et al., 2013). Além disso, em relação a especificidade, o seu IE foi de 7,70 demonstrando sua maior especificidade para o estágio de amastigota intracelular do que para a forma promastigota, sendo este resultado de grande importância, uma vez que esta forma é a responsável pelas manifestações clínicas da doença no homem (MUYLDER et al., 2011). Ao comparar os IS e IE do composto DQ3 aos dos fármacos utilizados para o tratamento de

leishmanioses, anfotericina B e miltefosina, nota-se que os valores se assemelham muito aos da miltefosina, porém o composto DQ3 se mostrou mais seletivo e mais específico. Este conjunto de resultados demonstra que o composto DQ3 exibe efeito antileishmanial seletivo e eficaz *in vitro*, e com baixa toxicidade para células de mamíferos.

Ao analisar as estruturas dos compostos testados, observa-se que esses se diferenciam pela presença do íon iodo ou cloro, além da quantidade desses íons, pela presença de ligação ou não no N ligado ao grupo propargila e ao N do anel quinolínico. Os resultados apresentados sugerem que a presença do íon cloro é melhor, uma vez que nos compostos com presença de íon iodo houve redução, ou até mesmo não apresentou atividade antileishmanial. Além disso, nos compostos com íon iodo, observa-se que a presença de dois íons anula a atividade biológica. Em relação as ligações no N ligado ao grupo propargila e no N do anel quinolínico, os resultados não permitem afirmar algo, uma vez que essa diferença no  $CI_{50}$  dos compostos podem estar mais relacionadas as duas sugestões já citadas.

Após essa triagem inicial e em vista dos promissores resultados, se faz importante determinar quais alterações e/ou alvos ocorrem em *L. amazonensis* tratadas, determinando o mecanismo de morte induzido pelo composto DQ3. Então, avaliou-se as alterações provocadas na mitocôndria do parasito, já que em tripanossomatídeos essa organela é única e desempenha funções importantes para a sobrevivência, como produção de ATP, regulação da homeostase iônica, diferenciação celular, fosforilação oxidativa e liberação de proteínas pró-apoptóticas em resposta a sinais de estresse (COTTET-ROUSSELLE et al., 2011; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Estudos experimentais sobre mecanismo de ação das principais drogas antiprotozoárias sugerem que por esses motivos, a mitocôndria é considerada como um dos alvos mais importantes dentro do organismo de protozoários (FIDALGO; GILLE, 2011). A disfunção mitocondrial é indicada, entre outros eventos, pela perda de  $\Delta\Psi_m$  e produção de ROS. A cadeia de transporte de elétrons mitocondriais é muito eficiente, porém, um percentual de aproximadamente 1 a 2% dos elétrons que passam por essa cadeia de conseguem escapar, e reagem com o oxigênio molecular ( $O_2$ ), formando ROS. Assim, a produção de ROS ocorre como subproduto da fosforilação oxidativa e do metabolismo. Essas espécies reativas podem reagir com componentes celulares,

como proteínas, lipídios e DNA, e conseqüentemente, essas oxidações podem acarretar em danos à maquinaria celular, levando à morte da célula (BOONSTRA; POST, 2004; FORKINK et al., 2010). Essas espécies reativas exibem duplo papel nas células, sendo mediadores de regulação e efetores citotóxicos, além de poderem induzir estresse oxidativo, que é quando ocorre um desequilíbrio entre essas moléculas e a capacidade de defesa antioxidante do organismo, elevando a concentração de ROS (SMIRLIS et al., 2010; TOMÁS; CASTRO, 2013).

Neste trabalho, analisando o  $\Delta\Psi_m$  pelas marcações com JC-1 e rodamina 123, e da produção de ROS pela marcação com H<sub>2</sub>DCFDA, verificou-se que o tratamento com o composto DQ3, apenas na maior concentração (86  $\mu$ M), induziu redução no  $\Delta\Psi_m$  (25,4%, utilizando o JC-1 e 28,0%, com rodamina 123) e um aumento de 61,67% na produção de ROS quando comparado ao controle negativo. Esses dados sugerem que o composto DQ3 pode estar atuando na mitocôndria do parasito, acarretando despolarização do  $\Delta\Psi_m$  e estresse oxidativo. Já foi observado que alguns tratamentos são indutores de ROS e como consequência desse estresse oxidativo, ocorrem alguns eventos característicos de apoptose, incluindo perda do  $\Delta\Psi_m$  (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Com base nessa informação e nos resultados obtidos, onde é possível observar um aumento maior na produção de ROS do que redução do  $\Delta\Psi_m$ , este trabalho sugere a hipótese de que o composto DQ3 induz na mitocôndria um aumento na produção de ROS inicialmente, e como consequência ocorre despolarização do  $\Delta\Psi_m$ . No entanto, para comprovar essa informação seria necessário a realização de novos experimentos, a fim de acompanhar os efeitos iniciais induzidos por este composto.

Além disso, a avaliação da produção de ROS em macrófagos não infectados e infectados com amastigotas de *L. amazonensis* evidenciou que o tratamento com o composto e com a miltefosina (utilizada como controle positivo) induziu aumento na produção de ROS apenas em macrófagos infectados, uma vez que em macrófagos não infectados não houve diferença significativa quando comparado ao seu controle negativo. Esses dados reforçam que uma das principais alterações provocadas pelo tratamento com o composto DQ3 em *L. amazonensis* é a indução do estresse oxidativo, tanto em formas promastigotas quanto em macrófagos infectados com amastigotas.

Os resultados obtidos pela análise da morfologia de formas promastigotas após os tratamentos (que indicaram corpos arredondados e redução do volume celular), juntamente com o aumento da produção de ROS e perda do  $\Delta\Psi_m$ , sugerem que o composto possa induzir apoptose-like em promastigotas de *L. amazonensis* (RODRIGUES; SEABRA; SOUZA, 2006; LÜDER et al., 2010; GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012). Diante desses resultados, foram pesquisados por mais alterações que sugerissem a ocorrência de apoptose-like. Então, avaliou-se a externalização da fosfatidilserina da membrana plasmática da célula, que é um fenômeno precoce no processo apoptótico, apesar da controvérsia sobre a ocorrência ou não da externalização de fosfatidilserina da membrana plasmática em tripanosomatídeos (VERMES et al., 1995; VAN ZANDBERGEN et al., 2006; WANDERLEY; BARCINSKI, 2010). Utilizou-se a marcação com anexina V, conjugada a um fluorocromo (FITC), visto anexina apresentar afinidade por fosfolipídios dependente de cálcio, ligando preferencialmente a fosfatidilserina. Os dois folhetos que formam a membrana plasmática de uma célula viva possuem composição bastante diferente, sendo que a maior parte da fosfatidilcolina e esfingomiélin se encontra na face externa, enquanto que a maior parte da fosfatidiletanolamina e praticamente todos os lipídios aniônicos da fosfatidilserina e ácido fosfátídico estão localizados na face interna da membrana. Quando uma célula entra em processo de apoptose, ela produz um sinal específico que permitirá seu reconhecimento, e conseqüentemente isso impulsiona os fagócitos a internalizar essas células. Assim, a translocação da fosfatidilserina da face interna para a externa da membrana celular, funciona como uma “etiqueta” para tal reconhecimento (DEMCHENKO, 2013; BRITTA et al., 2014).

Os resultados da avaliação da externalização da fosfatidilserina em promastigotas mostraram que ocorreu um aumento significativo de células com este fosfolipídio exposto, entretanto este fato foi observado apenas no tratamento com o composto DQ3 na maior concentração (86  $\mu\text{M}$ ). Pode-se observar também, que no grupo do controle negativo, uma pequena população de células (6,80%) foi positiva para anexina, isto é, a fosfatidilserina foi exposta mesmo não havendo tratamento. Isso pode ocorrer devido ao fato de que promastigotas em fase estacionária de crescimento expõem fosfatidilserina em sua superfície, e apesar de terem sido utilizados no experimento promastigotas em fase logarítmica de crescimento, sabe-

se que a população pode apresentar-se de modo heterogêneo, com uma subpopulação em fase estacionária. Alguns autores relatam que essa exposição em promastigotas estacionários seria resultado de células apoptóticas, destinadas a morrer (VAN ZANDBERGEN et al., 2006; WANDERLEY et al., 2009).

Também foi avaliado se o composto poderia interferir no ciclo celular do parasito. Os ensaios foram realizados com PI, que se liga aos ácidos nucleicos, resultando em uma emissão de fluorescência proporcional ao conteúdo de DNA da célula. No ciclo celular ocorre a duplicação do conteúdo de DNA nos cromossomos e segregação das cópias dentro das células-filhas geneticamente idênticas, e em eucarióticos é dividido em G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M. As células em G<sub>1</sub> ainda não tiveram seus cromossomos duplicados, e apresentam-se com uma quantidade de 1x DNA, enquanto que as células em G<sub>2</sub>/M, têm o dobro da quantidade de DNA, pois já foi duplicado (2x DNA), e emitem então uma intensidade de fluorescência maior. As células na fase S estão sintetizando DNA, e por isso apresentarão um sinal de fluorescência entre G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>/M. Quando as células entram em processo de apoptose, são gerados fragmentos de DNA de baixo peso molecular, e a intensidade de fluorescência emitida é menor do que as das células em G<sub>1</sub>. São identificadas no histograma em uma região denominada de sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, apresentando o conteúdo de DNA hipoplóide (RIBEIRO, 2011; HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). Diante do exposto e dos resultados obtidos, verificou-se que apenas o tratamento com o composto DQ3 na concentração de 86 µM provocou um aumento significativo na população de células na fase sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, isto é, células em processo de apoptose-like. Corroborando com estes resultados, análise de ultraestrutura pela MET mostra que o núcleo dos promastigotas de *L. amazonensis* tratados com este composto apresenta características apoptóticas, com a cromatina condensada e marginalizada, além de ruptura da membrana nuclear. Desta forma, este conjunto de dados corrobora com os resultados anteriores, reforçando que o tratamento com o composto DQ3, em promastigotas de *L. amazonensis*, induz diferentes alterações associadas a morte por apoptose-like.

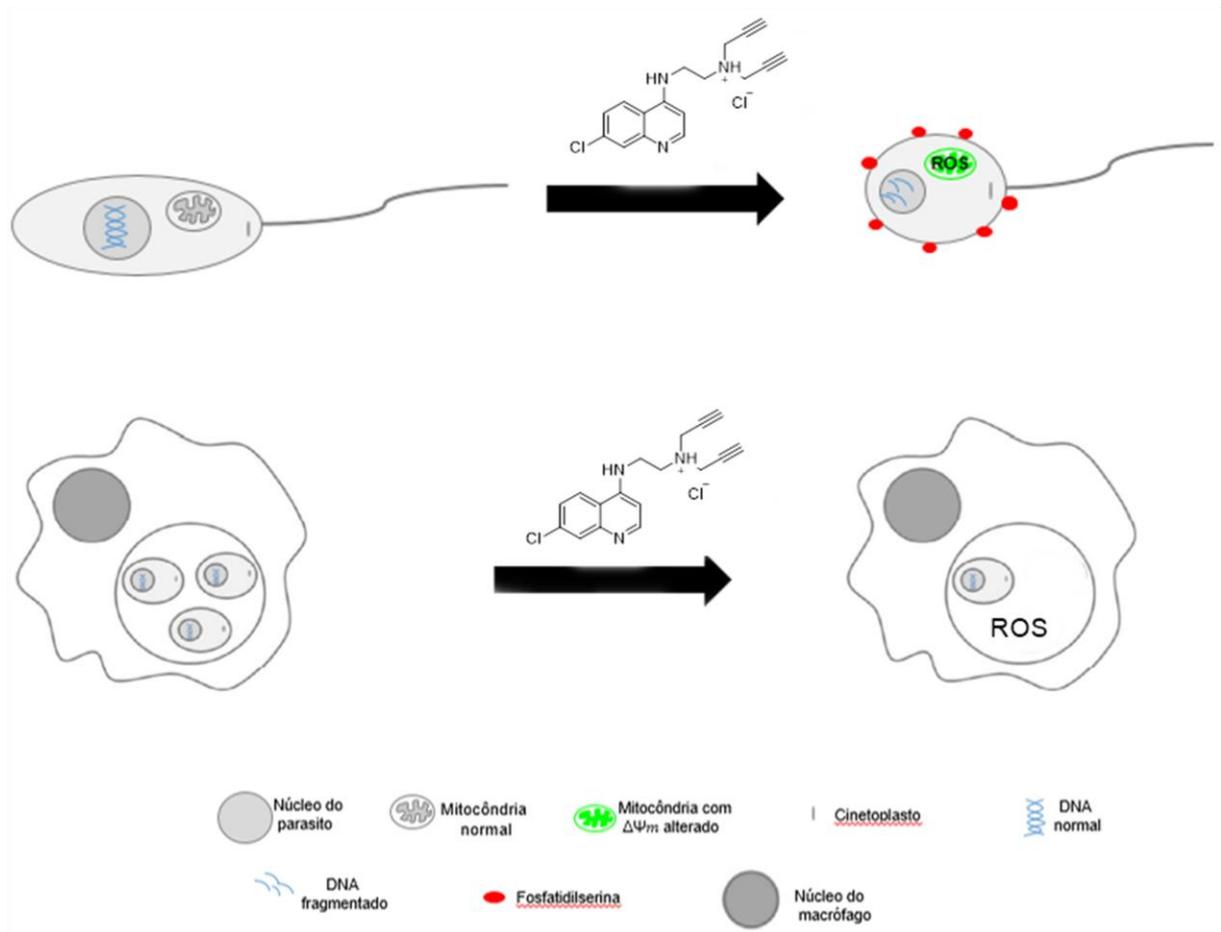
O próximo alvo avaliado foi a membrana plasmática do parasito. No intuito de verificar se o composto DQ3 iria interferir na integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*, utilizou-se a marcação com PI, visto que este marcador é impermeável a membrana, exceto em caso de ruptura da mesma. A

ocorrência de ruptura na membrana plasmática tem sido considerada como indicativo de morte por necrose (SCARIOT et al., 2017). Verificou-se que não ocorreu diferença nas intensidades de fluorescência do PI entre o grupo controle negativo e dos tratamentos com o composto DQ3 nas concentrações de 43 e 86  $\mu\text{M}$ , tanto na fluorimetria quanto na citometria. Também, avaliação pela MET mostra que a membrana plasmática dos parasitos manteve-se íntegra. Estes dados permitem afirmar que este composto não afeta a integridade da membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis*, excluindo a morte por necrose.

Este trabalho avaliou também a ocorrência de autofagia, por meio da marcação de vacúolos autofágicos com MDC. A autofagia foi descrita inicialmente como um mecanismo de sobrevivência em resposta ao estresse, no entanto, caso as condições do meio em que essas células se encontram não melhorarem, pode ocorrer morte por autofagia. A principal característica nesta morte celular é a formação de vacúolos autofágicos (GANNAVARAM; DEBRABANT, 2012; APARECIDA BRITTA et al., 2014). O resultado obtido nesta avaliação mostrou que o tratamento com o composto DQ3, em ambas concentrações testadas, não induziu a formação de vacúolos autofágicos, apresentando um percentual menor de células positivas para MDC quando comparado ao controle negativo. Desta forma, esse resultado sugere que o tratamento com o composto DQ3 não induz morte por autofagia, pelo contrário, inibe este processo. A autofagia é um dos principais mecanismo de defesa contra o estresse oxidativo, onde irá ocorrer a remoção de proteínas e organelas danificadas, contribuindo para a proteção da células, impedindo-as de sofrer apoptose (SCHERZ-SHOUVA; ELAZAR, 2007). Visto o composto DQ3 inibir autofagia ao mesmo tempo em que está ocorrendo estresse oxidativo, nossa hipótese é de que o composto pode estar atuando na aceleração da morte celular, impedindo mecanismos autofágicos na remoção de organelas danificadas, intensificando os danos provocados pelo tratamento, e contribuindo para o aumento da morte de células.

Diante de todos os resultados expostos, na Figura 22 foi proposto um mecanismo de morte para composto DQ3. Verifica-se que o tratamento dos promastigotas de *L. amazonensis* com o composto DQ3 induziu várias alterações que ocorrem em organismos em processo de morte por apoptose, entretanto, foi descartada a indução de morte por autofagia e necrose. Em amastigotas

intracelulares, foi evidente a redução da carga parasitária associada ao estresse oxidativo dos macrófagos infectados por *L. amazonensis*.



**Figura 22: Mecanismo de morte proposto para o composto DQ3 em formas promastigotas, e alterações provocadas em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.** Em promastigotas, o composto DQ3 atua na mitocôndria do parasito, causando alteração de potencial de membrana mitocondrial e aumento da produção do ROS. Além disso, causa alterações morfológicas (corpos arredondados e redução do volume celular), exposição de fosfatidilserina e alterações no ciclo celular do parasito. Já em amastigotas, é evidente que o composto reduz a carga parasitária e aumenta a produção de ROS em macrófagos infectados por *L. amazonensis*.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho comprova o efeito seletivo e antileishmanial de derivados de quinolinas. O composto mais efetivo, DQ3 induziu alterações ultraestruturais e bioquímicas em promastigotas de *L. amazonensis* compatíveis com morte por apoptose-like, tais como alterações do potencial de membrana mitocondrial, aumentos nos níveis de ROS, fragmentação de DNA e externalização de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática. Entretanto, não houve alterações na permeabilidade da membrana plasmática ou aumento do número de vacúolos autofágicos, excluindo morte por necrose ou autofagia. O tratamento dos macrófagos infectados, por *L. amazonensis*, com o composto DQ3 induziu aumento na produção de ROS e alterações morfológicas nos amastigotas intracelulares. Os resultados aqui apresentados abrem perspectivas para futuros ensaios *in vivo* em modelo murino experimental.

## 7 REFERÊNCIAS

- ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I.R.S.; PAIS, J.A.R.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013.
- AKHOUNDI, M.; KUHL, K.; CANNET, A.; VOTÝPKA, J.; MARTY, P.; DELAUNAY, P.; SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–40, 2016.
- ALAM, E.; ABBAS, O.; MOUKARBEL, R.; KHALIFEH, I. Cutaneous Leishmaniasis: An Overlooked Etiology of Midfacial Destructive Lesions. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, 2016.
- ALIANÇA, A. S. S. Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas do litoral nordestino sobre *Leishmania amazonensis*. 2012. p. 77. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M., WHO. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ANTINARELLI, L. M. R.; DIAS, R. M. P.; SOUZA, I. O.; LIMA, W. P.; GAMEIRO, J.; SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. 4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 704–714, 2015.
- ANTINARELLI, L. M. R.; SOUZA, I. O.; GLANZMANN, N.; ALMEIDA, A.; PORCINO, G.; VASCONCELOS, E.; SILVA, A.; COIMBRA, E. S. Aminoquinoline compounds: Effect of 7-chloro-4-quinolinyldrazone derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 171, p. 10–16, 2016.
- BAÑULS, A. L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in Parasitology**, v. 64, 2007.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JÚNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO A. J.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D. J. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 5, p. 536–546, 1991.
- BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: What has imaging taught us? **Cellular Microbiology**, v. 13, n. 11, p. 1659–1667, 2011.
- BOONSTRA, J.; POST, J. A. Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, v. 337, p. 1-13, 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 1. ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. **Guia de Vigilância em Saúde:** [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. – 1. ed. atual. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

BRINGMANN, G.; THOMALE, K.; BISCHOF, S.; SCHENEIDER, C.; SCHULTHEIS, M.; SCHWARS, T.; MOLL, H.; SCHURIGT, U. A novel *Leishmania major* amastigote assay in 96-well format for rapid drug screening and its use for discovery and evaluation of a new class of leishmanicidal quinolinium salts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3003–3011, 2013.

BRITTA, E. A.; SCARIOT, D. B.; FALZIROLLI, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, C. C.; FILHO, B. P. D.; BORSALI, R.; NAKAMURA, C. V. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 236, 2014.

BRUCHHAUS, I.; ROEDER, T.; RENNENBERG, A.; VOLKER, T. H. Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. **Trends in Parasitology**, v. 23, n.18, p. 376-383, 2007.

CARMO, A. M. L.; SILVA, F.; MACHADO, P.; FONTES, A.; PAVAN, F.; LEITE, S.; COIMBRA, E.; SILVA, A. Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum(II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 3, p. 204–209, 2011.

CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; MANZANO, J. I.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5344–5351, 2010.

CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; LÓPEZ-MARTÍN, C.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4204–4210, 2011.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 167, 2010.

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

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. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 3, p. 235-242, 2015.

CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 6, n. 7, p. 892–894, 2011.

CHEN, L.B.; SUMMERHAYES, I.C.; JOHNSON, L.V.; WALSH, M.L.; BERNAL, S.D.; LAMPIDIS, T.J. Probing mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Cold spring harbor symposia on quantitative biology**, v. 46, Pt 1, p. 141-155, 1982.

COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; DIAS, R. M. P.; CORRALES, R. C. N. R.; BISPO, M. L. F.; KAISER, C. R.; SOUZA, M. V. N. Amodiaquine analogs. Synthesis and anti-leishmanial activity. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 106–113, 2011.

COIMBRA, E. S.; ANTINARELLI, L. M. R.; SILVA, A. D.; BISPO, M. L. F.; KAISER, C. R.; SOUZA, M. V. N. 7-chloro-4-quinolinyl hydrazones: A promising and potent class of antileishmanial compounds. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 81, n. 5, p. 658–665, 2013.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v.197, n. 1, p. 40-45, 1993.

COSTA DUARTE, M.; LAGE L. M.; LAGE D. P.; MESQUITA, J. T.; SALLES, B. C.; LAVORATO, S. N.; MENEZES-SOUZA, D.; ROATT, B. M.; ALVES, R. J.; TAVARES, C. A.; TEMPONE, A. G.; COELHO, E. A. An effective in vitro and in vivo antileishmanial activity and mechanism of action of 8-hydroxyquinoline against *Leishmania* species causing visceral and tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, v. 217, p. 81–88, 2016.

COTTET-ROUSSELLE, C.; RONOT, X.; LEVERVE, X.; MAYOL, J. F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. **Cytometry Part A**, v. 79 A, n. 6, p. 405–425, 2011.

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

DEMCHENKO, A. P. Beyond annexin V: Fluorescence response of cellular membranes to apoptosis. **Cytotechnology**, v. 65, n. 2, p. 157–172, 2013.

DE VRIES, H. J.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v.16, n. 2, p. 99-109, 2015.

DUSZENKO, M., GINGER, M. L., BRENNAND, A., GUALDRÓN-LÓPEZ, M., COLOMBO, M. I., COOMBS, G. H., COPPENS, I., JAYABALASINGHAM, B.,

- LANGSLEY, G., DE CASTRO, S.L., MENNA-BARRETO, R., MOTTRAM, J. C., NAVARRO, M., RIGDEN, D. J., ROMANO, P. S., STOKA, V., TURK, B., MICHELS, P. A. M. Autophagy in protists. **Autophagy**, v. 7, p. 127–158, 2011.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.
- FEIJÓ, D.; TIBÚRCIO, R.; AMPUERO, M.; BRODSKYN, C.; TAVARES, N. Dendritic cells and *Leishmania* infection: Adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, p. 1-9, 2016.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011.
- FIEBIG, M.; KELLY, S.; GLUENZ, E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, n. 11, v. 10, ArticleID e1005186, 2015.
- FIGUEIREDO, A. B. *Leishmania amazonensis* prejudica resposta de células dendríticas via inibição da expressão de CD40 mediada por ectonucleotidases e pela ativação do receptor de adenosina A<sub>2B</sub>. 101f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)- Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012.
- FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J.D.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 8, p. 1505-1508, 2013.
- FORKINK, M.; SMEITINK, J. A.; BROCK, R.; WILLEMS, P. H.; KOOPMAN, W. J. Detection and manipulation of mitochondrial reactive oxygen species in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, 97:1034-1044, 2010.
- FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H.A.; SIQUEIRA-NETO, J.L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11–19, 2012.
- FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. G. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. **Biophysical Reviews**. n. 6, p. 119-132, 2014.
- GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. July, p. 1–9, 2012.
- GOMES, R. S.; SILVA, M. V. T.; SANTOS, J. C.; SILVA, L. L. L.; BATISTA, A. C.; MACHADO, J. R.; JOOSTEN, L. A. IL-32 $\gamma$  promotes the healing of murine cutaneous lesions caused by *Leishmania braziliensis* infection in contrast to *Leishmania amazonensis*. **Parasites & vectors**, v. 10, n. 1, p. 336, 2017.
- HASHIGUCHI, Y.; GOMEZ, E. L.; KATO, H.; MARTINI, L. R.; VELEZ, L. N.; UEZATO, H.I. Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. **Tropical medicine and health**, v. 44, n. 2, p. 1–9, 2016.

- HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90–97, 2013.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIET, A. R. APOPTOSIS: A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE- RANGING IMPLICATIONS IN TISSUE KINETICS. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- KIEFFER, C.; COHEN, A.; VERHAEGHE, P.; HUTTER, S.; CASTERA-DUCROS, C.; LAGET, M.; REMUSAT, V.; M'RABET, M. K.; RAULT, S.; RATHELOT, P.; AZAS, N.; VANELLE, P. Looking for new antileishmanial derivatives in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 92, p. 282–294, 2015.
- KUMAR, S.; BAWA, S.; GUPTA, H. Biological Activities of Quinoline Derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 14, p. 1648–1654, 2009.
- LAINSON, R.; SHAW, J.J.; SILVEIRA, F.T. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 4, p. 702-703, 1987.
- LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R.; NAKHASI, H.L. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death and Differentiation**, v. 9, n. 1, p. 53–64, 2002.
- LI, J.; ZHENG, Z. W.; NATARAJAN, G.; CHEN, Q. W.; CHEN, D. L.; CHEN, J. P. The first successful report of the in vitro life cycle of Chinese *Leishmania*: the in vitro conversion of *Leishmania* amastigotes has been raised to 94% by testing 216 culture medium compound. **Acta Parasitologica**, v. 62, n. 1, 2017.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2:83, 2012.
- LÜDER, C. G.; CAMPOS-SALINAS, J. C.; GONZALEZ-REY, E.; VAN ZANDBERGEN, G. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 116, 2010.
- MANSUETO, P.; SEIDITA, A.; VITALE, G.; CASCIO, A. Leishmaniasis in travelers: A literature review. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 12, n. 6, p. 563–581, 2014.
- 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. The Calpain Inhibitor MDL28170 Induces the Expression of Apoptotic Markers in *Leishmania amazonensis* Promastigotes. **Plos One**, 9 (1): e87659, 2014.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis : clinical syndromes and treatment (Sir William Osler Medicine Master Class). **The Quartely journal of medicine**, n. 107, p. 7–14, 2014.
- MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in

pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 614014, 2014.

MOREIRA, M.E.; DEL PORTILLO, H. A.; MILDER, R. V.; BALANCO, J. M.; BARCINSKI, M. A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of cellular physiology**, v. 167, n. 2, p. 305-313, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MUYLDER, G.; ANG, K.K.H.; CHEN, S.; ARKIN, M.R.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: Comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 7, 2011.

NWAKA, S.; RAMIREZ, B.; BRUN, R.; MAES, L.; DOUGLAS, F.; RIDLEY, R. Advancing drug innovation for Neglected Diseases- Criteria for lead Progression **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 8, p. 1–13, 2009.

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

OLIVEIRA, T. M. F. S.; VASCONCELOS, E. J. R.; NAKAGHI, A. C. H.; DEFINA, T. P. Q.; JUSI, M. M. G.; BALDANI, C. D.; CRUZ, K. C.; MACHADO, R. Z. A novel A2 allele found in *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal**, v. 20, n. 1, p. 42–48, 2011.

Organização Mundial de Saúde. **Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas: Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas**. OMS, 2012. (Catalogação na biblioteca da Organização Pan-Americana da Saúde - OPAS). Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro\\_relatorio\\_oms\\_doencas\\_tropicais.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro_relatorio_oms_doencas_tropicais.pdf)>. Acesso em 29 de março de 2017.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.

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. *In vitro* and *in vivo* activity of a palladacycle complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 6: e1626, 2012.

Portal da Saúde – Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/operacional/ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-visceral-lv>>. Acesso em: 28 de novembro de 2017.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; DE JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REAL, F.; MORTARA, R. A.; RABINOVITCH, M. Fusion between *Leishmania amazonensis* and *Leishmania major* parasitophorous vacuoles: live imaging of coinfecting macrophages. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 4, n. 12, e905, 2010.

REVEIZ, L.; MAIA-ELKHOURY, A. N.; NICHOLLS, R. S.; ROMERO, G. A.; YADON, Z. E. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 2013.

RIBEIRO, G. A. Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis*. 2011. 119f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

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. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 4, p. 789-799, 2013.

RODRIGUES, I. A.; MAZOTTO, A. M.; CARDOSO, V.; ALVES, R. L.; AMARAL, A. C.; SILVA, J. R.; PINHEIRO, A. S.; VERMELHO, A. B. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, Article ID 835910, 2015.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. In **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma** (pp. 1-42). Springer Netherlands.

RODRIGUES, J. C. F.; SEABRA, S. H.; SOUZA, W. DE. Apoptosis-like death in parasitic Protozoa. **Brazilian journal of morphological sciences**, v. 23, n. 1, p. 87–98, 2006.

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

SCARIOT, D. B.; BRITTA, E. A.; MOREIRA, A. L.; FALZIROLLI, H.; SILVA, C. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Induction of Early Autophagic Process on *Leishmania amazonensis* by Synergistic Effect of Miltefosine and Innovative Semi-synthetic Thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 255, p. 1–16, 2017.

SCHÖNIAN, G.; MAURICIO, I.; CUPOLILLO, E. Is it time to revise the nomenclature of *Leishmania*? **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 10, p. 466–469, 2010.

SENGUPTA, S.; CHOWDHURY, S.; BOSEDASGUPTA, S.; WRIGHT, C. W.; MAJUMDER, H. K. Cryptolepine-induced cell death of *Leishmania donovani* promastigotes is augmented by inhibition of autophagy. **Molecular Biology International**, 2011:187850, 2011.

- SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 9, p. 422–427, 2007.
- SMIRLIS, D.; DUSZENKO, M.; RUIZ, A. J.; SCOULICA, E.; BASTIEN, P.; FASEL, N.; SOTERIADOU, K. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.
- SOARES, V. B.; DE ALMEIDA, A. S.; SABROZA, P. C.; VARGAS, W. P. Vigilância epidemiológica da leishmaniose tegumentar: análise territorial local. **Revista de Saúde Pública**, v. 51, p. 1-11, 2017.
- SOLEIMANIFARD, S., ARJMAND, R., SABERI, S., SALEHI, M., HEJAZI, S. H. Treatment Outcome of the Drug-resistant Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis by Glucantime. **Advanced Biomedical Research**, v. 1, p. 6:17, 2017.
- SRIVASTAVA, S.; SHANKAR, P.; MISHRA, J.; SINGH, S. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites & vectors**, v. 9, n. 1, p. 277, 2016.
- SRIVASTAVA, S.; MISHRA, J.; GUPTA, A. K.; SINGH, A.; SHANKAR, P.; SINGH, S. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 49, 2017.
- STEVERDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, n. 10, v. 82, 2017.
- STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, 2013.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, 2013.
- TAGOE D N A, KALEJAIYE T D, KONING, H. P. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 185, 2015.
- TASLIMI, Y.; ZAHEDIFARD, F.; RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, p. 1–11, 2016.
- TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.
- TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; ALONSO, A.; NAKAMURA, C.V. Cell death in amastigote forms of *Leishmania amazonensis* induced by parthenolide. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 1-12, 2014.
- TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 7, p. 696–707, 2013.
- TRIPATHI, A.; GUPTA, C. M. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 128, n. 1, p. 1–9, 2003.
- VAKIL, N. H.; FUJINAMI, N.; SHAH, P. J. Pharmacotherapy for leishmaniasis in the

United States: Focus on miltefosine. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 5, p. 536–545, 2015.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MÜLLER, A.; HÖLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 37, p. 13837–13842, 2006.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 15, n. 2, p. 135–47, 2014.

VERMEERSCH, M.; DA LUZ, R. I.; TOTÉ, K.; TIMMERMANS, J. P.; COS, P.; MAES, L. *In vitro* susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3855–3859, 2009.

VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H., REUTELLINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, 1995.

VIEIRA DE MORAIS, C. G.; CASTRO LIMA, A. K.; TERRA, R.; DOS SANTOS, R. F.; DA-SILVA, S. A. G.; DUTRA, P. M. L. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 324915, 2015.

VOLPINI, Â. C.; PASSOS, V. M.; OLIVEIRA, G. C.; ROMANHA, A. J. PCR-RFLP to identify *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 90, n. 1, p. 31–37, 2004.

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, 2015.

WANDERLEY, J. L.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M. E.; BARCINSKI, M. A. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 6, p. 807–812, 2005.

WANDERLEY, J. L.; PINTO DA SILVA, L. H.; DEOLINDO, P.; SOONG, L.; BORGES, V. M.; PRATES, D. B.; SOUZA, A. P. A.; BARRAL, A.; BALANCO, J. M. F.; NASCIMENTO, M. T. C.; SARAIVA, E. M.; BARCINSKI, M. A. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. **PLoS One** 4: e5733, 2009.

WANDERLEY, J. L.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the Leishmania connection. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.67, n. 10, p. 1653–1659, 2010.

WHO 2010. Technical Report Series, 949. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)> Acesso em: 04 de abril de 2017.

WHO 2012. Technical Report Series, **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO\\_TRS\\_975\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf)> Acesso em: 29 de março de 2017.

WHO, 2016. **Leishmaniasis**. World Health Org Fact Sheet. 2016;375. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em: 29 de Março de 2017.

WHO, 2017. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em: 20 de dezembro de 2017.

WU, Y.; EL FAKHRY, Y.; SERENO, D.; TAMAR, S.; PAPADOPOULOU, B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 110, n. 2, p. 345-357, 2000.

YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; DE DONCKER, S.; DUJARDIN, J. C.; KOIRALA, S.; RIJAL, S.; CHAPPUIS, F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.73, n. 2, p. 272-275, 2005.

YIN, J.; YE, A. J. J.; TAN, K. S. W. Autophagy is involved in starvation response and cell death in Blastocystis. **Microbiology**, v. 156, n. 3, p. 665–677, 2010.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J. C.; FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell death and differentiation**, v. 9, p. 1126–1139, 2002.

ZONG, W.; THOMPSON, C. B. Necrotic death as a cell fate. **Genes and Development**, v. 20, p. 1–15, 2006.

ZUBEN, A. P. B. V.; DONALÍSIO, M. R. Dificuldades na execução das diretrizes do Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral em grandes municípios brasileiros. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 6, 2016.

## APÊNDICE A: “*In vitro* activity and death mechanism of quinoline derivatives in *Leishmania* spp.” (Artigo submetido)

### Manuscript Details

<b>Manuscript number</b>	ACTROP_2018_150
<b>Title</b>	In vitro activity and death mechanism of quinoline derivatives in <i>Leishmania</i> spp.
<b>Article type</b>	Research Paper

#### Abstract

Leishmaniasis are infectious diseases, caused by the protozoa of the *Leishmania* genus. The drugs used to treat these diseases present high toxicity, need long-term administration, many adverse effects, are expensive and resistant parasites have been identified. In this work, the antileishmanial activity of quinoline derivatives (QD), as well as the toxicity on mammalian cells and the mechanism of action of the most promising compound were evaluated. Among the compound tested, serendipitously only the compound QD3 showed activity against promastigotes and amastigotes of *Leishmania* spp., being more active against the intracellular amastigotes of *L. amazonensis* (IC<sub>50</sub> of 5.48 μM). This value is very close to the observed with miltefosine (IC<sub>50</sub> of 4.05 μM), used as control drug. Furthermore, the compound QD3 exhibited a selective effect, being 40.35 times more toxic to the amastigote form than to the host cell. Additionally, promastigotes of *L. amazonensis* treated with this compound exhibited characteristic of cells in the process of apoptosis such as mitochondrial membrane depolarization, mitochondrial swelling, increase of ROS production, phosphatidylserine externalization, reduced and rounded shape, and cell cycle alteration. The permeability of the plasma membrane remained unaltered, excluding necrosis in treated promastigotes. The compound QD3 inhibited the formation of autophagic vacuoles, which may contribute to parasite death, by preventing autophagic mechanisms in the removal of damaged organelles, intensifying the damage caused by the treatment, highlighting the antileishmanial effect of this compound. In addition, treatment with QD3 induced increase ROS levels in *L. amazonensis*-infected macrophages, but not in uninfected host cell. These data reinforce that the induction of oxidative stress is one of the main toxic effect caused by the treatment with the compound QD3 in *L. amazonensis*, causing irreversible damage, triggering a selective death of intracellular parasites. Data shown here confirm the biological activity of quinoline derivatives and encourage future *in vivo* studies with this compound in the murine model.

<b>Keywords</b>	Antileishmanial activity; quinolines; <i>Leishmania amazonensis</i> ; apoptosis-like; mitochondria dysfunction.
<b>Corresponding Author</b>	Elaine Coimbra
<b>Corresponding Author's Institution</b>	FEDERAL UNIVERSITY OF JUIZ DE FORA
<b>Order of Authors</b>	Stephane Calixto, Nicolas Glanzmann, Michele Silveira, Juliana Granato, Kezia Scopel, Thiago Aguiar, Renato DaMatta, Gilson Macedo, Adilson Da Silva, Elaine Coimbra
<b>Suggested reviewers</b>	Christian BORIES, Wanderley De Souza, Elvira Maria Saraiva

## **APÊNDICE B: Trabalhos indiretos**

MENDONÇA, D. V. C.; LAGE, D. P.; CALIXTO, S. L.; OTTONI, F. M.; TAVARES, G. D. S. V.; LUDOLF, F.; ALVES, R. J. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and its mechanism of action against *L. amazonensis* species. **Parasitology research**, 1-13, 2017.

FACCHINETTI, V.; SOUZA, M. V.; NERY, A. C.; CALIXTO, S. L.; GRANATO, J. T.; COIMBRA, E. S.; LOURENCO, M. C.; GOMES, C. R.; VASCONCELOS, T. R. Synthetic aspects and first-time assesment of 2-amino-1,3-selenazoles aganist *Mycobacterium tuberculosis*. **Letters in Drug Design & Discovery**, 2018.

## ANEXO A: Certificados CEUA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº. 013/2015 – CEUA sobre “AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DE COMPOSTOS SINTÉTICOS OU NATURAIS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C, REFERENTES AOS LOTES 2016, 2017 E 2018” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO e LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 84 camundongos da linhagem BALB/c (84 fêmeas) de 4 a 6 semanas de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/09/2016 a 31/12/2018.

### CERTIFICATE

We certify that the protocol no. 013/2015 - CEUA about “Avaliação da citotoxicidade in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO and LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. For the development of this research 84 mice of lineage BALB/c (84 females) of 4 to 6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 01/09/2016 to 31/12/2018.

Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo nº. 012/2015 – CEUA sobre “Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania* sp, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” projeto de pesquisa sob a responsabilidade de ELAINE SOARES COIMBRA com a colaboração de PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO e LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 12/07/2016. Salientamos, porém, ser necessário o Parecer da Comissão de Biossegurança para experimentos com patógenos in vitro. Para o desenvolvimento da pesquisa serão liberados 336 camundongos da linhagem BALB/c (336 fêmeas) de 4 a 6 semanas de idade conforme solicitado e que serão utilizados no período de 01/09/2016 a 31/12/2018.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol no. 012/2015 - CEUA about “Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de compostos sintéticos ou naturais em macrófagos infectados com *Leishmania* sp, referentes aos lotes 2016, 2017 e 2018” under responsibility of Elaine Soares Coimbra and collaboration of PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO and LUCIANA MARIA RIBEIRO ANTINARELLI - is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL HANDLING (CEUA) in 12/07/2016. We stress, however, may require the Opinion of the biosecurity Commission for experiments with pathogens in vitro. For the development of this research 336 mice of lineage BALB/c (336 females) of 4 to 6 weeks of age, will be delivered as requested in the period of 01/09/2016 to 31/12/2018.

**Juiz de Fora, 13 de Julho de 2016**

Coordenadora  
CEUA

Vice-coordenadora  
CEUA