

FLÁVIA CORRÊA MAIA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE
ADUTOS DO LAPACHOL SOBRE *Leishmania amazonensis***

**RECIFE
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

Flávia Corrêa Maia

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE
ADUTOS DO LAPACHOL SOBRE *Leishmania amazonensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Ciência Veterinária, na área de Clínica Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Co-orientador: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior

**Recife
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE
ADUTOS DO LAPACHOL SOBRE *Leishmania amazonensis***

Tese de Doutorado elaborada por:

FLÁVIA CORRÊA MAIA

Aprovada em 11/06/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. ANA LÚCIA FIGUEIREDO PORTO
Presidente - Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Prof. Dr. VALDEMIRO AMARO DA SILVA JÚNIOR
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Dr^ª. ANDREZZA RAPOSO BORGES
Departamento de Bioquímica/ UFPE

Dr. ROMERO MARCOS PEDROSA BRANDÃO COSTA
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal/UFRPE

Dr^ª. CYNARHA DAYSY CARDOSO DA SILVA
Departamento de Microbiologia/CpQAM/FIOCRUZ

Aos meus filhos e marido, ao meu pai e minha mãe (*in memorian*), meu avô paterno (*in memorian*) e avó paterna, aos meus avós maternos (*in memorian*), irmãos e Suely, por estarem presentes (seja de corpo ou de alma), nos momentos mais difíceis da minha vida, me trazendo força e alegria de viver.

DEDICO

AGRADEÇO

À Deus, ou como queiram chamar, o que importa não é a sua denominação e sim, sua existência, a qual eu acredito e sei que, através da Fé, conseguimos vencer dificuldades com maior tranquilidade e harmonia;

Ao meu marido João Agripino de Vasconcelos Maia Filho, que é meu companheiro, que tanto amo e me ajudou a crescer e lutar pelos meus sonhos, sempre presente e com carinho, amor e paciência, me ajudou em todas as minhas conquistas profissionais;

À minha mãe Maria Margarida Corrêa da Silva Maia “*in memoriam*”, que sempre foi uma mulher e uma mãe exemplar e admirável para mim, independente dos erros que possa ter cometido, mesmo ela tendo desistido da vida;

Ao meu pai Paulo Roberto Maia, que sempre foi meu ídolo e meu porto seguro e à minha madrastra Laura Ceragioli Maia, por me acolher nos momentos de angústia;

Aos meus filhos que amo muito e que conseguiram fazer de mim uma pessoa mais feliz, completa e realizada;

Ao meu irmão Alexandre Corrêa Maia e esposa, por serem pessoas tão queridas e mesmo longe, foram capazes de me dar momentos de alegria e conforto nos momentos difíceis de construção dessa tese;

À minha irmã Renata Corrêa Maia, que me ajudou e me guiou em momentos que precisei de um conselho, uma palavra amiga, e apesar de meu jeito nem sempre muito amoroso, ela sempre me recebeu de braços abertos e com muito amor;

À minha orientadora Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto por ter me dado mais essa oportunidade ;

Ao meu coorientador Valdemiro Amaro da Silva Júnior, por ter tido paciência comigo e acreditado em mim;

À minha coorientadora Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo por ter me acolhido de braços abertos e me apoiado mesmo com todas as dificuldades e contratempos nesse período de construção deste trabalho, jamais esquecerei esse apoio e tenho certeza que a Doutora Regina foi imprescindível para que eu conseguisse finalizar essa tese;

Ao Professor Celso de Amorim Câmara e a Professora Tania Maria Sarmiento da Silva, do Departamento de Ciências Moleculares e toda sua equipe, principalmente Cibele Cabral David, que foi muito atenciosa comigo;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela ajuda financeira para a realização desta tese;

À minha amiga, que faz papel não só de amiga, mas de irmã, mãe, psicóloga, enfim, Suely Santos Bezerra, que teve muita paciência comigo, me acolheu de forma muito especial, amiga esta que é eterna, e a sua família, que me deram todo apoio para que eu pudesse concluir este trabalho com êxito;

Ao Flávio de Oliveira Silva, pelo grande amigo e companheiro de trabalho, que me ajudou e me socorreu em minhas dúvidas e dificuldades;

Aos meus amigos recentes, porém eternos, Keicyane, Mary Aranda, Karla, Divar, Jana, Andrezza, Taciana, Larissa, Cynarha, Neyla, Moana, Jéssica, Ana Carla, enfim, todos do Laboratório de Biologia celular e Microbiologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, através dos quais, tive a oportunidade de conhecer e trabalhar junto, podendo adquirir novos conhecimentos e novas amizades, assim como momentos de alegria e solidariedade. Pra mim, um grupo que ficará para sempre no meu coração;

Aos meus amigos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Moacir Andrade, Lilian Sabrina Silvestre, Grazyelle Aleixo, Ana Luisa Neves Guimarães, Tássia Pessoa, Sabrina Gurjão, Ana Karina Mota, que mesmo não estando em alguns momentos tão próximos, sempre que precisei me acolheram, me ouviram e tiveram paciência com meus momentos de fraqueza, meus sinceros agradecimentos;

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

As Leishmanioses, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, são doenças infecciosas de grande importância na Saúde Pública. A terapia atualmente utilizada para essas doenças baseia-se em antimoniais pentavalentes, no entanto, tais fármacos apresentam diversos efeitos colaterais. Naftoquinonas são compostos que estão presentes em diversas plantas, e são bastante estudados pela sua grande variedade de atividades biológicas demonstradas *in vitro* e *in vivo*. Dentre as naftoquinonas, lapachol e seus derivados têm demonstrado ação Leishmanicida, antitumoral, tripanocida e outras. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a ação Leishmanicida *in vitro* de cinco naftoquinonas sintéticas derivadas do lapachol *in vitro*, em formas promastigotas de *leishmania amazonensis*, bem como, a sua ação citotóxica dessas, sobre macrófagos murinos da Linhagem J774 e macrófagos peritoneais de camundongos. por dois métodos quantitativos diferentes. Para tal, utilizou-se a contagem direta em câmara de Neubauer e o teste de citotoxicidade através da quantificação de moléculas de ATP, por luminescência. Alterações ultraestruturais das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com as naftoquinonas testadas foram avaliados através da Microscopia eletrônica de transmissão. As cinco naftoquinonas sintéticas demonstraram ação leishmanicida sendo a naftoquinona 31 ($C_{34}H_{35}N_2O_2$), a que demonstrou melhor atividade ($IC_{50}=23,37 \mu g/mL$) porém, apresentou alta toxicidade tanto para macrófagos peritoneais, quanto para macrófagos murinos J774. As naftoquinonas 15 ($C_{32}H_{32}N_2O_3$) e 16 ($C_{33}H_{34}N_2O_3$) apresentaram uma menor ação leishmanicida, com IC_{50} de 26,64 e 27,15 $\mu g/mL$ respectivamente porém, mostraram-se menos tóxicas para os macrófagos, obtendo um melhor índice de seletividade. O tratamento com as naftoquinonas induziu alterações morfológicas compatíveis com a perda de viabilidade e morte celular, tais como desorganização geral da célula, intumescimento e desorganização da estrutura da mitocôndria e aparecimento de vacúolos com perfis de membrana. O presente estudo, concluiu que o método quantitativo de citotoxicidade por luminescência foi o mais sensível, além de reforçar a maior resistência de macrófagos peritoneais, frente as substâncias testes em comparação às células da linhagem J774. Também concluímos, a necessidade de novos estudos com essas naftoquinonas sintéticas, devido ao potencial das mesmas como drogas leishmanicidas pois, apesar da citotoxicidade em macrófagos, as naftoquinonas demonstraram ação Leishmanicida importante, possibilitando futuros estudos em formas amastigotas no intuito de se obter um melhor índice de seletividade.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; naftoquinonas sintéticas; Lapachol; citotoxicidade; macrófagos peritoneais

ABSTRACT

The *Leishmaniasis* caused by different species of *Leishmania* are infectious diseases that have great relevance for public health. The therapy currently used to treat those diseases is based on *pentavalent antimony*. However these drugs have presented several side effects. *Naphthoquinones* are compounds that can be found in several plants and that have been studied very much because of their high variety of biological activities demonstrated *in vitro* and *in vivo*. Among those *naphthoquinones*, lapachol and its derivatives have been presenting *leishmanicidal*, *antitumor*, *trypansomatida* and other actions. This study is aimed at evaluating the *in vitro leishmanicidal* action of five synthetic *naphthoquinones* derived from lapachol *in vitro* on promastigotes of *Leishmania amazonensis* as well as evaluating its cytotoxic action on J774 lineage murine macrophages and on mice's peritoneal macrophages using two different quantitative methods: direct counting in a Neubauer chamber and cytotoxicity test by counting ATP molecules by luminescence. Ultrastructured modifications of *Leishmania amazonensis* promastigotes treated using the *naphthoquinones* testadas were evaluated through Transmission Electronic Microscopie. The five synthetic *naphthoquinones* have presented *leishmanicidal* action, although the naphthoquinone 31 (C₃₄H₃₅N₂O₂), which showed the highest activity (IC₅₀ = 23.37 mg / ml) but showed high toxicity for both peritoneal macrophacrophages getting a better selectivity index. Treatment with quinones induced morphological changes consistent with loss of viability and cell death, such as a general disruption of cell swelling and disruption of mitochondrial structure and appearance of vacuoles with membrane profiles. This study concluded that the quantitative method cytotoxicity luminescence was the most sensitive, and strengthen the greater resistance of peritoneal macrophages in front substances tests compared to the J774 cell line. We also conclude, the need for further studies with these synthetic naphthoquinones, due to the same potential as antileishmanial drugs because although the cytotoxicity in macrophages, the naphthoquinones showed significant leishmanicidal action, enabling future studies in amastigotes in order to obtain a better index selectivity.

Keywords: *Leishmania amazonensis*; synthetic naphthoquinones; Lapachol; cytotoxicity; peritoneal macrophages

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Fêmea de flebotomíneo durante repasto sanguíneo.....	21
Figura 2:	Densidade de casos de leishmaniose cutânea por município, Brasil – 2003 e 2004.....	23
Figura 3:	Cães portadores de Leishmaniose provocada pela espécie <i>L. braziliensis</i>	25
Figura 4:	Cão portador de Leishmaniose	26
Figura 5:	Felino doméstico apresentando Leishmaniose Cutânea (<i>L. amazonensis</i>) no Mato Grosso do Sul, Brasil.....	26
Figura 6:	Leishmaniose em um gato infectado com <i>Leishmania amazonensis</i>	27
Figura 7:	Forma promastigota (A) e amastigota (B) dos parasitos causadores das Leishmanioses.....	32
Figura 8:	Desenho esquemático das formas promastigota e amastigota de <i>Leishmanias</i> sp.....	33
Figura 9:	Fagocitose da <i>Leishmania</i> sp por macrófagos.....	34
Figura 10:	Ciclo biológico da <i>Leishmanias</i> sp. nos hospedeiros invertebrado e mamíferos.....	36
Figura 11:	Principais grupos de quinonas.....	39
Figura 12:	Estrutura molecular do Lapachol, α -Lapachona e β -Lapachona.....	40
Figura 13:	Ipê roxo (Gênero: <i>Tabebuia</i> ; Família: <i>Bignoniaceae</i>).....	40
Figura 14:	Estrutura química das naftoquinonas sintéticas.....	45
Figura 15:	Comparação entre os grupos controles e controles com DMSO a 1% das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	51
Figura 16:	Comparação entre os grupos controles e controles com DMSO a 1% das formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> , de células da linhagem J774 e de macrófagos peritoneais.....	52
Figura 17:	Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em <i>Leishmania amazonensis</i> pelo método quantitativo direto.....	53
Figura 18:	Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em <i>Leishmania amazonensis</i> pelo método de luminescência.....	54

Figura 19:	Citotoxicidade das naftoquinonas sintéticas pelo método de luminescência em macrófagos murinos da linhagem J774.....	56
Figura 20:	Citotoxicidade das naftoquinonas sintéticas pelo método de luminescência em macrófagos peritoneais.....	57
Figura 21:	Forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> controle.....	60
Figura 22:	Formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com a IC ₅₀ de NAF 15.....	61
Figura 23:	Formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 2X a IC ₅₀ da NAF 15.....	62
Figura 24:	Formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> tratadas com 1X a IC ₅₀ das naftoquinonas 16 e 17 sobre promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Naftoquinonas sintéticas testadas.....	4
Tabela 2:	Atividade Leishmanicida e citotóxica em macrófagos J774 e índice de seletividade das naftoquinonas. Os valores foram calculados por regressão linear padrão) Todos os valores apresentam p<0,0001.....	5 9
Tabela 3:	Atividade Leishmanicida e citotóxica em macrófagos J774 e índice de seletividade das naftoquinonas sintéticas testadas. Os valores foram calculados por regressão linear (± desvio padrão). Todos os valores apresentam p<0,0001.....	5 9

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. ANOVA: Análise de Variância
2. ATP: Trifosfato de adenosina
3. IC₅₀: Inibição celular de 50% das células
4. CC₅₀: Concentração Citotóxica em 50% das células de mamíferos
5. CEUA: Comitê de Ética em Experimentação Animal
6. DMSO: Dimetilsulfóxido
7. DNA: Ácido Desoxirribonucléico
8. ELISA: *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*
9. FIOCRUZ: Fundação Oswaldo Cruz
10. HE Homodímero de Etídio
11. ISe: Índice de seletividade
12. kDNA: DNA mitocondrial
13. HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana
14. LC: Leishmaniose Cutânea
15. LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana
16. LV: Leishmaniose Visceral
17. LMC: Leishmaniose mucocutânea
18. LPG: Lipofosfoglicana
19. CanL: Leishmaniose Canina
20. IL-10: Interleucina 10
21. TGF: β : Fator de Crescimento Transformante
22. RIFI: Reação de Imunofluorescência Indireta
23. SFBI: Soro Fetal Bovino Inativado
24. NAF: Naftoquinona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	LEISHMANIOSES.....	21
2.1.1	Classificação das leishmanioses.....	22
2.1.2	Distribuição geográfica das leishmanioses.....	22
2.2	LEISHMANIOSES EM ANIMAIS.....	24
2.2.1	Leishmaniose canina.....	24
2.2.2	Leishmaniose em gatos.....	26
2.2.3	Leishmaniose em equinos.....	28
2.2.4	Prevenção.....	28
2.2.5	Diagnóstico.....	29
2.2.6	Tratamento.....	30
2.3	FORMAS PROMASTIGOTA E AMASTIGOTA DO PARASITA.....	32
2.4	CICLO DE VIDA DO PARASITA.....	35
2.5	BIOLOGIA CELULAR DOS PARASITAS.....	36
2.5.1	Mitocôndria e cinetoplasto.....	36
2.5.2	Microtúbulos sub-peliculares.....	37
2.5.3	Glicossomos.....	37
2.5.4	Megassomos.....	37
2.5.5	Acidocalcissomas.....	38
2.6	QUINONAS.....	38
2.6.1	Naftoquinonas.....	39
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1	NAFTOQUINONAS.....	44
3.2	CULTIVO DE PARASITAS.....	46
3.3	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM <i>Leishmania amazonensis</i>	46
3.3.1	Método quantitativo direto.....	46
3.3.2	Teste de luminescência.....	46
3.4	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	47
3.4.1	Macrófagos murinos da linhagem J774.....	47
3.4.2	Macrófagos peritoneais de murinos BALB/c.....	48
3.5	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	48
3.6	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> TRATADAS OU NÃO COM AS NAFTOQUINONAS.....	50 49
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4	RESULTADOS.....	51
4.1	VIABILIDADE CELULAR DOS GRUPOS CONTROLE NÃO TRATADO E CONTROLE COM DMSO A 1%.....	51
4.2	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM <i>Leishmania amazonensis</i>	52

4.2.1	Método quantitativo direto.....	52
4.2.2	Teste de luminescência.....	54
4.3	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE MAMÍFERO.....	55
4.3.1	Macrófagos murinos da linhagem J774.....	56
4.3.2	Macrófagos peritoneais de murinos BALB/c.....	57
4.4	ÍNDICE DE SELETIVIDADE.....	58
4.5	ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> TRATADAS OU NÃO COM AS	
4.5	NAFTOQUINONAS 15, 16 E 17.....	59
5	DISCUSSÃO.....	65
5.1	COMPARAÇÃO ENTRE CONTROLE E CONTROLE COM DMSO A 1%.....	65
5.2	ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS NAFTOQUINONAS SINTÉTICAS EM <i>Leishmania amazonensis</i>	66
5.3	COMPARAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA PELO TESTE DE CONTAGEM DIRETA EM CÂMARA DE NEUBAWER E O TESTE DE LUMINESCÊNCIA.....	68
5.4	AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania amazonensis</i> TRATADAS OU NÃO COM AS NAFTOQUINONAS.....	70
6	CONCLUSÕES.....	73
7	REFERÊNCIAS.....	75

As Leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem algumas espécies de mamíferos silvestres, animais domésticos e o homem. São doenças vetoriais, transmitidas pela picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas. Com grande repercussão na saúde pública, as Leishmanioses, afetam mais de 98 países, acarretando deformações severas nos animais, bem como em seres humanos, além de possuírem alto índice de mortalidade (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; GRAMICCIA, 2011).

As formas clínicas da doença podem ser manifestadas em mamíferos (silvestres e domésticos) e em humanos, sob diversas formas, sendo a cutânea (lesões de pele) e a visceral (afeta órgãos internos, principalmente baço, fígado e medula óssea) as mais comuns (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

A quimioterapia empregada no tratamento das Leishmanioses é baseada no uso de antimoniais pentavalentes, tais como, estibogluconato de sódio (Pentostan) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime). Tais fármacos apresentam diversos efeitos colaterais, além de ser necessário o acompanhamento médico intensivo dos pacientes em tratamento. Existem ainda, drogas de segunda linha para o tratamento destas doenças, a Pentamidina e a Anfotericina B (MONDAL et al., 2010).

O prolongado tempo de terapêutica associado aos efeitos colaterais graves e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento, entre outros fatores, tornam necessária a busca de novos compostos para o tratamento destas enfermidades. Além do mais, o comprometimento da eficácia do tratamento, devido aos casos de imunodepressão causada pela co-infecção com o vírus HIV, também são fatores que devem ser levados em consideração (RYBNIKER et al., 2010).

As Naftoquinonas são moléculas amplamente encontradas na natureza e suas propriedades farmacológicas vêm sendo estudada há décadas. Dentre elas, o lapachol merece destaque, pois tem se demonstrado como composto capaz de produzir diversos efeitos biológicos, tais como atividade antitumoral, antibiótica e leishmanicida (TEIXEIRA, et al 2001; SILVA et al, 2003). O lapachol pode ser encontrado principalmente no cerne de plantas e, em maior quantidade, nas plantas da família Bignoneaceas (SANTANA et al, 1968).

Devido ao potencial das naftoquinonas como agentes Leishmanicidas, além da importante necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das Leishmanioses, com menos efeitos colaterais, este estudo teve como objetivo a avaliação de testes de citotoxicidade com o uso de naftoquinonas sintéticas derivadas do Lapachol sobre o crescimento da *Leishmania*

amazonensis e sobre a viabilidade de macrófagos murinos da linhagem J774 e macrófagos peritoneais.

2.1 Leishmanioses

Leishmanioses são zoonoses, causadas por protozoários pertencentes à família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*, que acometem algumas espécies de mamíferos silvestres e domésticos, além do homem (GRAMICCIA, 2011).

Essas zoonoses são transmitidas por vetores, através da picada de insetos flebotomíneos infectados (Ordem Díptera; família Psychodidae; Sub-Família: Phlebotominae) (Figura 1), conhecidos popularmente por mosquito-palha, tatuquiras, birigui, entre outros. São encontrados preferencialmente em áreas de florestas, matas secundárias, sopé das serras, margens dos rios, cavernas, abrigos de pequenos roedores e de outros animais (DEANE, 1962). No entanto, no ambiente doméstico, podem ser encontrados no peridomicílio, em galinheiros, chiqueiros, canis e também no intradomicílio. Apesar da transmissão vetorial por flebotomíneos ser a mais importante na epidemiologia da leishmaniose, tem-se relatado outras vias de infecção. Carrapatos e pulgas têm sido estudados, experimentalmente, como possíveis transmissores da Leishmaniose Visceral. Já fora detectado por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) o DNA de *Leishmania* sp. em carrapatos após parasitarem cães infectados, sugerindo possível ação vetorial dos mesmos (COUTINHO et al., 2005; COUTINHO; LINARDI, 2007).

Figura 1: Fêmea de flebotomíneo durante repasto sanguíneo.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010).

2.1.1 Classificação das Leishmanioses

As Leishmanioses podem ser classificadas de acordo com suas características clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro em: **Leishmaniose Cutânea**, (também chamada de **Tegumentar ou Cutânea Localizada**), sendo a mais frequente, caracterizada por lesão única; **Leishmaniose mucocutânea** (LMC), caracterizada por feridas principalmente na região da boca e septo nasal, podendo ocasionar deformidades severas e a **Leishmaniose Visceral** (SANTOS et al, 2011; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Apresentações incomuns da Leishmaniose Cutânea (LC) podem ocorrer e incluem: **Leishmaniose Cutânea lupóide** da face, semelhante ao Lúpus Eritematoso; **Leishmaniose recidivantes**, no qual pequenos nódulos podem se desenvolver em torno de uma cicatriz curada; **Leishmaniose Mucosa** (LM), envolvendo as membranas mucosas e **Leishmaniose Cutânea Difusa** (LCD), que não é comum e geralmente se apresenta com amplos nódulos e placas que não ulceram e as lesões contém uma elevada carga parasitária. (DASSONI et al, 2012).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é uma zoonose primária de mamíferos silvestres (roedores, marsupiais, primatas, entre outros) e, secundariamente de animais domésticos. A transmissão pode ocorrer em um ambiente selvagem, relacionado com a exploração desordenada das florestas e de desmatamento, por razões profissionais ou de lazer. No ambiente rural ou peri-urbano, a transmissão está relacionada com o processo de migração, ocupação de encostas e aglomerados, associada com matas residuais ou secundárias. A LC é transmitida ao homem pela picada de flebotomíneos infectados principalmente pela *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonenses* (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES et al, 2011; CUNHA et al, 2006).

A Leishmaniose Visceral é causada por duas espécies de *Leishmania*, a *Leishmania donovani* (no Velho Mundo) e *Leishmania infantum* (sinônimo: *Leishmania chagasi*), tanto no Novo Mundo, quanto no Velho Mundo (BRASIL, 2003).

2.1.2 Distribuição geográfica das Leishmanioses

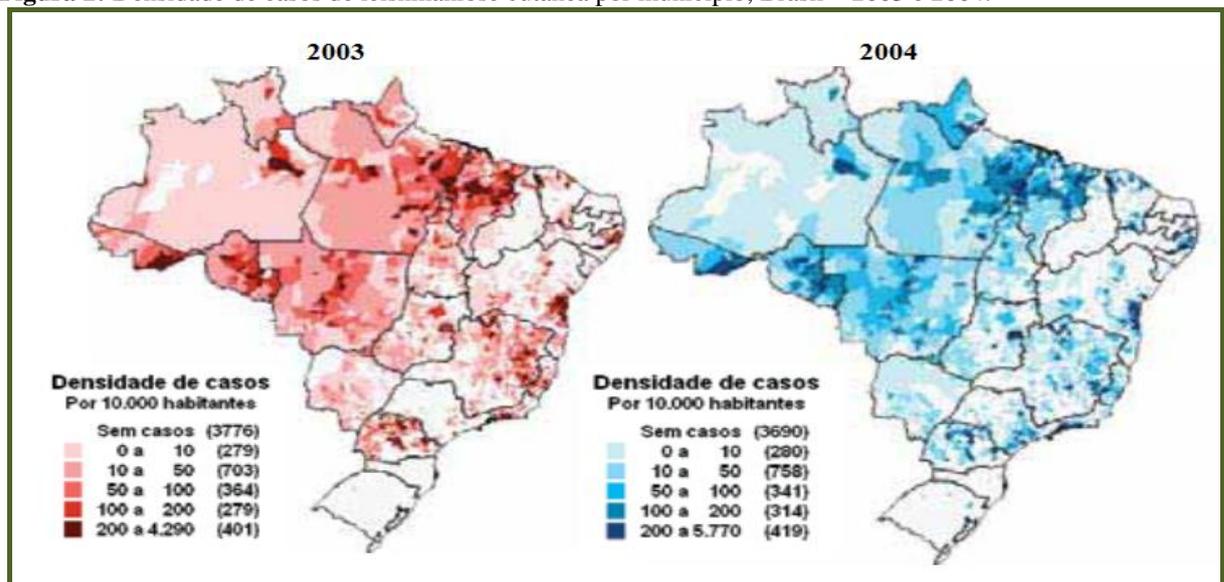
As Leishmanioses são consideradas endêmicas nos cinco continentes, estando presentes em 98 países. O gênero *Leishmania* (subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*), apresenta uma ampla distribuição geográfica, sendo encontrado nas Américas Central e do Sul, bem como em partes da Europa, África e Ásia (ALVAR et al., 2012).

Acredita-se que existam atualmente, mais de 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que 1 a 2 milhões de novos casos ocorram por ano, sendo 500.000 de Leishmaniose Visceral e 1.500.000 da Leishmaniose Tegumentar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010).

No Brasil, as Leishmanioses estão presentes em todos os estados brasileiros, e as formas predominantes são: cutânea e mucocutânea. Apesar da Leishmaniose Visceral apresentar-se em menor número, esta possui alta taxa de mortalidade. Na década de 80, a LC foi assinalada em 19 distritos federais, e verificou-se sua expansão geográfica quando, em 2003, foi confirmada em todos os estados brasileiros (Figura 2) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2010; TEIXEIRA et al, 2013).

No Estado de Pernambuco, as Leishmanioses estão presentes em todas as regiões, com predominância (mais de 60% dos casos humanos) na região correspondente à zona da Mata Atlântica, sendo a quase totalidade da forma cutânea localizada (BRANDÃO-FILHO et al, 1999).

Figura 2: Densidade de casos de leishmaniose cutânea por município, Brasil – 2003 e 2004.



Fonte: Modificado de MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010).

Dados estatísticos referentes ao ano de 2007, constataram 63 casos de Leishmaniose Visceral no Estado de Pernambuco, sendo 13 somente em Petrolina. Sete óbitos foram confirmados. Já em relação à Leishmaniose Cutânea, foram 430 casos aproximadamente, sendo, em sua maioria, nos municípios de Cabo de Sato Agostinho, Vitória, Escada e Moreno, porém, sem relato de óbitos (SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE DE PERNAMBUCO, 2014).

As Leishmanioses caninas são muito frequentes em várias regiões geográficas nos países da Bacia Mediterrânea e da América do Sul. Os cães são tidos como principal reservatório

doméstico e peridoméstico nas áreas endêmicas de Leishmaniose Visceral, porém essa zoonose também pode ser diagnosticada em países não endêmicos, que podem ser propagadas através de turistas e imigrantes que acompanham os seus cães ou através de cães importados de países endêmicos (OBSERVATÓRIO NACIONAL DAS LEISHMANIOSES, 2014).

2.2 Leishmanioses em animais

Diversos mamíferos são considerados reservatórios das Leishmanioses. Dentre eles, os roedores, os gambás, edentados, equinos e primatas (GRAMICCIA E GRADONI, 2005).

No entanto, os cães têm sido os principais animais descritos nos relatos de casos de Leishmanioses em animais e, mais recentemente os gatos e, em menor número, os eqüinos, como possíveis reservatórios importantes para o ciclo biológico das Leishmanioses (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006; MADEIRA et al, 2003; SOLANO-GALLEGO et al, 2007).

2.2.1 Leishmaniose Canina

Os cães são considerados, mundialmente como o principal reservatório das Leishmanioses, principalmente da *L. infantum*, no ciclo da Leishmaniose Visceral (NAVARRO et al, 2010; GRAMMICA e GRADONI, 2005). Diversas são as razões que levam vários pesquisadores a considerarem o cão como o principal reservatório da *L. infantum*, como por exemplo, por acreditarem que os cães podem permanecer infectados sem sinais clínicos por anos ou até pelo resto da vida (MORENO e ALVAR, 2002). Outra razão é pela intensa relação entre o cão e o homem e, pelo fato de, frequentemente o cão estar presente tanto dentro, como fora da casa do seu tutor, favorecendo a manutenção da transmissão da Leishmaniose. Além disso, acredita-se que os cães apresentam intenso parasitismo cutâneo de Leishmanias na forma amastigota, aumentando a probabilidade de transmissão da mesma (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006).

A Leishmaniose Canina (CanL), mais frequente é causada pela *Leishmania infantum*, mas os cães também podem apresentar Leishmaniose causada por outras espécies, como as responsáveis por Leishmaniose Cutânea e Mucocutânea, porém, para essas espécies de *Leishmania*, os cães parece não serem reservatórios significativos de infecção para pessoas (DANTAS-TORRES, 2007).

Alguns estudos afirmam que o controle através do extermínio de cães considerados infectados, não diminuem a incidência de Leishmaniose em humanos. Com isso, deve-se considerar a possibilidade de pessoas assintomáticas e gatos domésticos como possíveis reservatórios na transmissão das Leishmanioses (COSTA et al, 2002; MAIA e CAMPINO, 2011; DANTAS-TORRES, 2007; MAROLI et al, 2007).

Os sinais clínicos mais frequentes em cães com Leishmaniose Cutânea são: lesões de pele, localizadas principalmente em orelhas, mas também ocorrendo em nariz (Figura 3), boca, olhos, e muitas vezes, apresentam-se generalizadas. Na Leishmaniose Visceral, os sinais clínicos são bastante inespecíficos, dificultando um diagnóstico clínico preciso. Os cães podem apresentar desde onicogribose (Figura 4A) e caquexia (Figura 4B), que são sinais clínicos bem frequentes na Leishmaniose Visceral Canina, como também podem apresentar sinais menos comuns como: intolerância a exercício, linfonodomegalia, atrofia muscular, letargia, poliúria e polidipsia, lesões oculares, vômitos e diarreias, além das lesões de pele. Muitas vezes o animal pode apresentar perda de peso sem perda de apetite (HOFFMAN et al., 2012; SOLANO-GALLEGO et al., 2009; MADEIRA et al, 2003).

Figura 3: Cães portadores de Leishmaniose provocada pela espécie *L. braziliensis*



Legenda: Lesão de mucosa nasal (A), Lesão ulcero-crostosa em orelha (B), Lesões ulcerosas (C).

Fonte: Modificado de MADEIRA et al, 2003.

Figura 4: Cão portador de Leishmaniose.



Legenda: Cão apresentando onicogribose (A) e caquexia (B)

Fonte: <http://www.wspabrazil.org> (A); <http://www.anda.jor.br> (B).

2.2.2 Leishmaniose em gatos

O primeiro caso de Leishmaniose em gatos (*felis catus domesticus*) foi descrito em 1912, na Argélia, em um gato, com quatro meses de idade, que residia na mesma casa que um cão e uma criança portadores de Leishmaniose Visceral. A infecção por *L infantum* em gatos também tem sido descrita em diversos países como Espanha, Itália, França e Brasil (MARTÍN-SANCHEZ et al, 2007; SOLANO-GALLEGO et al, 2007; PENNISI, 2002; OZON et al, 1998).

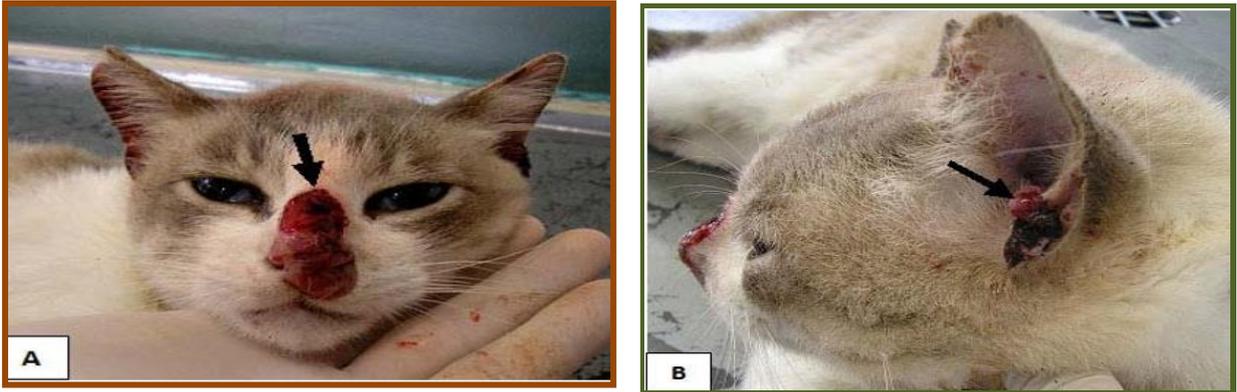
Mais recentemente, tem-se descrito diversos casos em gatos domésticos (Figuras 5 e 6), e se discutido o real papel destes, como possíveis reservatórios das Leishmanioses (MAIA e CAMPINO, 2011; MAIA et al, 2008; ROUGERON et al, 2011; MARTIN-SANCHEZ et al, 2007; COELHO et al, 2010; DUARTE et al, 2010; COSTA et al, 2010; DE SOUZA et al., 2005; SOUZA et al, 2009).

Figura 5: Felino doméstico apresentando Leishmaniose cutânea (*L. amazonensis*) no Mato Grosso do Sul, Brasil.



Fonte: Modificada de DE SOUZA (2005).

Figura 6: Leishmaniose em um gato infectado com *Leishmania amazonensis*.



Legenda: Felino apresentando lesão ulcerada no nariz (A) e nódulos na borda da orelha (B).
Fonte: Modificado de Souza (2009).

A transmissão da infecção por *L. infantum* através do rato preto e gatos domésticos, tem sido confirmada através de xenodiagnóstico, sugerindo que eles também podem representar um hospedeiro reservatório secundário da *L. infantum* (QUINNELL et al., 2009).

Costa e colaboradores (2010) relataram a ocorrência de Leishmaniose em gatos de área endêmica para Leishmaniose visceral. Coelho e colaboradores (2010) relataram um caso de *Leishmania infantum* em gato doméstico na cidade de Andradina, em São Paulo, Brasil. Rougeron e colaboradores (2011) relataram o primeiro caso de Leishmaniose Cutânea por *Leishmania braziliensis* em um gato doméstico, da Guiana Francesa.

Leishmaniose Cutânea é mais comum em gatos do que a Leishmaniose Visceral. Os sinais típicos são lesões nodulares ou ulcerativas em nariz, lábios, ouvidos e alopecias com características clínicas inespecíficas (GRAMICCIA, 2011).

Laruelle-Magallon e Toga, 1996, afirmam que na maioria dos casos, a leishmaniose em gatos apresenta-se como doença cutânea, sem envolvimento de vísceras. Raramente, é reportado algum caso da doença disseminada (OZON et al, 1998; POLI et al, 2002). Rüfenacht e colaboradores (2005) descrevem Leishmaniose em gato associado a pênfigo foliáceo e Grevot e colaboradores (2005), observaram Leishmaniose em gatos associado à carcinoma de células escamosas.

Em relação ao papel dos gatos no ciclo biológico da Leishmaniose Visceral, alguns autores sugerem que estes podem atuar como reservatórios secundários (GRAMICCIA;GRADONNI, 2005; SOLANO-GALLEGO et al, 2007).

2.2.3 Leishmaniose em equinos

Alguns casos de Leishmaniose também foram reportados em equinos (BONFANTE-GARRIDO et al, 1981; RAMOS-VARA et al, 1996). As formas clínicas nestes animais consistem em lesões cutâneas nodulares ou ulcerativas e raramente, disseminada, e sem comprometimento visceral. A regressão espontânea das lesões foi observada. (KOEHLER et al, 2002; GRAMICCIA e GRADONI, 2005; ROLÃO et al, 2005).

2.2.4 Prevenção

Atualmente, tem-se demonstrado que as medidas de prevenção assumem um papel muito importante no controle das Leishmanioses. Além de um controle direto, através de vacinas preventivas de cães, o uso de coleiras repelentes impregnadas com Deltametrina nos cães também tem demonstrado ser efetivo como coadjuvante para o controle das Leishmanioses. Deve-se ter em mente, que também é necessário um maior investimento em educação ambiental, saneamento básico, e controle da população de animais errantes (RIBEIRO et al., 2013; OTRANTO et al., 2013; SOLANO-GALLEGO et al., 2009). Otranto e colaboradores (2013) demonstraram a eficácia em cães que fizeram uso de coleiras impregnadas de 10% de Imidacloprida e 4,5% de flumetrina, em área endêmica para Leishmaniose Canina e como medida preventiva contra essa enfermidade, e a importância da mesma na redução de risco para a saúde dos cães e das pessoas (SOLANO-GALLEGO et al, 2001).

A escassez de recursos e a atual falta de infra-estrutura dos serviços de saúde, especialmente no que se concerne ao diagnóstico da infecção por *Leishmania infantum* tanto em cães como em humanos, tem demonstrado que as medidas de controle adotadas contra essas zoonoses são um desafio, favorecendo a perpetuação do ciclo vicioso entre pobreza e doença em muitos estados brasileiros, nos quais as Leishmanioses permanecem como mais uma doença negligenciada (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006).

2.2.5 Diagnóstico

O diagnóstico de Leishmaniose em animais deve ser feito baseando-se não só nos achados clínicos, mas também avaliando a origem do animal, juntamente com exame parasitológico, sorológico e/ou confirmação molecular através do PCR (RIBEIRO et al., 2013).

O método parasitológico baseia-se na observação direta do parasita na forma amastigota no material biológico coletado porém, este método pode ter baixa sensibilidade, dependendo do grau de parasitemia e do material coletado (ROSSI et al, 2007).

Os testes sorológicos são as principais ferramentas diagnósticas, principalmente quando se trata de diagnósticos para inquéritos epidemiológicos, por se tratarem de testes mais rápidos e menos invasivos, como a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o ELISA-teste. Porém, os testes sorológicos estão sujeitos a reações cruzadas com antígenos de *T. cruzi*, principalmente pela proximidade filogenética desses parasitas com as *Leishmanias*, além de reações cruzadas com outros agentes como Brucelose e Toxoplasmose. Além disso, deve-se lembrar que, os testes sorológicos positivos não significam doença, eles indicam infecção por Leishmaniose, que pode ser atual ou passada SOLANO-GALLEGO et al, 2001; ROSSI et al, 2007.

Os testes sorológicos conhecidos como testes rápidos, são testes imunocromatográficos, e tem sido utilizado recentemente como alternativa para a triagem clínica na pesquisa de Leishmaniose em animais. O teste rápido DPP (Dual Plath Platform), apresentou elevada sensibilidade no diagnóstico de cães sintomáticos, mas baixa sensibilidade em cães assintomáticos e oligossintomáticos (cães com apenas dois sinais clínicos, como feridas de pele e emagrecimento). Contudo, o teste rápido DPP ainda foi mais sensível do que o RIFI (ROSSI et al, 2007, SOLANO-GALLEGO et al, 2001; DE QUEIROZ JUNIOR, 2011; FONSECA, 2013).

O método molecular (PCR) baseia-se na detecção seletiva do DNA do parasita, utilizando-se amostras diversas porém, amostras de sangue periférico tem-se mostrado menos sensíveis do que amostras de pele, conjuntiva, medula óssea e aspirados de linfonodos. Apesar de ser um método bastante eficaz e sensível, tem como desvantagem o alto custo e necessidade de laboratórios equipados para a realização do mesmo (SOLANO-GALLEGO, et al, 2001).

Os elementos clínicos e epidemiológicos também contribuem substancialmente para o diagnóstico. Além dos métodos de rotina, existem os testes comerciais de imunocromatografia, que são fáceis de serem realizados e manipulados, bem como oferecem uma rápida resposta porém, há relatos de grande proporção de diagnósticos falso-positivos. (LUCIANO et al, 2008; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2014; ROSSI et al, 2007).

2.2.6 Tratamento

Várias drogas utilizadas no tratamento da Leishmaniose em cães, diminuem os sinais clínicos temporariamente ou cura clinicamente o animal, mas nenhum deles elimina a infecção. A droga de primeira escolha é o antimoniato de meglumine, um antimoniato pentavalente, que inibe seletivamente a glicólise leishmanial e o alopurinol, que interfere na síntese do RNA. Outra droga utilizada é a anfotericina B, que se liga ao ergosterol da membrana celular do parasita e altera sua permeabilidade porém é contra indicado para nefropatas, por sua grande ação nefrotóxica. Drogas de segunda escolha utilizadas sozinhas, ou em combinação, para o tratamento da CanL, são: pentamidina, mitelfosina e aminosidina, além do metronidazol com enrofloxacin (MIRÓ et al., 2008).

Existem diferentes tipos de tratamento para as Leishmanioses, sistêmico e localizado. O tipo sistêmico inclui antimoniais pentavalentes parenterais (intravenosos ou intramuscular) e agentes orais (fluconazol e azitromicina). Terapia localizada inclui injeções intra-lesionais de pentavalentes, medicamentos tópicos e métodos físicos (crioterapia, laser de CO₂ e excisão cirúrgica da lesão). Outras modalidades utilizadas para o tratamento são terapias de combinação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

As drogas comumente utilizadas são os antimoniais pentavalentes, introduzidos como quimioterápicos desde a década de 40, (sendo utilizados até hoje, apesar da sua toxicidade), como o Glucantime (antimoniato de meglumina) e Pentostan (estibogluconato de sódio), ambas, drogas de primeira geração (AMATO, 2008).

Devido a grande utilização dos antimoniais pentavalentes como drogas de primeira escolha para o tratamento das Leishmanioses, tem sido observada resistência por parte dos parasitas. Um dos mecanismos mais aceitos de aquisição de resistência seria a perda da capacidade de reduzir os pentavalentes em trivalentes, como tem sido observado em experimentos realizados utilizando amastigotas de *Leishmania donovani* (SHAKED-MISHAN et al, 2001).

Em consequência da resistência observada e das limitações no tratamento com os antimoniais pentavalentes, a Pentamidina e a Anfotericina B, ambos de segunda geração, têm sido

consideradas como drogas de segunda escolha no tratamento de Leishmanioses Viscerais, quando este não é responsivo ao tratamento com antimoniais pentavalentes (SUNDAR, 2010).

A combinação entre antimoniais e interferon-gama ou alopurinol tem sido proposta como alternativa para melhora da eficácia terapêutica destes compostos (AMATO et al, 2001). Uma alternativa mais recente é o miltefosine, que tem sido usado no tratamento da Leishmaniose Visceral, com a vantagem da administração oral. Porém, no tratamento da Leishmaniose Cutânea não houve boa resposta, necessitando de mais estudos em relação às demais espécies de *Leishmania* (SOTO et al, 2004).

A toxicidade decorrente do uso dessas drogas deve-se ao fato de que todas as drogas utilizadas interferem na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), gerando um estresse oxidativo no parasita. Da mesma maneira, agem também na atividade enzimática da célula hospedeira, causando os efeitos tóxicos observados no hospedeiro em consequência do seu uso prolongado. Ainda, o aparecimento de cepas resistentes às drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses tem se tornado frequente (SERENO et al, 2001; AL-MOHAMMED et al, 2005).

Uma alternativa à redução da toxicidade desses medicamentos, é o uso de sistemas de liberação, tais como lipossomas, nanotecnologia e polímeros carreadores (NAN et al, 2004)

O tratamento da leishmaniose seja visceral ou cutânea, com antimoniais, é muito mais difícil em pacientes imunodeficientes, como por exemplo, em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV). Esses pacientes têm recaídas, pois estas drogas requerem que o paciente esteja com o sistema imune adequado e com células CD4+T para uma boa resposta antiparasitária após medicação (LEZAMA-DÁVILA et al, 2012)

Doses diárias inferiores ao recomendado, podem levar ao não tratamento adequado da LV com consequentes recidivas e para a LTA, lesões de pele que deixam cicatrizes podendo levar às deformidades e grande impacto na questão psicossocial do indivíduo, podendo levá-lo ao isolamento social, desemprego, e outros prejuízos psicológicos e sociais. Muitas vezes, os pacientes só evoluem para cura após a tentativa de diferentes protocolos terapêuticos (PELISSARI et al, 2011).

Antimoniato de meglumina é geralmente eficaz, mas deve ser dado em doses adequadas no tempo certo, muitas vezes por semanas ou meses. Durante muitos anos, tem sido o tratamento mais eficaz para LC (MEYMANDI et al, 2011).

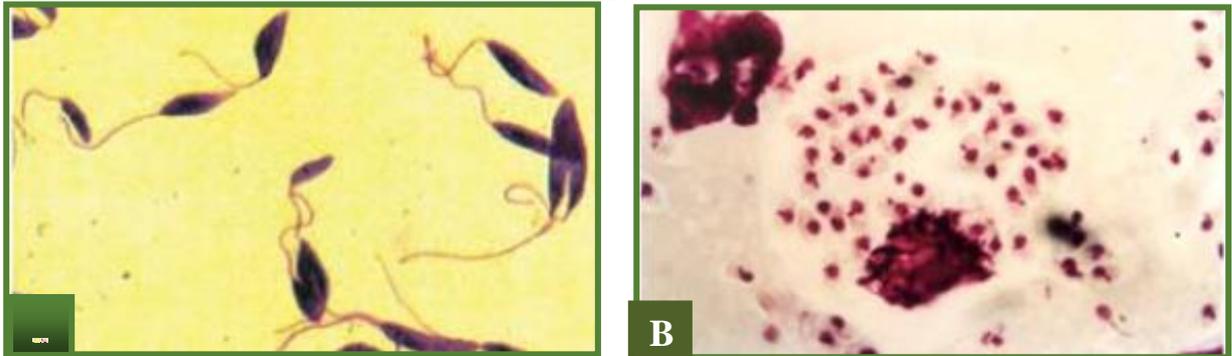
O prolongado tempo de terapêutica associado aos efeitos colaterais graves e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados no tratamento, entre outros fatores, torna necessária a busca de novos compostos para o tratamento destas enfermidades. Além do mais, o comprometimento da eficácia do tratamento nos casos de imunodepressão causada pela co-

infecção com o vírus HIV, também são fatores que devem ser levados em consideração (RYBNIKER et al., 2010).

2.3 Formas promastigota e amastigota do parasita

Os parasitos do gênero *Leishmania*, são parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma flagelada, também chamada de promastigota (Figura 7A), e outra aflagelada, ou amastigota (Figura 7B) (DESJEUX, 2004).

Figura 7: Forma promastigota (A) e amastigota (B) dos parasitos causadores das Leishmanioses.



Fonte: BRASIL (2003).

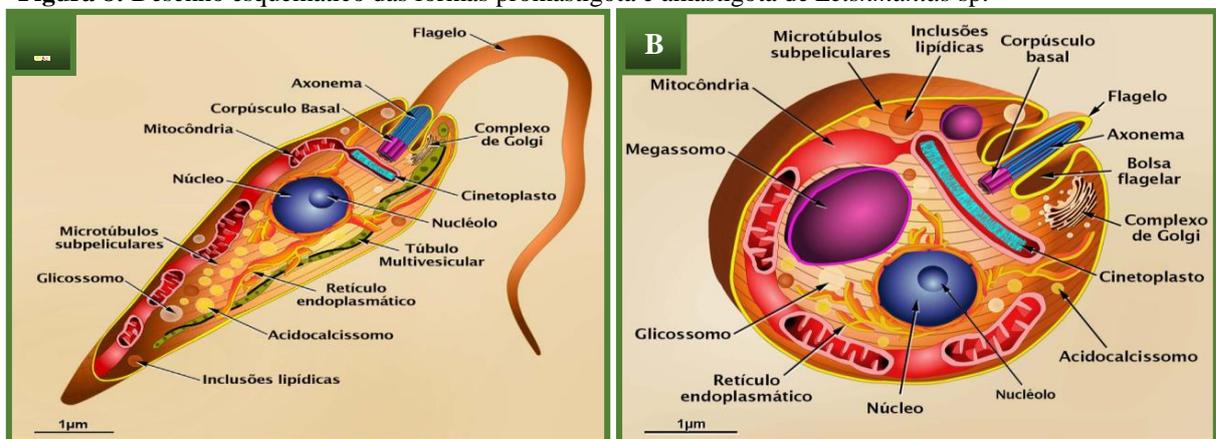
A forma promastigota é alongada e elíptica, o corpo celular mede entre 6 e 8 μm de comprimento, com um flagelo longo que emerge da parte anterior do corpo e o ajuda a fixar-se no epitélio intestinal do inseto vetor. Possui organelas e estruturas típicas dos eucariotos, tais como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi e citoesqueleto além de algumas organelas que podem ser exclusivas da Família *Trypanosomatidae* como cinetoplasto, estrutura paraflagelar, acidocalcissomo, glicossomo e microtúbulos subpeliculares (Figura 8A) (TEIXEIRA, 2013).

Em cultura, as formas promastigotas demoram cerca de 7 dias para completarem seu ciclo de vida. Após o terceiro dia, encontram-se em fase exponencial de crescimento e, a partir do quinto dia, entram em fase estacionária. Nesse tempo, estão aptas a infectar macrófagos, pois estão individualizadas e assim promovem uma infecção bem estabelecida *in vitro* (BATES, 1994).

A forma amastigota tem morfologia de arredondada a ovóide, medindo cerca de 3 μm de largura e 6 μm de comprimento e apresentando flagelo único e bem reduzido. Nesta, o cinetoplasto tem forma de bastão e fica entre o núcleo e a base do flagelo. Esta forma é

intracelular obrigatória, pois vive e se multiplica no interior do vacúolo parasitóforo de células do sistema fagocítico mononuclear dos mamíferos. Os amastigotas apresentam todas as organelas e estruturas semelhantes aos promastigotas, com exceção dos megassomos (ausente nos promastigotas) e estrutura paraflagelar (ausente nos amastigotas) (Figura 8B) (TEIXEIRA, 2013). Após inúmeros ciclos de divisão, um grande número de amastigotas pode ser encontrado nas células do hospedeiro, e essas podem persistir latentes no corpo do hospedeiro por décadas, escondidas em células musculares sem causar dano significativo aos tecidos (TEIXEIRA et al., 2006).

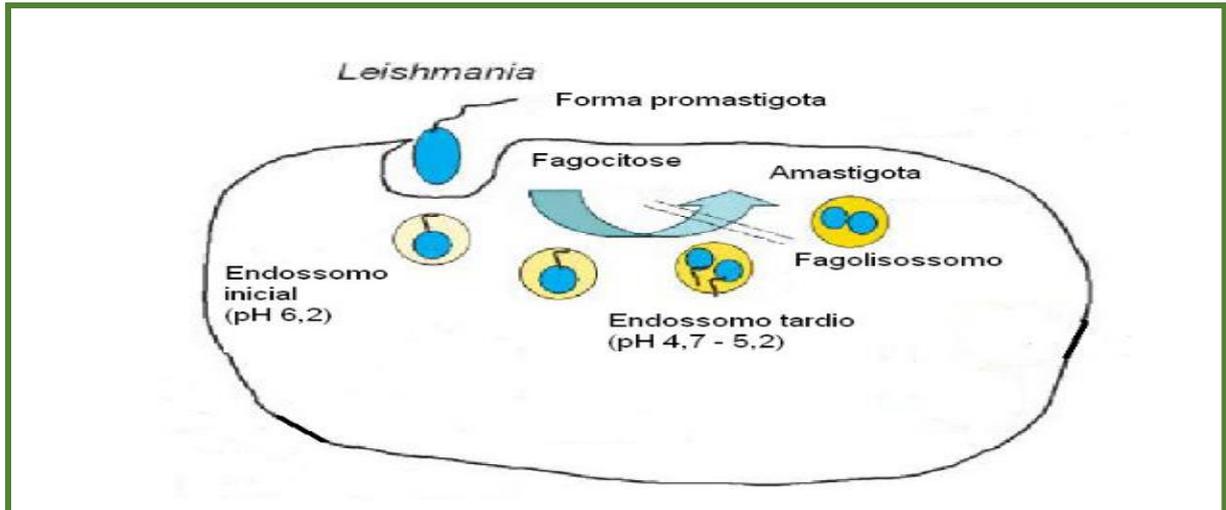
Figura 8: Desenho esquemático das formas promastigota e amastigota de *Leishmanias* sp.



Fonte: Modificado de Teixeira et al, 2001.

Nos macrófagos, os parasitos internalizados se estabelecem em um vacúolo parasitóforo (fagolisossomo), que os separa do citoplasma celular. No interior do vacúolo parasitóforo ocorre a mudança da forma evolutiva de promastigota para amastigota (Figura 9). Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, as *Leishmanias* sp. desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, inibindo as funções dos macrófagos, através de processos de produção de radicais livres, apresentação de antígenos e produção de citocinas, decorrentes da ativação da expressão de moléculas imunossupressoras pelos parasitas, como metabólitos de ácido araquidônico e citocinas como IL-10 e TGF- β . Desta forma, os parasitas conseguem sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (OLIVER, et al, 2005; FREITAS et al, 2001; VANNIER-SANTOS et al., 2002).

Figura 9: Fagocitose de *Leishmania* sp por macrófago.



Fonte: Modificado de Nyalwhite et al (2003).

Alguns estudos sugerem que, em algumas espécies de *Leishmania*, a formação do vacúolo parasitóforo seja dependente de um rearranjo do citoesqueleto da célula hospedeira. Moléculas de F-actina são acumuladas ao redor da membrana do vacúolo em formação no momento da invasão à célula hospedeira. Assim, o citoesqueleto formado por F-actina contribui não só para a formação do vacúolo, mas forma uma barreira que impede a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos em espécies de *L. donovani* (HOLMET al, 2001). Porém, esse rearranjo do citoesqueleto não é uma característica presente em todas as espécies de *Leishmania*. Como observado em outros estudos, o vacúolo contendo *L. amazonensis* não depende da acumulação de F-actina para sua formação (COURRET et al, 2002).

Os parasitos da espécie *Leishmania*, possuem diversas organelas semelhantes às de outras células eucarióticas, como por exemplo, o retículo endoplasmático e o Complexo de Golgi. Além destas, possuem organelas que são próprias dos parasitos da família dos *Trypanosomatídeos*, como os glicossomos, e microtúbulos subpeculiares. Alguns estudos sugerem que, através de diferentes vias metabólicas específicas dessas organelas peculiares dos parasitos da Família *Tripanosomatidae*, existem novos alvos de atuação para novos fármacos com potencial terapêutico (SOUZA, 2008).

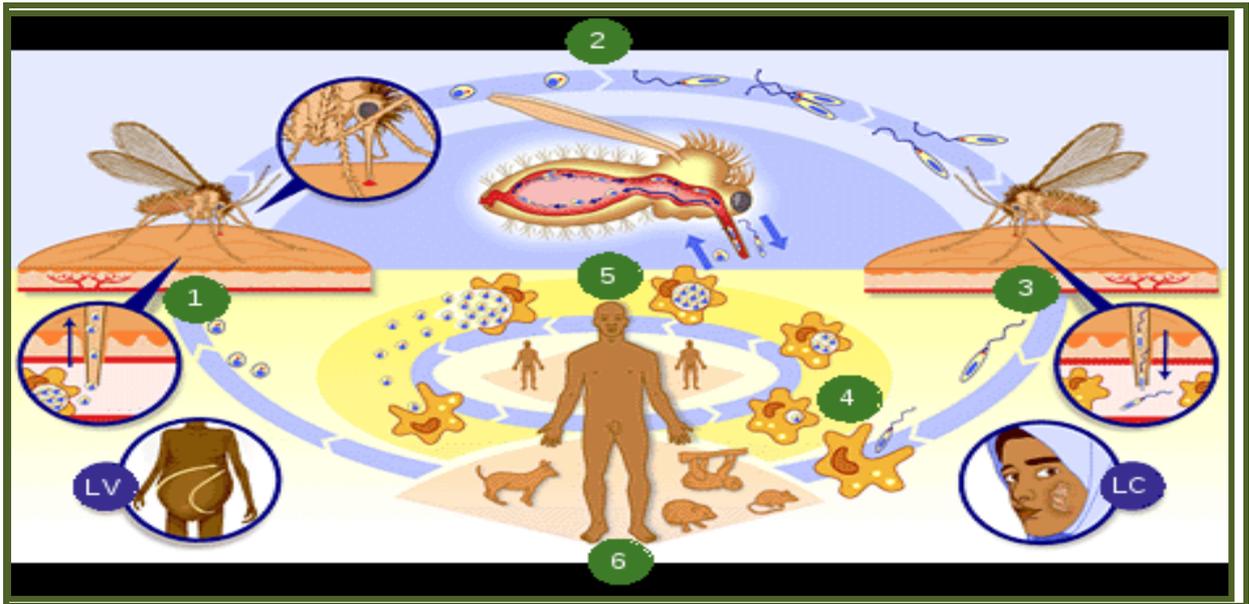
Como a integridade da membrana plasmática do parasita é muito importante para o estabelecimento e aquisição de nutrientes pelo parasita, drogas que desestabilizam a superfície da membrana plasmática, suas funções e integridade, podem ser consideradas bons quimioterápicos para o tratamento de leishmanioses (BURCHMORE e BARRET, 2001).

2.4 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida desses protozoários é digenético (heterogênico), envolvendo um hospedeiro invertebrado (que são os flebótomos do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou flebótomos do gênero *phlebotomus*, no Velho Mundo) e um hospedeiro vertebrado, como os animais selvagens e domésticos, além do homem (Figura 10) (ROBERTS; JANOVY, 2000).

O flebotomíneo fêmea infectado faz o repasto sanguíneo inoculando formas promastigotas metacíclicas (formas infectivas) do parasito no hospedeiro vertebrado. Estas promastigotas são fagocitadas por macrófagos deste hospedeiro. Dentro dos macrófagos, no interior dos vacúolos parasitóforos, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se. Essas amastigotas são liberadas, podendo infectar novos macrófagos, disseminando o parasito. Ao exercer sua hematofagia em um reservatório mamífero infectado, o flebotomíneo se infecta, ingerindo o sangue juntamente com as formas amastigotas livres ou intramacrofágicas no tecido subcutâneo. No trato digestivo do inseto, essas amastigotas diferenciam-se em formas procíclicas (formas não infectivas), multiplicando-se por divisão binária e transformam-se em formas metacíclicas novamente, que migram para a probóscide do vetor, que serão inoculadas na pele do hospedeiro, no próximo repasto sanguíneo (CDC, 2013).

Figura 10: Ciclo biológico da *Leishmanias* sp. no hospedeiro invertebrado e mamífero.



Legenda: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1. O flebótomo ingere macrófagos contendo amastigotas ao se alimentar num mamífero infectado. 2. As formas amastigotas, uma vez liberadas do macrófago no interior do tubo digestivo do inseto, transformam-se em formas promastigotas procíclicas, que se multiplicam intensamente, aderidas ao epitélio de revestimento do trato digestivo. Após 7 a 15 dias, formas metacíclicas infectantes para o hospedeiro vertebrado aparecem na luz do tubo digestivo. 3. Ao se alimentar em outro mamífero, o flebótomo infectado regurgita parte do conteúdo do trato digestivo na lesão recém causada, inoculando assim as formas metacíclicas na pele do hospedeiro. 4. Estas são fagocitadas, transformando-se de volta em amastigotas e proliferam intensamente no fagolisossomo da célula fagocítica. 5. O rompimento das células infectadas libera amastigotas, que vão infectar novas células. O processo lentamente leva a uma infecção sistêmica. 6. O homem e vários outros mamíferos participam do ciclo das leishmanioses, incluindo roedores, edentados, marsupiais e canídeos.

Fonte: <http://lib.convdocs.org/docs/index-10811.html?page=2> (2014).

2.5 Biologia celular dos parasitas

2.5.1 Mitocôndria e cinetoplasto

A mitocôndria nos tripanosomatídeos diferencia-se da mitocôndria dos organismos multicelulares, no que diz respeito à densidade da matriz bem como a forma e número de cristas. Além disso, os parasitos dessa classe possuem mitocôndria única (FIDALGO, 2011). Geralmente a mitocôndria se localiza abaixo da membrana plasmática arrodando todo o corpo do parasita, abaixo dos microtúbulos sub-pelculares. Uma característica peculiar da mitocôndria dos protozoários da ordem kinetoplastida, é que o DNA mitocondrial (k-DNA) concentra-se em uma região especializada da mitocôndria denominada cinetoplasto (RODRIGUES, 2009). O cinetoplasto se situa próximo ao núcleo e sua forma e organização estrutural variam de acordo como o estágio de desenvolvimento do protozoário (SOUZA, 2008).

2.5.2 Microtúbulos sub-pelculares

São um arranjo microtubular, que envolve o corpo celular do protozoário e constitui o citoesqueleto associado à membrana. Esses microtúbulos estão presentes tanto na forma promastigota quanto na forma amastigota do parasito e são responsáveis por essas diferentes formas e formatos do parasito durante seu ciclo de vida. (OKUDA et al., 1999).

2.5.3 Glicossomos

São organelas esféricas distribuídas por toda a célula, de quantidade variada, de acordo com a espécie e dos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito.

Sua função parece estar relacionada com a glicólise. Sete enzimas participam das primeiras etapas da via glicolítica e duas metabolizam glicerol. Com isso, os glicossomos conseguem fazer com que o parasito aumente de maneira significativa a taxa de glicólise e, conseqüentemente, a produção de ATP. Além das funções relacionadas à produção de energia, outras vias bioquímicas estão pelo menos parcialmente associadas aos glicossomosnesses parasitas, como a β -oxidação de ácidos graxos, a biossíntese de pirimidinas, entre outras (MICHELS et al., 2006).

2.5.4 Megassomos

Os megassomos parecem estar relacionados principalmente com acumulação e possível degradação de macromoléculas endocitadas, além de estarem envolvidos no processo de interação parasita-célula hospedeira, de diferenciação e sobrevivência intracelular do parasita, devido à proteinases presentes nestas organelas (UEDA-NAKAMURA et al, 2002). São organelas grandes, quando observadas por microscopia eletrônica de Transmissão, semelhantes a um lisossomo. Seu conteúdo principal consiste de proteinases de cisteína. Essas organelas foram descritas primeiramente em espécies de *Leishmania mexicana*. Acredita-se que ela e seus constituintes podem estar diretamente envolvidos na infectividade e virulência da *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA et al, 2007).

Megassomos não são encontrados em formas promastigotas, e aparecem apenas durante o processo de transformação destas formas em amastigotas (BOUKAI et al, 2000).

2.5.5 Acidocalcissomas

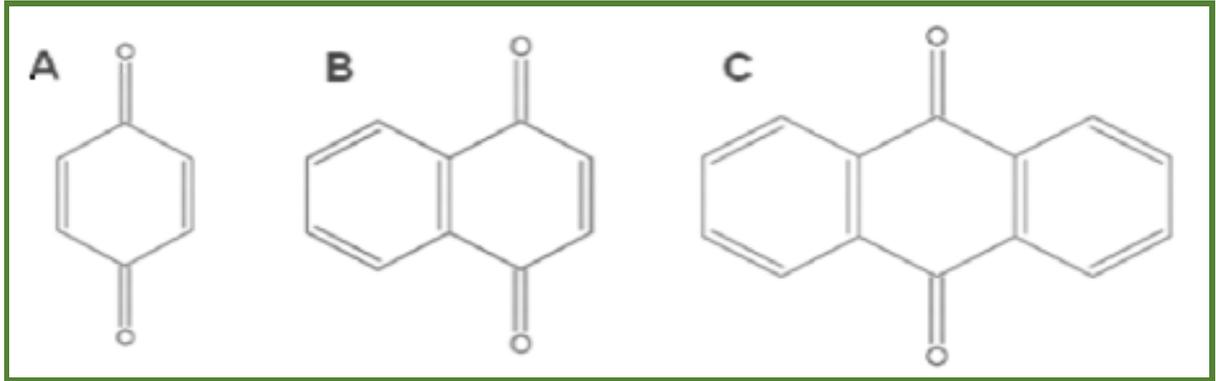
Os acidocalcissomas são organelas com a capacidade de acumular grande quantidade de íons cálcio, além de outros íons como cálcio, magnésio, sódio, potássio, ferro e zinco, podendo também ser atribuída a esta organela a manutenção do equilíbrio desses íons. Estas estruturas contêm enzimas pirofosfatase e polifosfatase (DO CAMPO e MORENO, 2001). O acidocalcissoma está presente em bactérias, fungos, algas e protozoários, porém parecem estar ausente em células de mamíferos (RUIZ et al., 2001).

Os acidocalcissomas são facilmente visualizados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão, sendo semelhantes a vacúolos parcialmente vazios. Eles estão envolvidos na resposta a várias formas de estresse, como mudanças no pH e pressão osmótica, as quais os parasitas sofrem durante sua interação com a célula hospedeira (RAO e KORNBERG, 1996; KORNBERG et al, 1999). Os níveis desta organela são baixos na forma promastigota procíclica. Entretanto, no momento da diferenciação das formas promastigota sprocíclicas em metacíclicas – metaciclogênese – os níveis desta organela aumentam, tornando-se semelhantes àqueles verificados na forma amastigota, o que evidencia a importância desta organela na infectividade do parasita (ZHANG et al, 2005).

2.6 Quinonas

As quinonas são compostos de ampla distribuição na natureza, porém, sua ocorrência maior é em plantas superiores, apesar de poderem ser encontradas também em alguns organismos vivos como bactérias, fungos, vírus, artrópodes. São classificadas de acordo com o sistema aromático que possuem em sua estrutura. Sua característica principal é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas ligações duplas c-c. Podemos dividir as quinonas em três principais grupos, em função do ciclo no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas estão inseridas: benzoquinonas – um anel benzênico; antraquinonas – um anel antracênico; e naftoquinonas; um anel naftalênico (Figura 11) (CÂMARA et al, 2008; SIMÕES et al, 2002; ASCHE, 2005).

Figura 11: Principais grupos de quinonas.



Legenda: Benzoquinona (A), naftoquinona (B) e antraquinona (C).

Fonte: Modificado de ASCHE (2005).

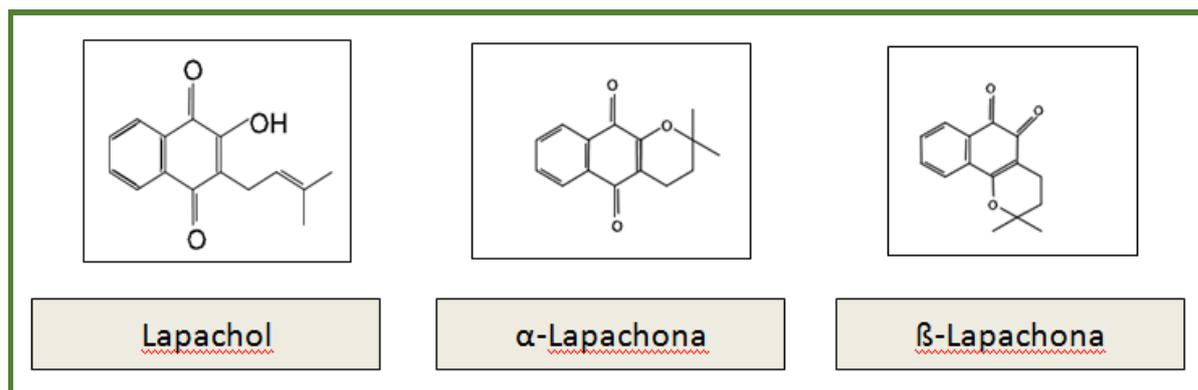
As quinonas possuem atividade antiparasitária através de diversos mecanismos pelos quais conseguem inibir o crescimento desses parasitas, tais como: inibição competitiva do complexo citocromo BC1; através de geração de espécies reativas de oxigênio; inibição enzimática (inibindo, por exemplo, a glutatona-redutase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); a alquilação de biomoléculas e a depleção de glutatona. Dois principais mecanismos de citotoxicidade das quinonas foram propostos: a estimulação do estresse oxidativo e alquilação de nucleófilos celular, que abrangem uma grande variedade de biomoléculas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem reagir diretamente com o DNA, lipídios e proteínas, conduzindo a danos celulares (PINTO e CASTRO, 2009; SILVA et al, 2003).

2.6.1 Naftoquinonas

Muitas naftoquinonas, sintéticas ou naturais, foram estudadas como possíveis agentes antitumorais, larvicidas, moluscidas, antimalárico, leishmanicidas e contra outros protozoários (ARÊAS, 2007; MENNA-BARRETO et al, 2009; SILVA et al, 2003) Porém, o potencial da sua utilidade é limitado pela sua citotoxicidade e baixa biodisponibilidade (KAYSER et al., 2000).

Dentre as naftoquinonas, pode-se destacar o lapachol (Figura 12), encontrado em árvores do gênero das tabebuias (ou conhecidas como ipê-roxo ou ipê-uma ou pau d'arco), β -lapachona e a α -lapachona, também são encontradas no lenho de ipês –*Tabebuia* (Figura 13) (FONSECA, 2003).

Figura 12: Estrutura molecular do Lapachol, da α -Lapachona β -Lapachona.



Fonte: Modificado de FONSECA (2003).

Figura 13: Ipê roxo (Gênero: *Tabebuia*; Família: Bignoniaceae).



Fonte: www.baixaki.com.br (2014).

Naftoquinonas são compostos presentes em diversas famílias de plantas superiores e suas estruturas moleculares conferem propriedades redox, que estão envolvidas em múltiplos processos oxidativos biológicos (PINTO e CASTRO, 2009; MENNA-BARRETO, 2009).

Alguns hidroxinaftoquinonas, como o Atovaquone, mostrou ter uma atividade concentração-dependente contra *Leishmania infantum* (JERNIGAN et al., 1996), enquanto que a atividade *in vivo* em um modelo murina manteve-se baixa (CAUCHETIER et al. 2000).

Vários pesquisadores têm estudado a influência de diferentes substituintes em várias posições diferentes de moléculas de naftoquinonas sintéticas (TIKKANEN, 1983; DA COSTA MEDINA, 2008). No caso da lausona (2 - hidroxil , 1 , 4 - naftoquinona), os resultados são conflitantes, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Pois alguns consideram que a lausona é um composto

não-redox *in vitro* (FLUERARU, 2005; YBUKI, 2006), uma vez que a exposição direta da lausone aos eritrócitos e hepatócitos isolados não causaram efeitos oxidativos. Porém, provocou resposta anêmica com danos oxidativos. Apesar de um perfil de dano oxidativo ser relatado como induzido pela lausona *in vivo*, o tipo de EROS (espécies reativas de oxigênio), não é totalmente esclarecido ainda. Nenhuma conclusão definitiva pode, contudo, ser proposta (MOSTEFAR-KARA, 2010).

Atividades de diversas naftoquinonas sintéticas e naturais foram avaliadas, com resultados significativos. Esses resultados mostraram o potencial das hidroquinonas, seus sais e quinonas halogenadas como importantes larvicidas contra larvas no estágio 4 de *Aedes aegypti*, vetor da dengue, e contra caramujo adulto de *Biomphalaria glabrata* (RIBEIRO et al, 2009).

A β -lapachona, apesar de ainda não ser um fármaco, é uma substância muito importante do ponto de vista da pesquisa científica. Suas atividades farmacológicas contra o *T. cruzi*, agente etiológico causador da doença de Chagas, e contra células cancerosas, a distingue de outras naftoquinonas. O tratamento das três formas de *T. cruzi* demonstrou causar alterações da distribuição da cromatina, mitocôndria e membrana plasmática (DO CAMPO et al, 1977). Devido à sua citotoxicidade, a β -lapachona não pode ser utilizada no tratamento da doença de Chagas, mas sua estrutura tem servido de inspiração para os químicos medicinais, para a síntese de substâncias mais seletivas contra o *T. cruzi* (FERREIRA et al, 2010).

A β -lapachona mostrou-se eficaz, *in vitro*, contra diversas linhagens de células malignas humanas: de melanoma, leucemia, câncer colorretal, câncer de pulmão, de mama e de próstata. Outra atividade surpreendente é a sua ação sinérgica no tratamento radioterápico de tumores (FERREIRA et al, 2010).

O derivado do lapachol, hidroquinona, mostrou ser ativo tanto *in vitro* como *in vivo*, contra *L. amazonensis* e *in vitro* contra *L. brasiliensis*. Além disso, o experimento *in vitro* com macrófagos demonstrou que, em uma concentração equivalente a IC₅₀, este composto não é perigoso para a célula hospedeira, este estudo reforça o uso potencial de hidroquinonas substituídos e derivados como drogas leishmanicidas (LIMA et al., 2004).

Também observou-se atividade *in vitro* da atovaquona (uma hidroquinonaftoquinona) em macrófagos parasitados pela forma amastigota de *L. donovani*, assim como, também se observou, que nos camundongos infectados, atovaquona administrada por via subcutânea, resultou na inibição moderada da replicação da *L. donovani* (CROFT, 1992).

O Lapachol é de origem natural, extraído do cerne de várias plantas da família Bignoniaceae, principalmente a partir de espécies *Tecoma* e *Tabebuia* (RIBEIRO et al, 2009). Ele e seus análogos são conhecidos por possuírem atividade antitumoral, antibiótico,

antimalárico (DE ANDRADE-NETO et al., 2004), anti-inflamatório, antiúlcera (HUSSAIN et al., 2007), leishmanicida (LIMA et al., 2004) e atividades moluscidas (DOS SANTOS et al., 2000).

Teixeira e colaboradores demonstraram que o lapachol foi eficaz *in vitro* contra amastigotas intracelulares de *L. brasiliensis*, enquanto que em um modelo animal, ele foi incapaz de evitar lesões induzidas pela infecção (TEIXEIRA et al, 2001).

Naftoquinonas derivadas do Lapachol vêm sendo estudadas como possíveis agentes Leishmanicidas. No intuito de avaliarmos novas substâncias como possíveis drogas leishmanicidas, avaliamos a atividade de cinco naftoquinonas sintéticas derivadas do lapachol, sobre a *L. amazonensis*, bem como comparamos a ação das mesmas por dois métodos de citotoxicidade diferentes. Alterações ultraestruturais dessas naftoquinonas frente a *L. amazonensis* também puderam ser observadas.

3.1 Naftoquinonas

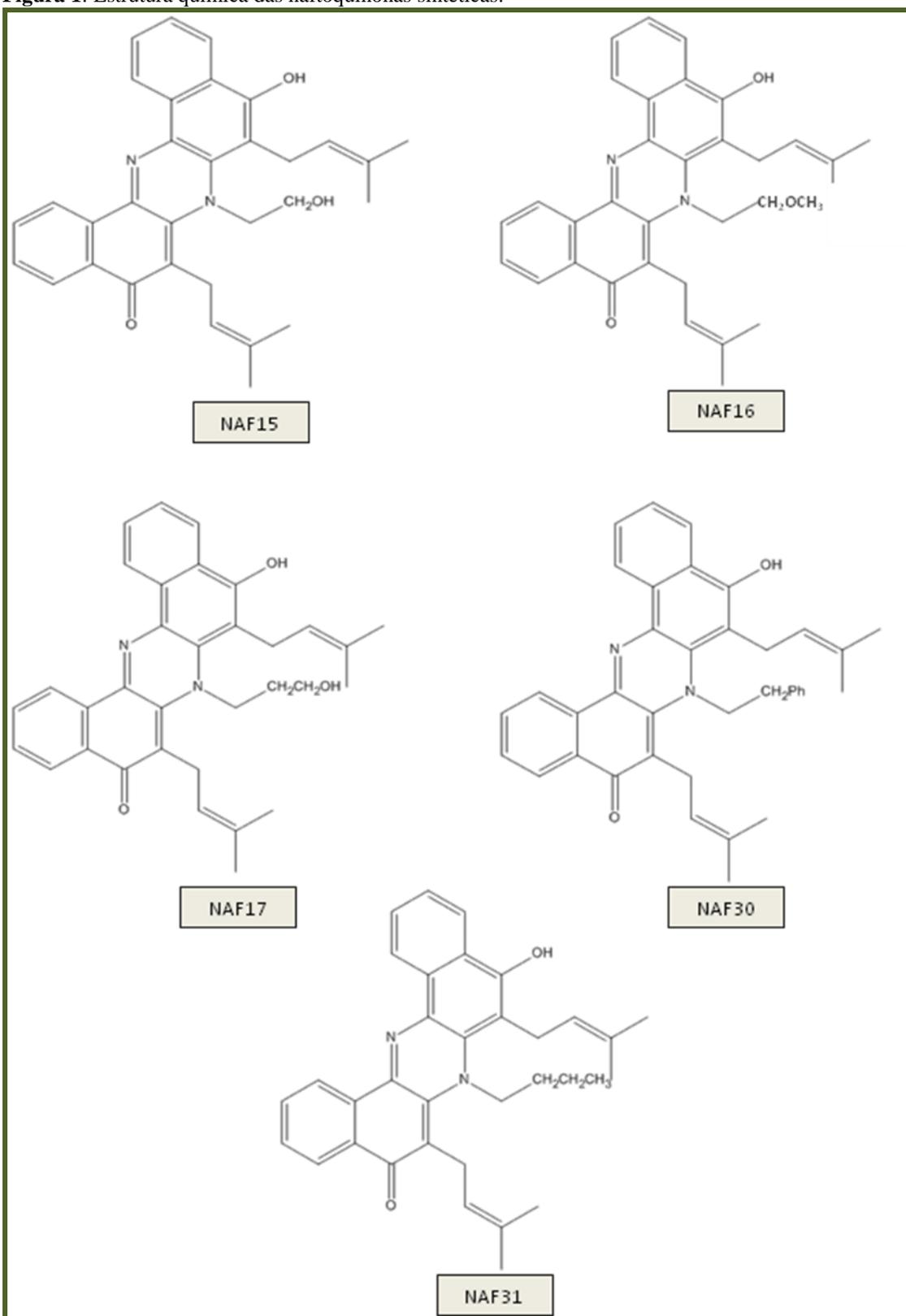
Foram utilizadas 5 naftoquinonas sintéticas, fenazinas derivadas do Lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona), cedidas pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Celso de Amorim Câmara, Departamento de Química da UFRPE (Tabela 1 e Figura 1). As naftoquinonas foram diluídas em Dimetil- sulfóxido (DMSO), em uma concentração final de 1%. Para todos os experimentos, realizou-se controle sem tratamento e controle contendo apenas o DMSO, na concentração final nos experimentos (1%). Estes controles foram comparados entre si e avaliados quanto a interferência ou não do diluente sobre as células tratadas.

Tabela 1: Naftoquinonas sintéticas testadas.

Composto	Fórmula química
NAF 15	$C_{32}H_{32}N_2O_3$ 9-hidroxi-7-(2-hidroxietil)-6,8-bis (3-metilbut-2-en-1-il)dibenzo[aj]fenazina-5(7H)-ona
NAF 16	$C_{33}H_{34}N_2O_3$ 7-ethyl-9-hidroxi-8-(4-methoxi-3-metilbut-2-en-1-il)-6-(3-metilbut-2-en-1-yl)dibenzo[aj]fenazina-5(7h)-ona
NAF 17	$C_{33}H_{34}N_2O_3$ 9-hidroxi-7-(3-hidroxipropil)-6,8-bis (3-metilbut-2-en-1-il)dibenzo[a,j]fenazina-5(7H)-ona
NAF 30	$C_{38}H_{36}N_2O_2$ 9-hidroxi-6,8-bis(3-metilbut-2-en-1-il)-7-fenetildibenzo[a,j]fenazina-5(7H)-ona
NAF 31	$C_{34}H_{35}N_2O_2$ 7-butil-9-hidroxi-6,8-bis(3-metilbut-2-en-1-il)dibenzo[a,j]fenazina-5(7H)-ona

Fonte: A autora (2014).

Figura 1: Estrutura química das naftoquinonas sintéticas.



Legenda: Estrutura química das naftoquinonas sintéticas NAF15 (C₃₂H₃₂N₂O₃), NAF16 (C₃₃H₃₄N₂O₃), NAF17 (C₃₃H₃₄N₂O₃), NAF30 (C₃₈H₃₆N₂O₂), e NAF31 (C₃₄H₃₅N₂O₂), derivadas do Lapachol.

Fonte: A autora (2014).

3.2 Cultivo de parasitas

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa LTB 0016), foram mantidas em meio Schneider (SIGMA, St Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBI) (SIGMA, St Louis, MO, EUA), 100 mg de estreptomicina/mL e 100 U de penicilina/mL, incubados em estufa a 26 °C e com repiques a cada 3 dias. Para os experimentos foram utilizados parasitas em fase log de crescimento.

3.3 Atividade leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em *Leishmania amazonensis*

3.3.1 Método quantitativo direto

Para triagem da atividade leishmanicida das naftoquinonas pelo método quantitativo direto, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram coletadas na fase log de crescimento e incubadas na concentração de 1×10^6 células/mL em meio Schneider na presença e ausência de naftoquinonas em diferentes concentrações (100 µg /mL, 50µg /mL; 25µg /mL; 12,5µg /mL; 6,25µg/mL e 3,125 µg/mL) em placas de 24 poços. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa de 26 °C. Após o período de incubação, a IC₅₀ (concentração que inibi 50% do crescimento dos parasitas) foi determinada por regressão linear com limite de confiança próximo a 95% baseada na contagem direta em câmara de Neubauer. Cada teste foi realizado em três experimentos independentes, em triplicata.

3.3.2 Teste de luminescência

Utilizamos o teste de luminescência, para avaliação da viabilidade celular. Este teste baseia-se na quantidade de moléculas de ATP liberadas pela célula após a adição do reagente, para determinar o número de células viáveis. A homogênea mistura do reagente, resulta em lise celular e geração de um sinal luminescente proporcional à quantidade de ATP presente, indicando a presença de células metabolicamente ativas. Os níveis de ATP da cultura foram mensurados através do Kit Cell-Titer-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, USA). Para tal, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na concentração 1×10^6 células/mL em meio Schneider na presença e ausência de naftoquinonas em diferentes

concentrações (50µg /mL; 25µg /mL; 12,5µg /mL; 6,25µg/mL e 3,125 µg/mL), em placa branca de polietileno de fundo reto transparente, com 96 poços estéreis em um volume final de 100µL/poço. As placas foram incubadas por 48 horas em estufa de 26°C. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos, em seguida, 100µL de reagente CellTiter-Glo® foi adicionados aos poços e a placa submetida a agitação orbital por 2 minutos com a finalidade de produzir melhor homogeneidade do reagente com o meio contendo as células, induzindo à lise das células mais uniformemente. Para estabilização do sinal luminoso, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, o sinal de luminescência foi mensurado usando um leitor de ELISA a 562 nm. A IC₅₀ foi determinada por regressão linear com limite de confiança próximo a 95% baseada na porcentagem da intensidade do sinal luminoso. Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

3.4 Citotoxicidade em células de mamífero

3.4.1 Macrófagos murinos da linhagem J774

Para a realização de teste de citotoxicidade em células de mamífero, foram utilizados macrófagos murinos da linhagem J774 cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium – Life Technologies) suplementado com SFBI-Soro Fetal Bovino Inativado (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), em estufa à 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂ na presença ou ausência de naftoquinonas em diferentes concentrações (50µg /mL; 25µg /mL; 12,5µg /mL; 6,25µg/mL e 3,125 µg/mL). As placas contendo 1 x 10⁵ células/mL foram incubadas por 48 horas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após o período de incubação, as placas foram retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 100µL de reagente CellTiter-Glo® foi adicionado em cada poço e submetidos a agitação orbital por 2 minutos com a finalidade de induzir lise das células. Para estabilização do sinal luminoso, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos, e então foi realizada a leitura em leitor de ELISA a 562 nm. A CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) foi determinada por regressão linear com limite de confiança próximo a 95% baseada na intensidade do sinal luminoso. Cada teste foi realizado em dois experimentos independentes em quadruplicata.

3.4.2 Macrófagos peritoneais de murinos BALB/c

O efeito citotóxico das cinco naftoquinonas sintéticas também foi verificado, utilizando macrófagos peritoneais, para avaliação de diferença de potencial citotóxico em modelos celulares diferentes. Para tal, os macrófagos foram coletados (após eutanásia dos animais em câmara de CO₂), em condições estéreis através da inoculação via intraperitoneal de 8mL de meio RPMI e então, após um minuto de homogeneização, o meio foi retirado e armazenado em tubo Falcon a uma temperatura de 4°C. Posteriormente, os macrófagos foram plaqueados em uma concentração final de 2x10⁶ células/mL em placas de 96 poços contendo meio RPMI-1640 e suplementado com 10% de SFB inativo e incubados em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas, o meio foi removido e as células incubadas na presença de várias concentrações (3,125 – 50 µg/mL), por 48 horas. Após o período de tratamento, as placas foram retiradas da estufa e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, 100µL de reagente CellTiter-Glo[®] foi adicionado em cada poço e submetidos a agitação orbital por 2 minutos com a finalidade de induzir lise das células. Para estabilização do sinal luminoso, as placas foram deixadas em temperatura ambiente por 10 minutos, e então foi realizada a leitura em leitor de ELISA a 562 nm. A CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) foi determinada por regressão linear com limite de confiança próximo a 95% baseada na intensidade do sinal luminoso. Cada teste foi realizado em dois experimentos independentes em quadruplicata.

3.5 Índice de Seletividade

O índice de seletividade (ISe) foi calculado dividindo-se a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) para macrófagos pela IC₅₀ para as promastigotas de *L. amazonensis* (TIUMAN et al., 2005).

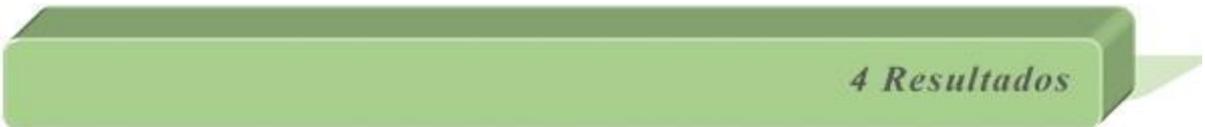
$$\text{ISe} = \text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$$

3.6 Análise ultraestrutural das promastigotas de *L. amazonensis* tratadas ou não com as naftoquinonas.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), para identificação de possíveis alvos intracelulares de ação das naftoquinonas sintéticas. Para tal, células tratadas ou não com 1 x IC₅₀ e 2 x IC₅₀ dos compostos estudados foram lavadas e fixadas em glutaraldeído a 2,5% diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, ferricianeto de potássio a 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50% -100%), infiltrados e incluídos em epon (Fluka Analytical). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo (Leica EMUC6) foram coletados em grades de cobre de malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e observados ao microscópio eletrônico de transmissão.

3.7 Análise estatística

As análises de regressão linear foram feitas no programa SPSS 18.0 (IBM Co., Nova Iorque, EUA). As análises de significância foram realizadas através do teste T ou ANOVA e o pós-teste de Bonferroni, utilizando software GraphPadPrism 5.0 (Graphpad, Califórnia, EUA).



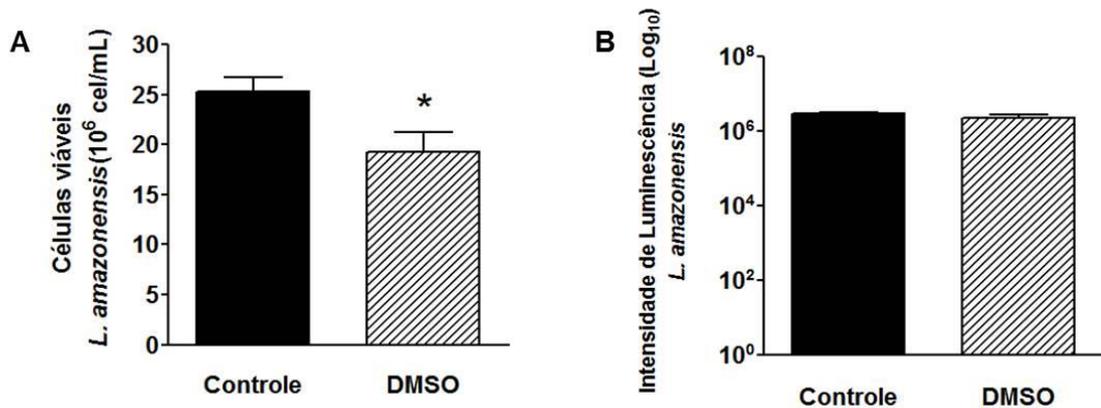
4 Resultados

4.1 Viabilidade celular dos grupos controle não tratado e controle com DMSO a 1%

Utilizamos, para todos os experimentos, um controle sem tratamento e outro controle, com o diluente das naftoquinonas sintéticas do nosso estudo para avaliarmos a variação na viabilidade destas células, pelo método quantitativo direto (Figura 15A). Da mesma forma, avaliamos a influência

do controle com DMSO em relação ao controle sem tratamento, das formas promastigotas, pelo método de inibição da luminescência (Figura 15B).

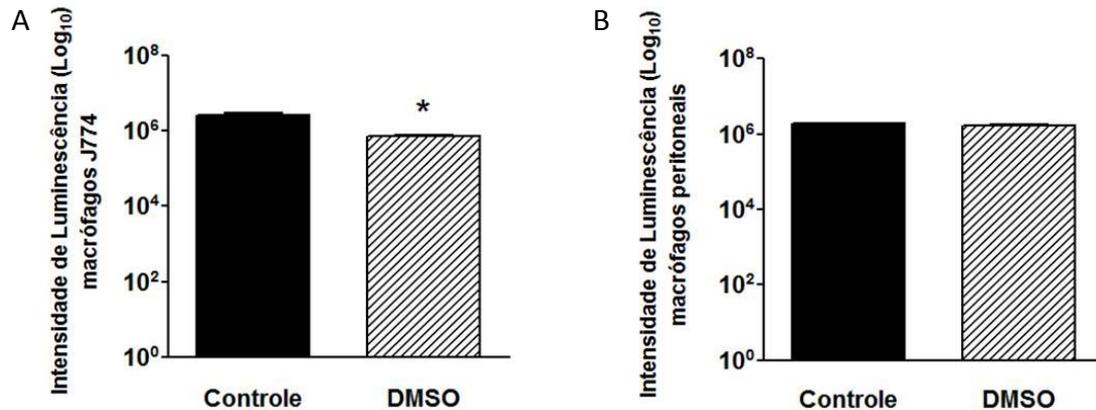
Figura 15: Comparação entre os grupos controles e controles com DMSO a 1% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*



Legenda: Comparação entre grupos controles e grupos controles com DMSO a 1% nas formas promastigotas de *L. amazonensis* pelo teste quantitativo por contagem direta das células (A), e pelo teste de Luminescência, de acordo com a intensidade de luminescência (B), durante 48 horas.

A relação entre os dois controles, sem tratamento e com diluente das naftoquinonas, apresentou resultado significativo pelo método direto de contagem. Porém, quando comparamos os mesmos controles dos testes realizados pelo teste de inibição da luminescência, verificamos não haver diferença significativa no número de promastigotas viáveis.

Figura 16: Comparação entre os grupos controles e controles com DMSO a 1% das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, de células da linhagem J774 e de macrófagos peritoneais.



Legenda: Comparação entre grupos controles e controles com DMSO nas células da linhagem J774 (A) e macrófagos peritoneais (B), ambos pelo teste de Luminescência, de acordo com a intensidade de luminescência, durante 48 horas. Os experimentos com as promastigotas de *L. amazonensis* por contagem direta das células e os experimentos com células de cultivo da linhagem J774, foram significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle (*). Os grupos controle sem tratamento e grupo controle com DMSO, das formas promastigotas e dos macrófagos peritoneais, ambos pelo método de luminescência, não apresentaram diferenças significativas.

Fonte: A autora (2014).

Para o modelo de macrófago de cultivo, da linhagem J774 pelo teste de inibição da luminescência (Figura 16A), tivemos diferença na toxicidade desses macrófagos, frente ao diluente das naftoquinonas, quando comparado com o grupo controle sem tratamento. Porém, comparando-se o controle sem tratamento, dos experimentos com macrófagos peritoneais, ao controle com o diluente das substâncias teste dos mesmos experimentos, notamos que não houve significância estatística para tal modelo celular (Figura 16B).

4.2 Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em *Leishmania amazonensis*

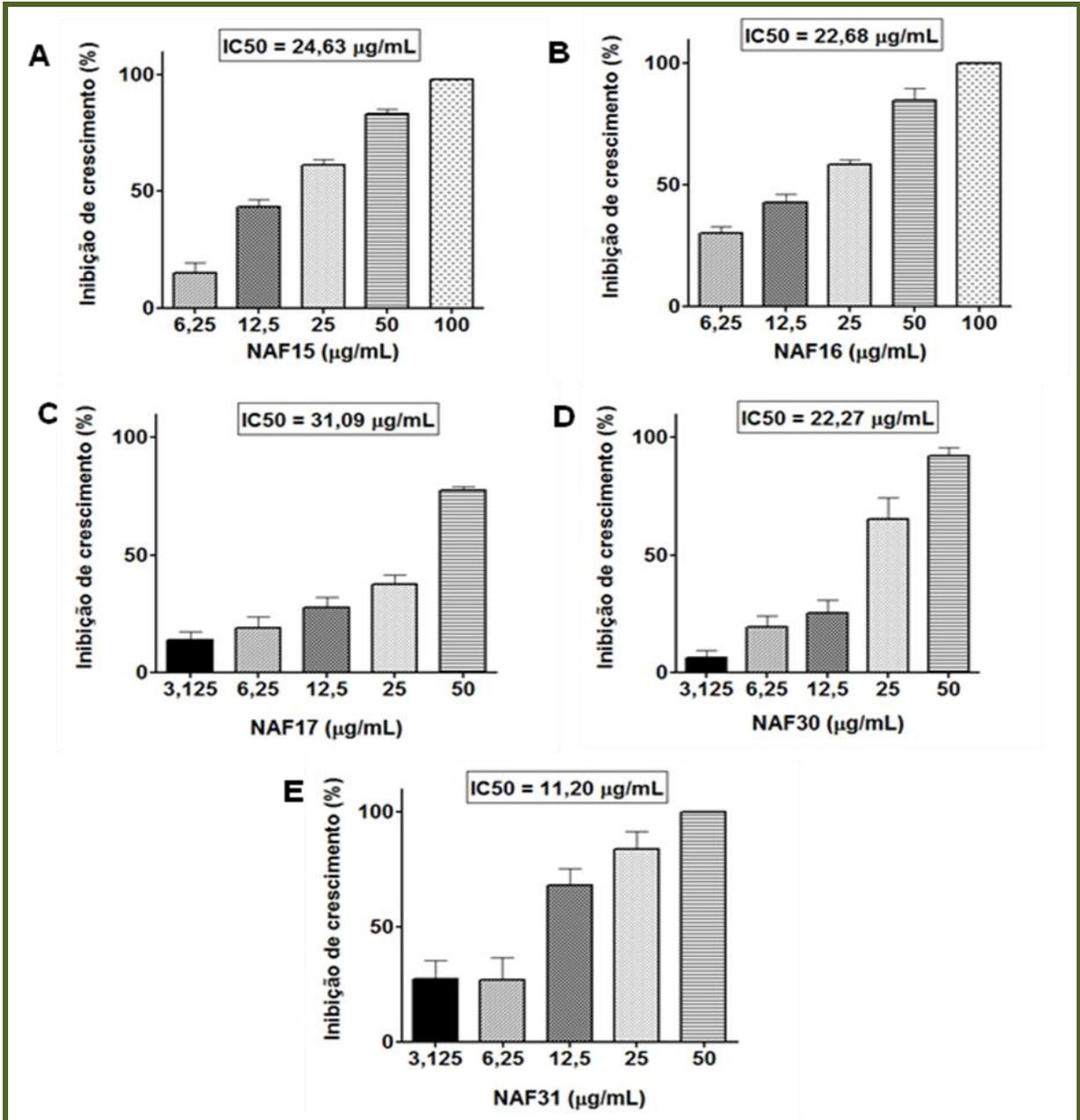
4.2.1 Método quantitativo direto

Todos os compostos foram capazes de causar efeito antiproliferativo em promastigotas de *L. amazonensis*, nas diferentes concentrações testadas e diferentes testes de citotoxicidade. A concentração citotóxica para inibir 50% do crescimento das formas promastigotas dessa espécie, variou entre os compostos, num intervalo de 11,20 a 31,09 µg/mL (Figura 17).

Os compostos NAF 15, NAF 16, NAF 17, NAF 30 E NAF 31, apresentaram valores de IC₅₀ de 24,63; 22,68; 31,09; 22,27 e 11,20 µg/mL, respectivamente, representados na figura 17.

A naftoquinona que se mostrou com maior atividade Leishmanicida foi a NAF 31, chegando a uma média de 83% de inibição, já na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$, enquanto as demais, não passaram de 67% de inibição nesta mesma concentração.

Figura 17: Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em *Leishmania amazonensis* pelo método quantitativo direto.



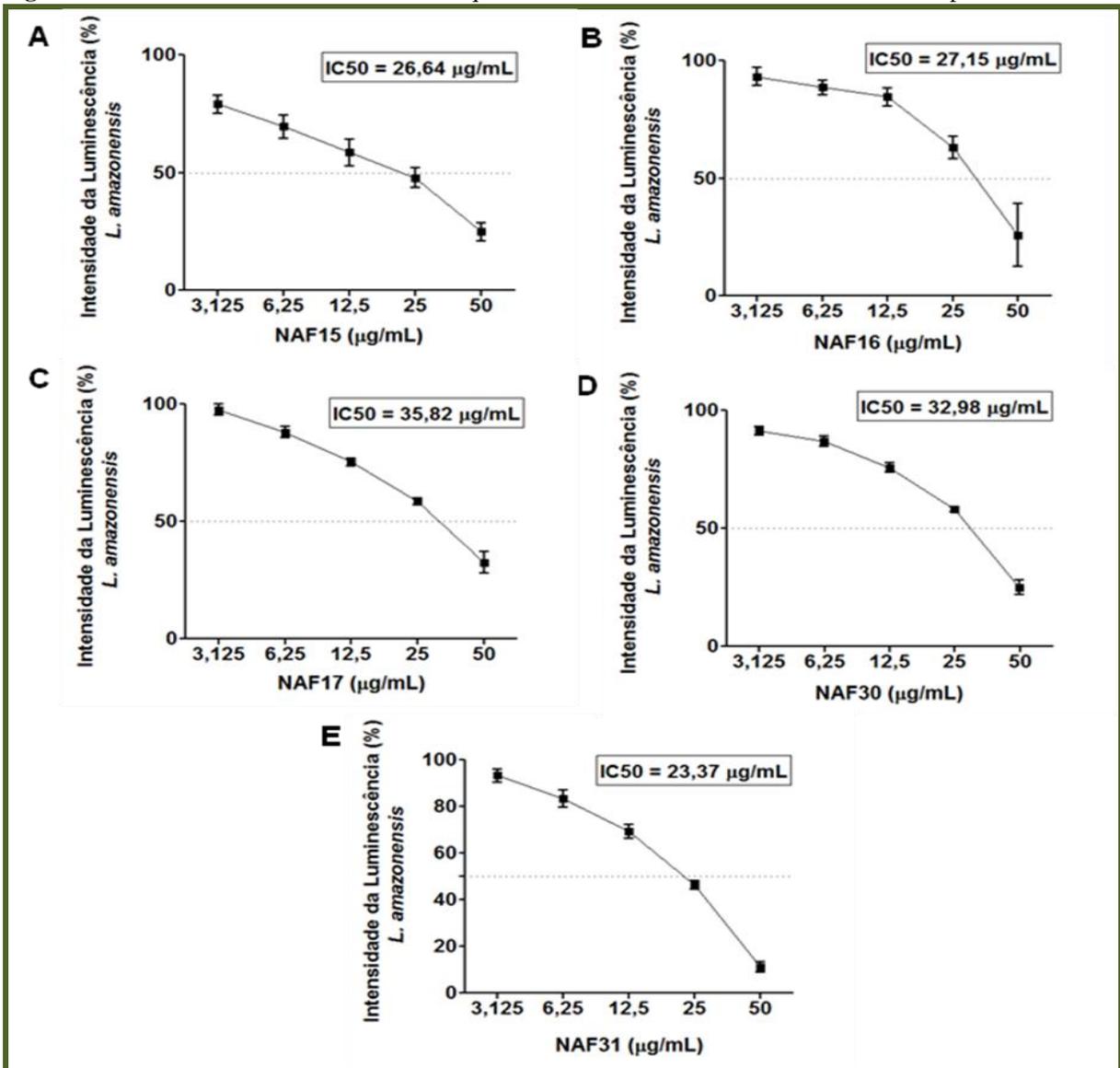
Legenda: Efeito *in vitro* das naftoquinonas 15 (A), 16 (B), 17 (C), 30 (D) e 31 (E), com seus respectivos valores de IC_{50} , testadas em formas promastigotas de *L. amazonensis* em diferentes concentrações, através do método direto, em três experimentos independentes em triplicata. Todos os experimentos foram significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: A autora (2014).

4.2.2 Teste de luminescência

A droga que apresentou menor citotoxicidade nas promastigotas de *L. amazonensis* tanto pelo método de contagem em câmara de Neubauer quanto pelo método de luminescência, foi a NAF17, com valores de IC₅₀ iguais a 31,09 e 35,82 µg/mL respectivamente para os diferentes métodos. As demais substâncias testadas, a NAF15, NAF16 e NAF30, tiveram valores de IC₅₀ iguais a 26,64; 27,15 e 32,98 µg/mL respectivamente pelo método de luminescência (Figura 18).

Figura 18: Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em *Leishmania amazonensis* por luminescência.



Legenda: Porcentagem de inibição da luminescência em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com naftoquinonas sintéticas NAF15 (A), NAF16 (B), NAF17 (C), NAF30 (D) e NAF31 (E) em diferentes concentrações e suas respectivas IC₅₀. A porcentagem de inibição foi calculada comparando-se com a luminescência do controle. Os pontos representam a média de três independentes em triplicata ± E.P.M. Todos os experimentos foram significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: A autora (2014).

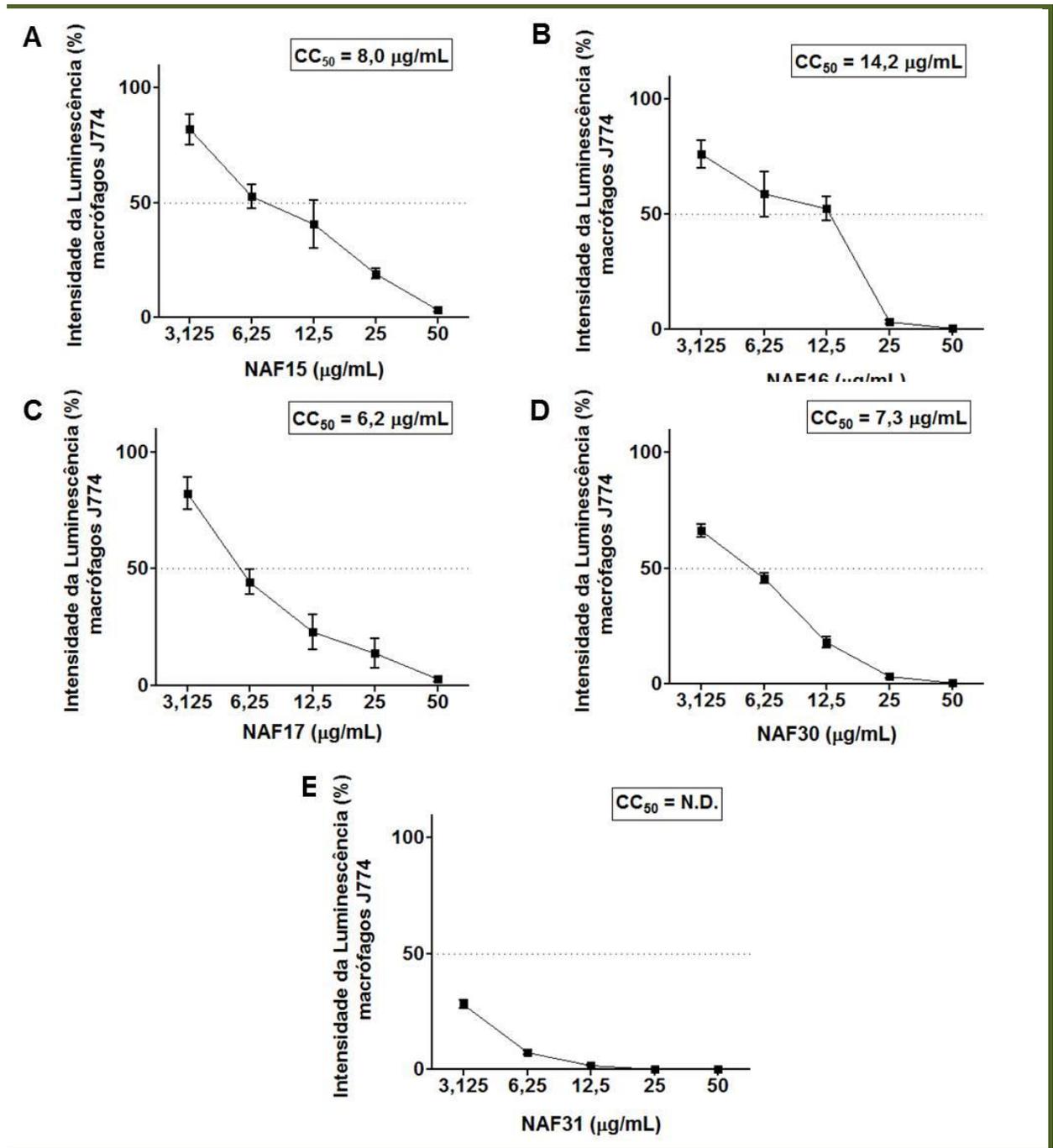
4.3 Citotoxicidade em células de mamífero

4.3.1 Macrófagos murinos da linhagem J774

Da mesma forma que avaliamos a viabilidade celular de formas promastigotas da *L. amazonensis*, utilizando o método de inibição da luminescência, avaliamos a viabilidade de macrófagos murinos de cultivo, da linhagem J774, pelo mesmo método (Figura 19).

A substância que teve menor intensidade do sinal luminoso, ou seja, a que se mostrou mais tóxica para as células de linhagem J774, foi a NAF31, apresentando um valor de CC_{50} abaixo de 3,12 $\mu\text{g/mL}$. As demais naftoquinonas, NAF 15, NAF 16, NAF 17 e NAF 30 demonstraram valores de CC_{50} de 8,0; 14,2; 6,2 e 7,3 respectivamente.

Figura 19: Citotoxicidade das naftoquinonas sintéticas pelo método de luminescência em macrófagos murinos da linhagem J774.



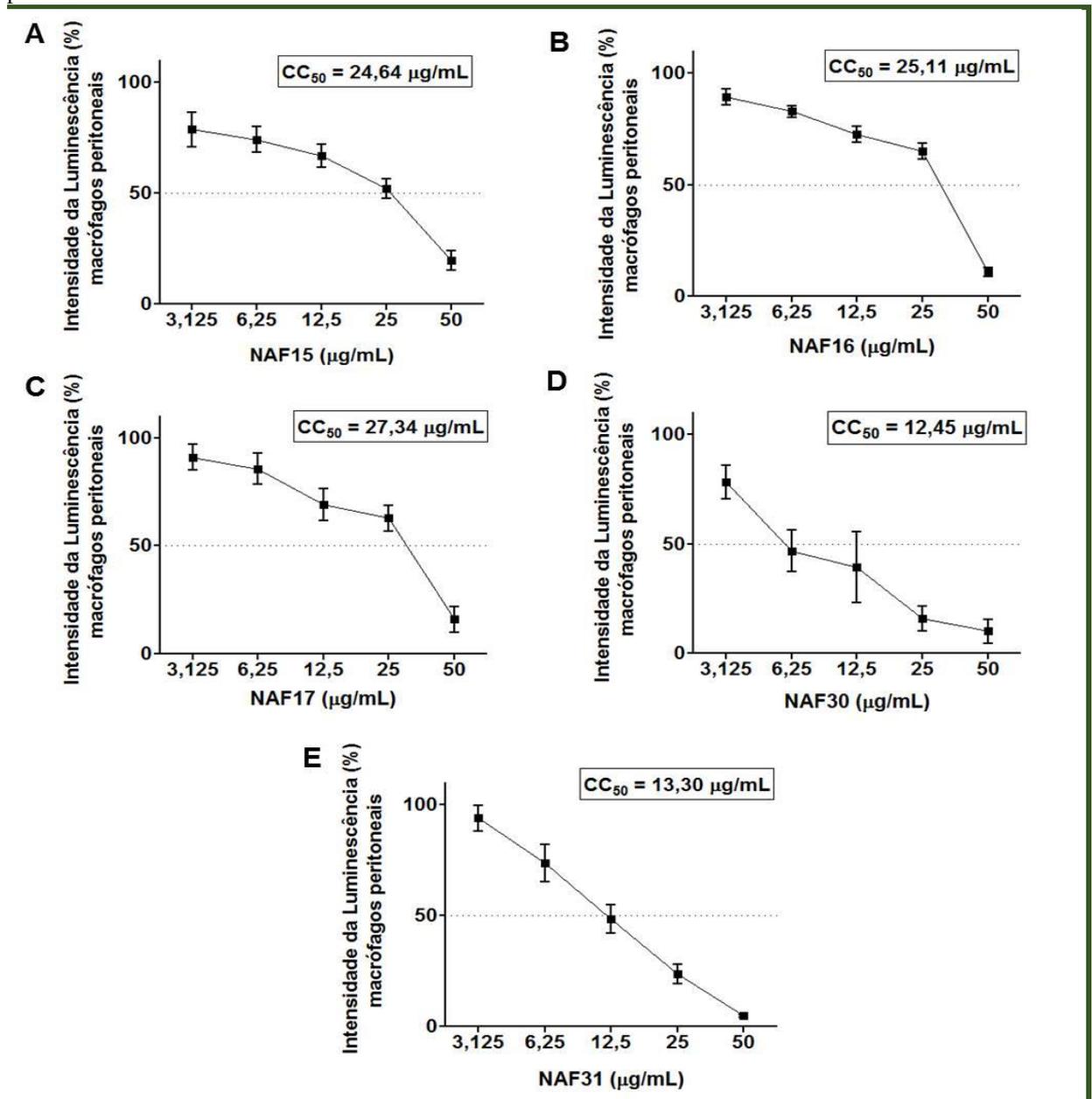
Legenda: Efeito *in vitro* das naftoquinonas sintéticas sobre a produção de ATP de macrófagos murinos de cultivo da linhagem J774, por ensaio de luminescência. A intensidade de luminescência foi calculada comparando os grupos tratados com as substâncias NAF 15 (A), NAF16 (B), NAF 17 (C), NAF 30 (D) e NAF 31 (E), com a intensidade de luminescência do controle. Os pontos representam a média de dois experimentos independentes em quadruplicata \pm E.P.M. Todos os experimentos foram significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: A autora (2014).

4.3.2 Macrófagos peritoneais de murinos BALB/c

Utilizamos outro modelo de célula de mamífero, para avaliar a citotoxicidade das naftoquinonas em estudo. Optamos por células que não fossem de cultivo celular, escolhendo macrófagos peritoneais, também pelo método de luminescência (Figura 20), semelhante à avaliação de viabilidade de macrófagos murinos de cultivo, da linhagem J774.

Figura 20: Citotoxicidade das naftoquinonas sintéticas pelo método de luminescência em macrófagos peritoneais.



Legenda: Efeito *in vitro* das naftoquinonas sintéticas sobre a produção de ATP de macrófagos peritoneais, por ensaio de luminescência. A porcentagem de inibição foi calculada comparando com a luminescência do controle. Os pontos representam a média de dois experimentos independentes em quadruplicata \pm E.P.M. Todos os experimentos foram significativos ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Fonte: A autora (2014).

Os macrófagos peritoneais demonstraram-se consideravelmente mais resistentes, do que quando comparamos com macrófagos de cultivo.

No modelo celular de macrófago peritoneal, a substância que demonstrou maior ação citotóxica foi a NAF30, com valor de $CC_{50} = 12,45\mu\text{g/mL}$ seguida da NAF31, que apresentou uma citotoxicidade para 50% das células, de $13,30\mu\text{g/mL}$, valores estes consideravelmente maiores do que os valores encontrados quando utilizamos as células de cultivo da linhagem J774.

4.4 Índice de seletividade

Os índices de seletividade para formas promastigotas em relação aos macrófagos de cultivo da linhagem J774, bem como com macrófagos peritoneais, tanto por contagem em câmara de Neubauer, quanto por luminescência, estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Quando comparamos o índice de seletividade das formas promastigotas da espécie de *Leishmania* avaliada neste trabalho, em relação ao índice de seletividade obtido pelo valor da IC_{50} obtida pelo método direto, sobre as células de cultivo da linhagem J774, os valores do ISe diminuíram para todas as naftoquinonas sintéticas testadas. Os valores de IS encontrados para as NAF 15, NAF 16, NAF 17, NAF 30 e NAF 31, por contagem na câmara de Neubauer em relação às células da linhagem J774 foram 0,32; 0,62; 0,20; 0,32 e 0,28 respectivamente. Porém, esses índices caem quando avaliamos os valores de IC_{50} obtidos através do método de citotoxicidade por luminescência, para os valores 0,30; 0,52; 0,17; 0,22, para as NAF 15, NAF 16, NAF17 e NAF 30, e para a NAF 31, não foi possível calcular o índice de seletividade, uma vez que o valor da CC_{50} não foi detectado, por estar abaixo da menor concentração testada.

Tabela 2: Atividade leishmanicida e citotóxica em macrófagos J774 e índice de seletividade das naftoquinonas. Os valores foram calculados por regressão linear (\pm desvio padrão). Todos os valores apresentam $p < 0,0001$.
Fonte: A autora (2014).

	Produção de ATP (luminescência)			Contagem direta em câmara de Neubauer	
	Macrófago J774* CC ₅₀ (µg/mL)	Promastigota IC ₅₀ (µg/mL)	IS	Promastigota IC ₅₀ (µg/mL)	IS**
NAF 015	8,0 \pm 3	26,64 \pm 11,9	0,30	24,63 \pm 8,9	0,32
NAF 016	14,20 \pm 3,8	27,15 \pm 2,4	0,52	22,68 \pm 5,9	0,62
NAF 017	6,20 \pm 2,0	35,82 \pm 5,7	0,17	31,09 \pm 3,7	0,20
NAF 030	7,30 \pm 0,3	32,98 \pm 3,9	0,22	22,27 \pm 6,4	0,32
NAF 031	-	23,37 \pm 7,7	-	11,20 \pm 1,4	0,28

Tabela 3: Atividade leishmanicida e citotóxica em macrófagos peritoneais e índice de seletividade das naftoquinonas sintéticas testadas. Os valores foram calculados por regressão linear (\pm desvio padrão). Todos os valores apresentam $p < 0,0001$.

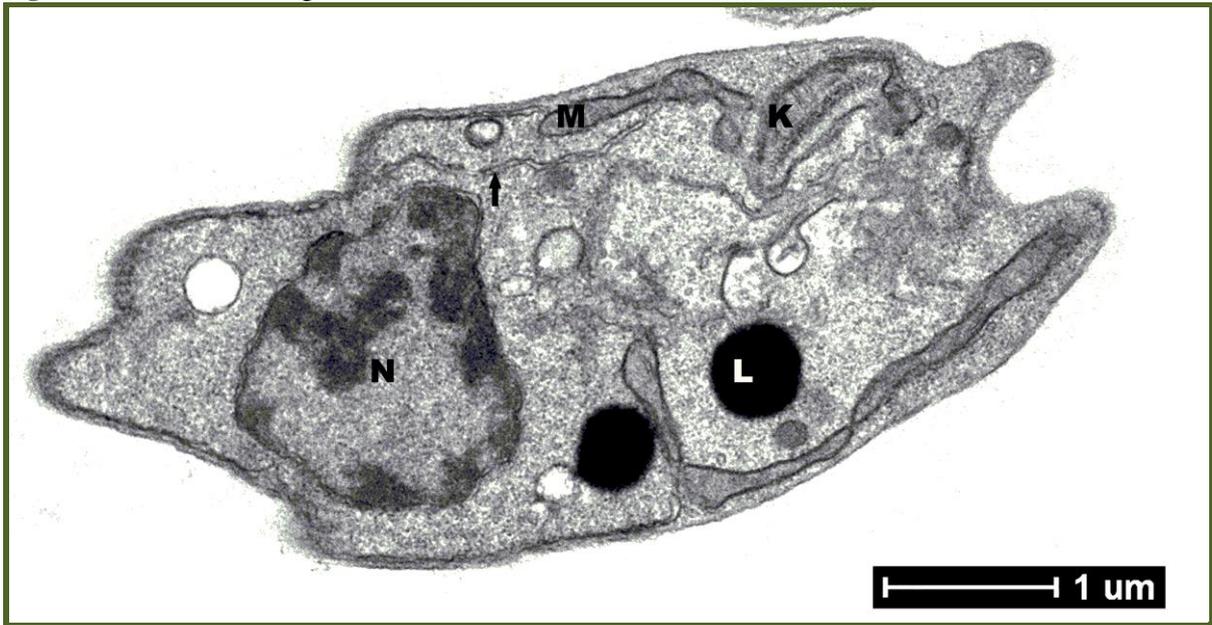
	Produção de ATP (luminescência)			Contagem direta em câmara de Neubauer	
	Macrófago Peritoneal CC ₅₀ (µg/mL)	Promastigota IC ₅₀ (µg/mL)	IS	Promastigota IC ₅₀ (µg/mL)	IS
NAF 015	24,46 \pm 2,9	26,64 \pm 11,9	0,92	24,63 \pm 8,9	1,0
NAF 016	25,11 \pm 2,3	27,15 \pm 2,4	0,92	22,68 \pm 5,9	1,1
NAF 017	27,34 \pm 0,3	35,82 \pm 5,7	0,76	31,09 \pm 3,7	0,87
NAF 030	12,45 \pm 5,7	32,98 \pm 3,9	0,37	22,27 \pm 6,4	0,56
NAF 031	13,30 \pm 2,8	23,37 \pm 7,7	0,57	11,20 \pm 1,4	1,18

Fonte: A autora (2014).

4.5 Análise ultraestrutural das promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com as naftoquinonas 15, 16 e 17.

Alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. Amazonensis* tratadas com as naftoquinonas sintéticas (NAF 15, NAF 16 e NAF 17) foram observadas através da análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão. Parasitas controles apresentaram morfologia e forma normais, citoplasma homogêneo e eletrôn-denso, mitocôndria e cinetoplasto característicos e bem preservados, presença de vacúolos e inclusões lipídicas e núcleo evidente (Figura 21).

Figura 21: Forma Promastigota de *L. amazonensis* controle

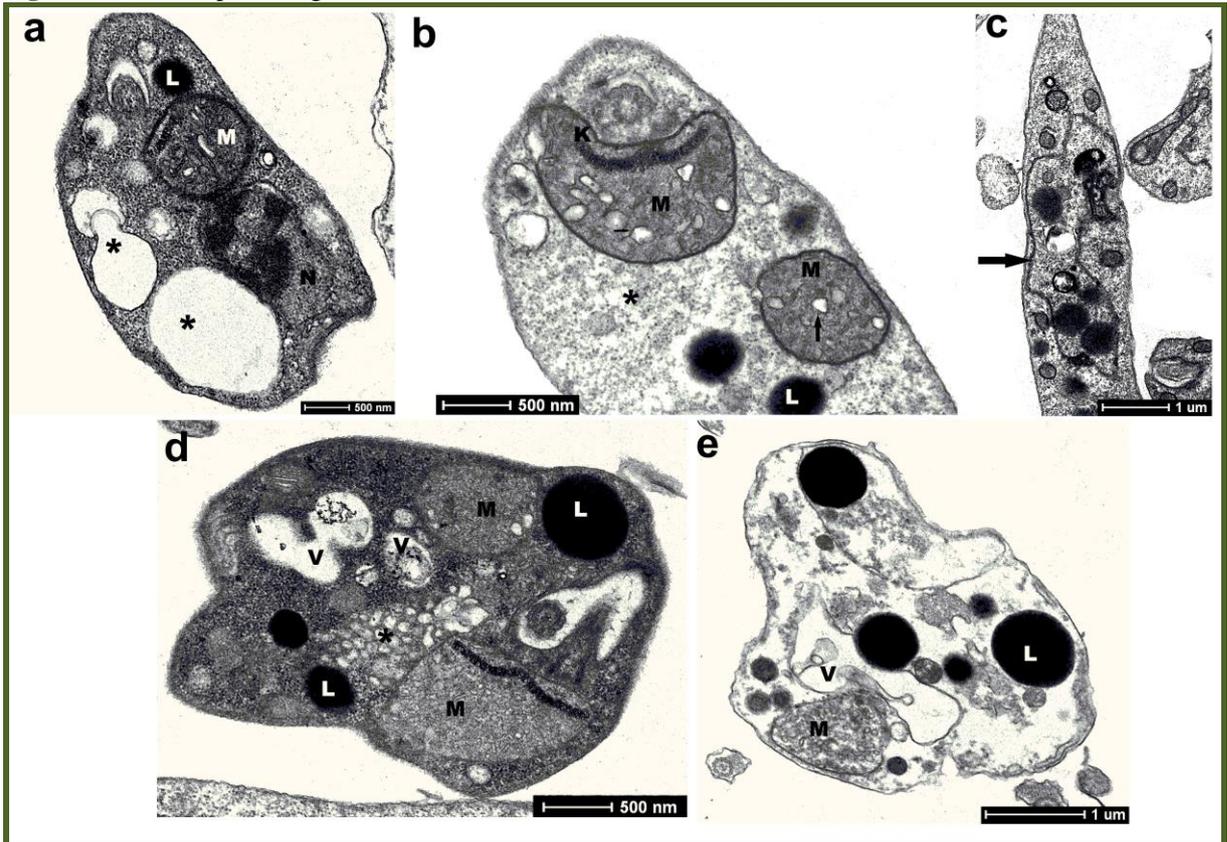


Legenda: Promastigota controle apresentando forma alongada, cinetoplasto (**K**) em forma de bastão. Núcleo evidente (**N**) e citoplasma homogêneo e eletrondenso. Perfis de retículo endoplasmático (**seta**), mitocôndria (**M**) e inclusões lipídicas (**L**) também podem ser observados.

Fonte: A autora (2014).

Formas promastigotas tratadas com NAF 15, NAF 16 E NAF 17 mostraram efeitos semelhantes, embora com diferentes níveis de alterações variando de acordo com a concentração e a naftoquinona testada. As alterações mais observadas foram: desorganização geral da célula com considerável aumento do volume celular, aparecimento de espaços eletrondifusos no citoplasma, inchaço e desorganização da estrutura da mitocôndria, com vesiculização em seu interior, aumento das inclusões lipídicas e aparecimento de vacúolos com perfis de membrana (Figuras 22, 23 e 24).

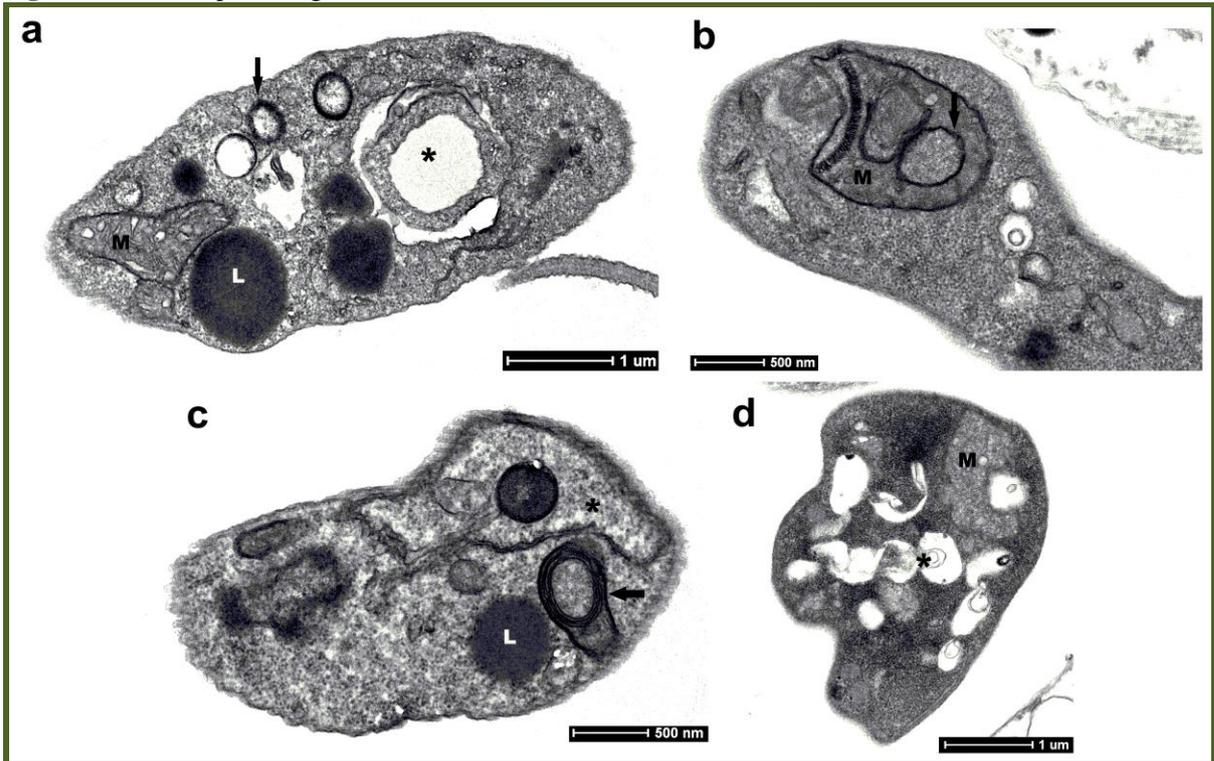
Figura 22: Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a IC₅₀ de NAF 15.



Legenda: Promastigotas tratadas com a IC₅₀ de NAF 15. (a) Célula apresentando grandes vacúolos no citoplasma (*), intumescimento da mitocôndria (M) e núcleo desorganizado (N). (b) Detalhe de uma célula com uma intensa desorganização interna, e perda de material citoplasmático (*). Mitocôndria intumescida (M) com vesiculização das cristas mitocôndrias (seta). (c). Detalhe da promastigota mostrando a presença de retículo endoplasmático circundando organelas (seta). (d) Célula com um grande aumento de volume da mitocôndria (M), presença de vacúolos com material em seu interior (V), aumento das inclusões lipídicas (L) e vesiculização do citoplasma (*). (e) Célula drasticamente alterada com perda de conteúdo citoplasmática, presença de vacúolos (V), mitocôndria intumescida com perda de matriz (M) e inclusões lipídicas preservadas (L).

Promastigotas tratadas com 2 x IC₅₀ da NAF 15, demonstraram alterações significativas na mitocôndria, com intumescimento e desorganização da mesma, além do inchaço mitocondrial e desorganização das cristas mitocondriais. Também foi possível observar desorganização do citoplasma, e estrutura semelhante à vesícula autofágica com grande quantidade de material citoplasmático em seu interior (Figura 23)

Figura 23: Formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 2X a IC₅₀ da NAF 15

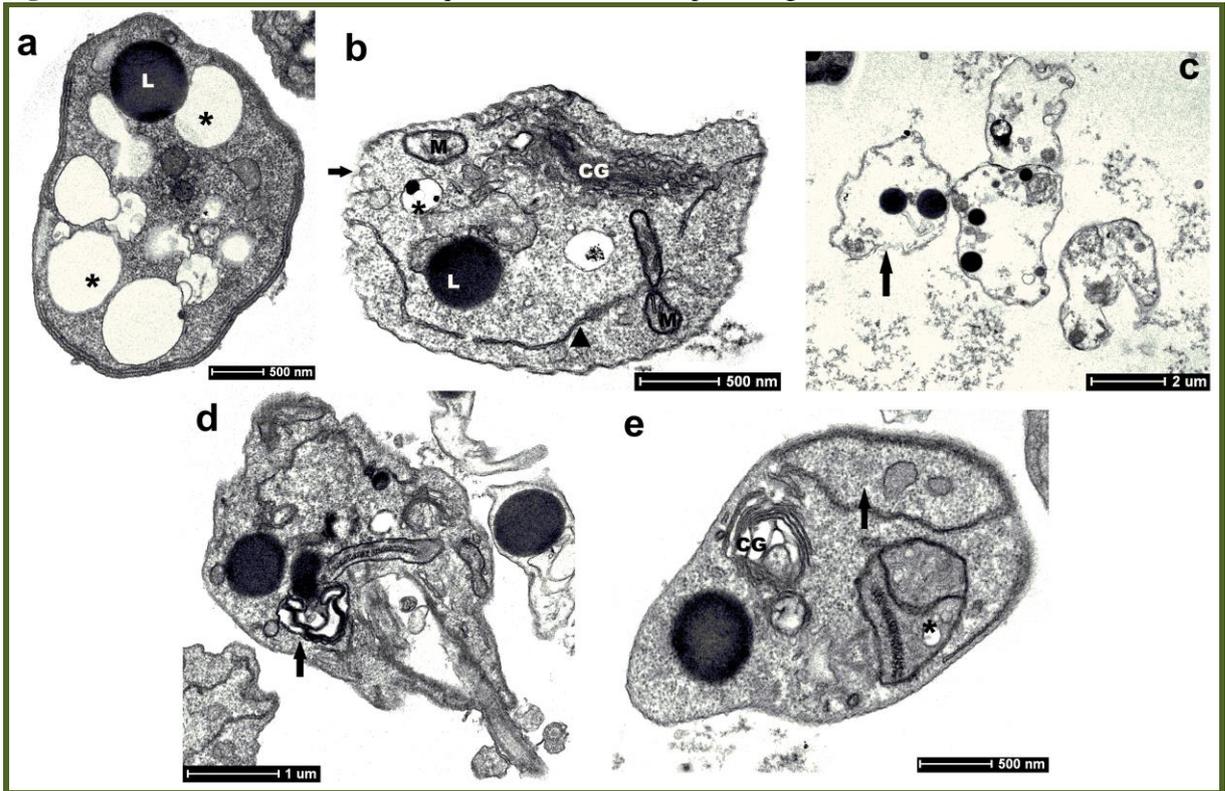


Legenda: Promastigotas tratadas com 2 x IC₅₀ de NAF 15 **(a)** Tratamento com 2 x IC₅₀ de NAF 15 induziu o intumescimento da mitocôndria e desorganização das cristas mitocondriais (**M**), aumento das inclusões lipídicas (**L**). Presença de estrutura semelhante à vesícula autofágica com grande quantidade de material citoplasmático em seu interior (*) e vesículas (seta). **(b)** Detalhe de uma célula mostrando o inchaço da mitocôndria (**M**) com a presença de membrana em seu interior (seta). **(c)** Promastigota com desorganização das cristas mitocondriais formando membranas concêntricas no interior desta organela (seta). Nota-se a presença de perfis de retículo endoplasmático circundando nucleoplasma (*) e presença de inclusão lipídica (**L**). **(d)** Célula com desorganização do citoplasma, surgimento de espaços eletrólucos com perfis membranosos em seu interior (*) e intumescimento da mitocôndria (**M**).

Fonte: A autora (2014).

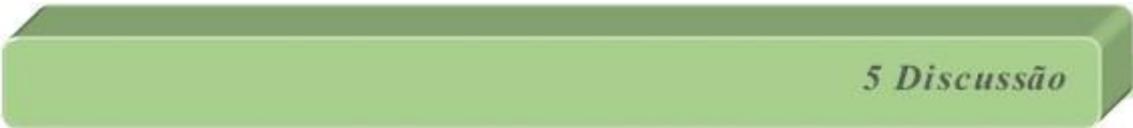
Além destas alterações, células tratadas com a IC₅₀ de NAF 16 e NAF 17 apresentaram desorganização do complexo de Golgi, entumescimento do retículo endoplasmático, desorganização das cristas mitocondriais com formação de membranas concêntricas no interior desta organela semelhantes a figuras mielínicas (Figura 24). O efeito com 2 x IC₅₀ de NAF 16 e NAF 17 foi totalmente deletério para os parasitas, com ausência de células íntegras.

Figura 24: Efeito de 1X a IC_{50} das naftoquinonas 16 e 17 sobre promastigotas de *Leishmania amazonensis*.



Legenda: (a-c) Promastigotas tratadas com a IC_{50} de NAF 16. (a) Célula com desorganização do citoplasma, surgimento de grandes vacúolos com perfis membranosos em seu interior (*), retículo endoplasmático intumescido e localizado abaixo da membrana plasmática (seta). (b) Promastigota mostrando desorganização e ruptura do complexo de golgi (CG), fragmentação do material do acidocalcisoma (*), intumescimento da mitocôndria (M) e do retículo endoplasmático (cabeça da seta) e ondulação da membrana plasmática (seta). (c) Detalhe mostrando células em avançado estágio de desintegração (setas). (d-e) Promastigotas tratadas com a IC_{50} de NAF 17. (d) Observam-se drásticas alterações no parasita como perda de material citoplasmático com a presença de vacúolo com grande quantidade de perfis de membrana em seu interior (seta). (e) Promastigota com desorganização do complexo de golgi (CG), intumescimento da mitocôndria com perda das cristas mitocondriais (seta) e vesiculização na região da mitocôndria próxima ao cinetoplasto (*).

Fonte: A autora (2014).



5 Discussão

5.1 Comparação entre controle e controle com DMSO a 1%

Os compostos foram diluídos em DMSO em uma concentração final de 1%. A definição sobre qual concentração final deve ser utilizada deste diluente para que não haja influência destes resultados da citotoxicidade, ainda é muito divergente entre os trabalhos.

Alguns autores citam que, para atividade Tripanocida, a concentração final de DMSO para as soluções finais de diferentes quinonas, não deve exceder 0,5%, pois já seria danoso para as células (SILVA JÚNIOR, 2010; MENNA-BARRETO et al, 2009).

O grupo de pesquisa de Lima (2004), utilizou 1,4% de DMSO em seus experimentos para testar atividade Leishmanicida do Lapachol, isolapachol e dihidrolapachol e afirmou que essa concentração não foi tóxica para os parasitas, baseando-se em outro autor e colaboradores, o Canto-Cavalheiro et al, 1997, afirmaram que essa concentração não é danosa para o modelo biológico experimental.

Outros pesquisadores utilizaram uma concentração de 1% de DMSO, e não relatam efeitos deletérios, como demonstra o grupo de Ribeiro e colaboradores, 2009.

Os resultados encontrados neste trabalho reforçam a ideia de que, quando optamos por trabalhar com um diluente para nossas substâncias teste, que este diluente se mostra com valores tóxicos bastante controversos na literatura, é importante que tenhamos sempre um grupo controle com as células alvo e o diluente na concentração maior a ser utilizada.

Estes resultados indicaram ainda que, além da concentração final do diluente, é importante lembrar que essa resposta citotóxica também pode variar de acordo com o modelo experimental utilizado, ou seja, a morte celular apresentada no grupo controle com solvente das drogas testes, pode ter valores estatisticamente significativos, dependendo da célula testada (demonstrado nos grupos de células de cultivo, principalmente dos macrófagos murinos de cultivo, da linhagem J774) (WEYERMANN et al, 2004).

Alguns estudos demonstraram que o DMSO pode potencializar o efeito da droga teste, o que acreditamos que pode ter acontecido com as NAF 15 e NAF 31 nas células da linhagem J774, uma vez que elas já se mostraram mais intolerantes aos efeitos das naftoquinolonas (CORTÊS et al, 2012; WEYERMANN et al, 2004).

Diversos trabalhos citam que a potencialização de drogas pelo DMSO, tanto pode ser positiva, atuando como coadjuvante na eliminação de radicais livres produzidos pelos microrganismos, como pode ser negativa, pois combinado com agentes tóxicos, a toxicidade do DMSO que, a princípio era considerada baixa, pode aumentar significativamente, pelo seu efeito farmacológico importante de auxiliar a penetração rápida e acentuada de outras substâncias

através das membranas biológicas (BRAYTON, 1986; MUYR, 1996; CORTÊS, 2008; CARDOSO 2008). Dessa forma, o fato das células de linhagem J774 terem sido significativas estatisticamente quando comparamos o controle sem tratamento e o controle com DMSO, reforça a ideia de que células de cultivo são mais sensíveis do que os macrófagos peritoneais. Os valores de CC₅₀ consideravelmente mais baixos no modelo celular de cultivo, quando se compara aos macrófagos peritoneais, vêm reforçar ainda mais essa conclusão, uma vez que esses modelos de cultivo se mostraram bem mais sensíveis a toxicidade não só das naftoquinonas testadas, mas também ao diluente das drogas, o DMSO.

5.2 Atividade Leishmanicida das naftoquinonas sintéticas em *Leishmania amazonensis*

Neste estudo, selecionamos a *L. amazonensis* para nossos experimentos *in vitro* pois apesar de não ser a espécie de *Leishmania* mais fatal, causa sérias lesões desfigurantes em animais, bem como nos seres humanos, ocasionando grande impacto psicossocial do indivíduo (GONTIJO E CARVALHO, 2003; BASANO, 2004; CAMARGO, 2003; BARRETO, 1984; SOUZA A., 2009). Além disso, a Leishmaniose Cutânea é a mais amplamente distribuída no mundo, e além do Brasil encontra-se junto com Afeganistão, Argélia, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, com 70 a 75% da incidência global estimada para LC (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2014).

As drogas utilizadas atualmente ocasionam diversos efeitos colaterais e vêm demonstrando resistência dos parasitas a esses medicamentos, como os antimoniais pentavalentes (AMATO et al, 2008; OUWELLETTE et al, 2004). Para isso, avaliamos *in vitro* a atividade de cinco naftoquinonas derivadas do lapachol, no intuito de descobrir novas alternativas através de screening sobre as leishmanias.

Nossos compostos demonstraram importante atividade leishmanicida das cinco naftoquinonas sintéticas testadas (NAF 15, NAF 16, NAF 17, NAF 30 e NAF31) nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. A NAF 31 teve a maior ação leishmanicida, porém, nos dois modelos de macrófagos testados, elas demonstraram-se bastante citotóxicas, corroborando com Kayser e colaboradores 2000, quando afirmam que o potencial da utilidade das naftoquinonas é limitada, pela sua alta citotoxicidade. Entretanto, a droga bastante utilizada atualmente como drogas de segunda escolha para o tratamento da Leishmaniose em humanos, quando o paciente não responde ao tratamento de primeira escolha com os antimoniatos pentavalentes, a

Pentamidina (SUNDAR, 2010), foi demonstrado, ser altamente tóxica *in vitro* contra macrófagos peritoneais, assim como *in vivo* por Temporal e colaboradores (2002).

As naftoquinonas e seus derivados têm sido estudadas como agentes leishmanicidas, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (LOISEAU, 2011; DA SILVA et al, 2009; LIMA et al, 2004; NAKAYAMA et al, 2005; TEIXEIRA et al, 2004).

No estudo da Teixeira 2001, eles demonstraram que o Lapachol teve maior atividade anti-amastigota e foi menos citotóxico para os macrófagos do que o Pentostan (estibogluconato de sódio), um dos antimoniais pentavalentes utilizados atualmente no tratamento das Leishmanioses.

Lima e colaboradores (2004) demonstraram atividade leishmanicida do Lapachol, do isolapachol e diidrolapachol, juntamente com derivados solúveis (sal de potássio) e acetato. Os compostos foram testados sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Todos os compostos apresentaram atividade leishmanicida significativa, sendo o acetato isolapachol o mais promissor, com IC₅₀ em 24 horas de 1,6 µg/mL e 3,4 µg/mL para as *L. amazonensis* e *braziliensis* respectivamente.

Em um estudo realizado *in vitro* sobre a atividade tripanocida do Lapachol e outras naftoquinonas, usando *Tripanosoma cruzi* e *Crithidia fasciculata*, foi observado que o Lapachol tem pouca atividade e os mais ativos são a β-lapachona e alil- β-lapachona (LOPES et al, 1978; TEIXEIRA, et al, 2001).

O principal mecanismo proposto para a ação Leishmanicida das naftoquinonas é a estimulação do estresse oxidativo e alquilação de nucleófilos celular, que abrangem uma grande variedade de biomoléculas. Espécies reativas de oxigênio (ROS) podem reagir diretamente com o DNA, lípidos e proteínas, conduzindo a danos celulares (PINTO e CASTRO, 2009; SILVA et al, 2003). Santana e colaboradores propuseram que o Lapachol tem mecanismo de ação semelhante a outras quinonas (benzoquinonas) como inibidor da oxidação e fosforilação mitocondriais.

Diversos pesquisadores têm estudado a influência de diferentes substituintes em várias posições diferentes de moléculas de naftoquinonas sintéticas (TIKKANEN et al., 1983; DA COSTA MEDINA et al, 2008). Assim, as naftoquinonas estudadas podem vir a serem potentes agentes Leishmanicidas, talvez com modificações em sua estrutura química, para tentar minimizar seus efeitos tóxicos ou através de veículos que minimizem sua citotoxicidade na célula hospedeira como por exemplo, nanopartículas.

Acredita-se que o antimoniato de meglumine pentavalente, droga de escolha atualmente

para as leishmanioses, seja reduzido a antimoniato trivalente e este apresente atividade Leishmanicida. Propõem-se que esta redução ocorra no citoplasma do macrófago ou diretamente na membrana do protozoário na forma amastigota (OUELLETTE, 2004)

As cinco naftoquinonas testadas neste trabalho são hidroxinaftoquinonas, porém derivadas do Lapachol, e todas elas demonstraram atividade leishmanicida concentração-dependente sobre a *L. amazonensis*. Algumas hidroxinaftoquinonas, como o Atovaquone, mostrou ter uma atividade concentração-dependente contra *Leishmania infantum* (JERNIGAN et al. 1996), enquanto que a atividade *in vivo* em um modelo murino manteve-se baixa (CAUCHETIER et al. 2000).

5.3 Comparação da atividade citotóxica pelo teste de contagem direta em câmara de Neubauer e o teste de luminescência

Nos nossos experimentos, tivemos diferenças estatísticas significativas no valor da concentração da droga que mata 50% das células, quando avaliamos esses valores pelo método de contagem direta em câmara de Neubauer, uma vez que, a avaliação da citotoxicidade das naftoquinonas, pelo método de contagem na câmara de Neubauer, apresentou valores de IC₅₀ mais baixo, para todos os compostos, quando comparado ao método de luminescência.

Atualmente, tem crescido a diversidade de testes de citotoxicidade para determinar a concentração citotóxica de diversas substâncias. Contudo, esses testes são frequentemente instáveis ou requerem amostras celulares consideravelmente altas e consomem muito tempo para serem executados

A IC₅₀ para as promastigotas, quando avaliada por método direto em câmara de Neubauer, tiveram valores menores, para as cinco naftoquinonas, quando comparamos com o valor da IC por teste de inibição da luminescência. Esses resultados confirmam uma maior especificidade do teste de luminescência, para avaliação de citotoxicidade em modelos biológicos, concordando com Weyermann e colaboradores, 2004, quando este grupo de pesquisadores comparou quatro métodos de citotoxicidade diferentes e chegaram a conclusão de que a avaliação por teste de inibição da luminescência foi a de maior sensibilidade. O teste de citotoxicidade por luminescência, exige a adição de um único reagente, sem a necessidade de lavagens das células ou retirada do meio de cultivo, além de não se fazer necessária inúmeras pipetagens, minimizando a probabilidade de erros, fornecendo resultando mais seguros, corroborando com Cunha et al,

2013, quando afirmam que o teste rápido baseado em ATP-bioluminescência é um teste mais sensível, específico e de rápida execução.

Mueller e colaboradores (2004) compararam três métodos de avaliação de citotoxicidade: MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), ATP e calceína) em células tumorais. Eles observaram que os resultados foram semelhantes entre os três métodos. Porém, eles enfatizaram as vantagens e desvantagens de cada método. O método de citotoxicidade por calceína requer muito mais tempo para o período de incubação das amostras, quando se compara com os métodos MTT e ATP. Eles também enfatizaram, a desvantagem do método MTT pois alegam que os danos mitocondriais podem diminuir a capacidade do MTT ser reduzido à saís de Formazan. Também afirmam que o método de ATP foi o mais sensível dos três métodos descritos e, o rápido resultado por este método, reforça a maior vantagem deste, como método de avaliação de citotoxicidade. Porém, a desvantagem dele é o alto custo.

Corroborando com Parvez e colaboradores, (2006), nossos estudos reforçam que testes de citotoxicidade através de inibição da luminescência por quantificação de moléculas de ATP são testes mais sensíveis, rápidos e fáceis de serem executados.

Para trabalhar com teste de citotoxicidade, deve-se avaliar também que resultados falso-positivos podem ocorrer, bem como falso-negativos, dependendo do modelo celular que estamos avaliando, corroborando com Parvez e colaboradores, 2006.

Em nosso estudo, no entanto, utilizamos um teste de citotoxicidade verificando a intensidade da luminescência, que utiliza uma luciferase estável, *Photuris pennsylvanica* (LucPpe2) As características únicas deste projeto mutante (LucPpe2m) permitiu uma abordagem única de um reagente único, mais estável e promovendo reação mais homogênea. Propriedades deste KIT de luminescência, permite que este reagente supere os problemas causados por fatores como ATPases, que interferem na medição do ATP em extratos celulares. O reagente fornece uma luminescência sensível e estável para realizar ensaios de ATP, que demonstrou diferença na concentração citotóxica necessária das naftoquinonas para matar 50% das células da linhagem J774, aparentando uma maior sensibilidade dessas células de linhagem, em relação aos macrófagos peritoneais, Ao avaliarmos essas células em Microscópio óptico invertido, as mesmas encontravam-se bastante disformes e bastante vacuolizadas, nas duas menores concentrações (3,12 e 6,25 µg/mL). Nas concentrações de tratamento de 12,5 25 µg/mL, observou-se um número bem reduzido de células íntegras, chegando a nenhuma célula na concentração de 50 µg/mL.

Nossos resultados vão de encontro ao que Andreotti e Cree (1997) sugeriram, pois eles acreditam que células naturais são mais susceptíveis de apresentarem resistência à toxicidade do

que linhagens celulares. Estes autores acreditam que este fato é frequentemente devido às condições de elevada taxa de crescimento em que as células de linhagem são cultivadas. Uso de meios livres de soro e sem fatores de crescimento adicionados diminuem a taxa de crescimento e podem alterar a sensibilidade a fármacos citotóxicos. Contudo, nossos resultados, utilizando teste de luminescência, que tem sido confirmado por diversos autores como sendo um método bastante sensível e confiável, demonstraram o contrário, pois as células de linhagem J774, quando expostas às substâncias testadas, tiveram valores de IC₅₀, para todas as substâncias, consideravelmente menores, do que os valores de IC₅₀ expressados pelos macrófagos peritoneais, que apresentaram valores de CC₅₀ bem acima dos valores apresentados pelas células de linhagem. Sugerindo assim, uma maior susceptibilidade das células de linhagem à ação citotóxica das drogas testes.

5.4 Avaliação ultraestrutural das promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas ou não com as naftoquinonas.

A microscopia eletrônica tem se mostrado uma ferramenta útil e confiável na investigação de novos fármacos para leishmanioses, tanto para avaliar as alterações morfológicas quanto identificar as organelas-alvo. Neste estudo foi possível observar que as formas promastigotas de *L. amazonensis* tratados com Naftoquinonas sofreram notáveis alterações morfológicas em comparação com parasitas não tratados. Tais alterações encontradas foram geralmente comuns a todas as naftoquinonas testadas, embora o grau de severidade variasse em função do tipo e das concentrações testadas, de maneira dose dependente.

As alterações morfológicas mais significativas foram desorganização geral da célula com considerável aumento do volume celular, aparecimento de espaços eletróluscentes no citoplasma, inchaço e desorganização da estrutura da mitocôndria, com vesiculação em seu interior, aumento das inclusões lipídicas e aparecimento de vacúolos com perfis de membrana. esvaziamento do citoplasma, e comprometimento da membrana celular.

A NAF 16 causou alterações ultraestruturais mais significativas, em relação às promastigotas tratadas com a NAF 17, com diferentes níveis de alterações, onde a maioria das células mostram-se já destruídas. Uma vez que, o valor para IC₅₀ da NAF 16 (27,15 µg/mL) foi menor do que o valor de IC₅₀ da NAF 17 (35,82 µg/mL). Dessa forma, a NAF 16 demonstrou ser mais potente contra formas promastigotas de *L. amazonensis* do que a NAF 17.

Alterações na mitocôndria como o intumescimento da mesma, desorganização de cristas mitocondriais foram observadas nas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 2 x IC₅₀ da NAF 15. Além disso, pode-se observar uma expressiva diminuição no número de células e estrutura semelhante à vesícula autofágica com grande quantidade de material citoplasmático em seu interior, alterações sugestivas de morte celular por autofagia. Da Silva e colaboradores (2009) afirmam que as naftoquinonas são conhecidas pela inibição do complexo das topoisomerasas, ocasionando o desencadeamento da morte celular. Reis e colaboradores (1999) sugerem que desordens na matriz mitocondrial podem estar relacionadas ao estresse oxidativo, além disso, as alterações na mitocôndria pode sugerir um efeito sobre os componentes estruturais desta organela, possivelmente proteínas ou enzimas de membrana. Segundo Santa-Rita et al. (2004).

- A substância NAF15 ($C_{32}H_{32}N_2O_3$) foi a que apresentou melhor ação Leishmanicida e apesar das drogas terem tido índice de seletividade abaixo de 1, todas elas apresentaram ação leishmanicida importante, o que nos fornece a possibilidade de termos um bom índice de seletividade em formas amastigotas em futuros estudos.

- A comparação entre métodos quantitativos de citotoxicidade para formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidas a diferentes concentrações de naftoquinonas sintéticas derivadas do lapachol, demonstrou que o teste de luminescência foi mais sensível.

- Macrófagos de linhagem J774 foram menos resistentes às diferentes naftoquinonas testadas, quando comparados com macrófagos peritoneais.

- Análises ultraestruturais das naftoquinonas testadas mostraram severas alterações nas formas promastigotas de *L. amazonensis* compatíveis com a perda da viabilidade e morte celular.

- AL-MOHAMMED, H. I.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. Production and characterization of stable Amphotericin B-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 8, p. 3274-3280, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, California, USA, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVES, L. A. et al. Are there functional gap junctions or junctional hemichannels in macrophages? **Blood**, New York, v. 88, p. 328-334, 1996.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1-9, 2008.
- AMATO, V. S. et al. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000.
- ANDRADE-NETO, V. F. de et al. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Bv. 14, n. 5, p. 1145-1149, 2004.
- ARÊAS, P. C. F. **Avaliação da atividade antitumoral de naftoquinonas**. 2007. 77 f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) – Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.
- ASCHE, C. Antitumour quinones. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, Bethesda MD - USA, v. 5, p. 449-467, 2005.
- BARRETTO, A. C. et al. Características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em uma região endêmica do estado da Bahia: II leishmaniose canina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 17, n. 2, p. 59-65, 1984.
- BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.
- BATES, P. The developmental biology of leishmania promastigotes. **Experimental Parasitology**, New York, v. 79, p. 215-218, 1994.
- BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**, Amsterdam, v. 15, n. 1, p. 22-28, 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2003.
- BURCHMORE, R. J.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by leishmania amastigotes. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 12, p. 1311-1320, 2001.

CAMARA, C. A. et al. Molluscicidal activity of 2-hidroxy-[1,4]-naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 80, p. 329-334, 2008.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKI, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 34-37, 2003.

CAMPO, R. do et al. Trypanosoma cruzi: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. **Experimental Parasitology**, New York, v. 42, n. 1, p. 142-149, 1977.

CAMPO, R. do, MORENO, S. N. The acidocalcisome. **Molecular and Biochemistry Parasitology**, Amsterdam, v. 114, p. 151-159, 2001.

CARDOSO, M. F. do C. Dimetilsulfóxido (CAS No. 67-68-5). **Revista Virtual de Química, Local**, v. 3, n. 4, p. 344-352, 2011.

CAUCHETIER, E. et al. Characterization of atovaquone resistance in *leishmania infantum* promastigotes. **International Journal of Parasitology**, Oxford, v. 32, p. 1043-1051, 2002.

CDC. **Parasites - leishmaniasis**. 2013. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 26 jan. 2014.

CORTÊS, J. de A.; PAES, A. C. Potencialização da isoniazida pelo dimetilsulfóxido (dmsO) no tratamento de hamsters (*Mesocricetus auratus*), experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis* (AN5). **Veterinária e Zootecnia**, v. 15, n. 3, p. 486-495, 2012.

COSTA MEDINA, L. F. da et al. Genotoxicity of aminohydroxynaphthoquinones in bacteria, yeast, and Chinese hamster lung fibroblast cells. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, NL, v. 650, n. 2, p. 140-149, 2008.

COURRET, N. et al. Biogenesis of *leishmania*-harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. **Journal of Cell Science**, London, v. 115, p. 2303-2316, 2002.

COUTINHO, M. T. Z. et al. Participation of *rhhipicephalussanguineus*(Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 128, n. 1-2, p. 149-155, 2005.

COUTINHO, M. T. Z.; LINARDI, P. M. Can fleas from dogs infected with canine visceral leishmaniasis transfer the infection to other mammals? **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 147, p. 320-325, 2007.

CROFT, S. L. et al. The activity of hydroxynaphthoquinones against *leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 30, p. 827-832, 1992.

CRUZ FONSECA, S. G. da; BRAGA, R. M. C.; DE SANTANA, D. P. Lapachol—química, farmacologia e métodos de dosagem. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 84, n. 1, p. 9-16, 2003.

- CUNHA, A. F. et al. Evaluation of microbiological quality of UHT milk drink and UHT milk cream by ATP-bioluminescence. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 65, n. 2, p. 595-600, 2013.
- CUNHA, J. C. L.; LIMA, J. W. O.; POMPEU, M. M. L. Transmissão domiciliar de leishmaniose tegumentar e associação entre leishmaniose humana e canina, durante uma epidemia na Serra de Baturité, no estado do Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 9, n. 4, p. 425-435, 2006.
- DAMA, L. B.; JADHAV, B. V. Efeito anti-helmíntico de Juglone em nana maduros e imaturos *Hymenolepis* em camundongos. **Rivista di Parassitologia**, Roma v. 2, p. 301-302, 1997.
- DASSONI, F. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis resembling borderline-tuberculoid leprosy: a new clinical presentation? **Acta Dermato-Venereologica**, Stockholm, v.1 , p. 1-4, 2012.
- DEANE, L. M.; DEANE, M. P. Visceral leishmaniasis in Brazil: geographical distribution and transmission. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 4, p. 198-212, 1962.
- DENKERS, E. Y.; BUTCHER, B. A. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. **Trends Parasitology Review**, Oxford, v. 21, n. 1, p. 35-41, 2005.
- DINNEN, R. D. et al. The search for novel anticancer agents: a differentiation-based assay and analysis of a folklore product. **Anticancer Research**, Athens, v. 17, n. 2A, p. 1027, 1997.
- DUBYAK, G. R.; DE YOUNG, M. B. Intracellular Ca²⁺ mobilization activated by extracellular ATP in Ehrlich ascites tumor cells. **Journal of Biology and Chemistry**, Baltimore - MD, v. 260, p. 10653-10661, 1985.
- FERREIRA, S. B. et al. β -lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 140-160 , abr./jun. 2010.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.
- FLUERARO, M. et al. Cytotoxicity and cytoprotective activity in naphthalenediols depends on their tendency to form naphthoquinones. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 39, p. 1368-1377, 2005.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Minas Gerais, v. 36, n. 1, p. 71-80, jan./fev. 2003.
- GRAMICCIA, M. Recent advances in leishmaniosis in pet animals: epidemiology, diagnostics and anti-vectorial prophylaxis. **Veterinary parasitology**, v. 181, n. 1, p. 23-30, 2011.
- GUIRAUD, P. et al. Comparison of antibacterial and antifungal activities of lapachol and beta-lapachone. **Planta Medica Journal**, Stuttgart, v. 60, n. 4, p. 373, 1994.

- HOLM, A. et al. *Leishmania donovani* promastigotes lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impairment translocation of PKCa and defective phagosome maturation. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 3; p. 439-447, 2001.
- HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**, Michigan, v. 2, p. 145-171, 2007.
- JERNIGAN JA, P. R. D.; PETRI WA, R. M. D. *In vitro* activity of atovaquone against *leishmania chagasi* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 1064-1064, 1996.
- KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; LAATSCH H, C. S. L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **Acta Tropica**, Basel, v.1 ou n.77, p. 307-314, 2000.
- KILLICK-KENDRICK, R. The life-cycle of *leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. Paris, v. 65, p. 37-42, 1990.
- KORNBERG, A.; RAO, N. N.; AULT-RICHÉ, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto - CA, v. 68, p. 89-125, 1999.
- LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J. J. Infective stages of *leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, p. 421-424, 1987.
- LEZAMA-DÁVILA, C. M. et al. Leishmanicidal activity of two naphthoquinones against *leishmania donovani*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 35, n. 10, p. 1761-1764, 2012.
- LIMA, N. M. F. et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 7, p. 757-761, nov. 2004.
- LOISEAU, P. M. et al. *In vitro* activities of new 2-substituted quinolines against *leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 4, p. 1777-1780, 2011.
- LOPES, J. N. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the toxicity of 1, 4-naphthoquinone and 1, 2-naphthoquinone derivatives against *trypanosoma cruzi*. **Annals of tropical medicine and parasitology**, London, v. 72, n. 6, p. 523-531, 1978.
- MACEDO-SILVA, Sara Teixeira de et al. Antiproliferative, ultrastructural, and physiological effects of amiodarone on promastigote and amastigote forms of *leishmania amazonensis*. **Molecular biology international**, v. 2011, p.12, 2011.
- MACHADO, T. B. et al. *In vitro* activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 21, n. 3, p. 279-284, 2003.
- MARSDEN, P. D. Mucosal leishmaniasis (espundia Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 80, p. 859-876, 1990.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v. 40, p. 157-168, 2009.

MEYMANDI, S. S. et al. Comparative histological and immunohistochemical changes of dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. **Archives of Iranian Medicine**, Tehran, v. 14, n. 4, p. 238-243, jul. 2011.

MONDAL, S.; BHATTACHARYA, P.; ALI, N. Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 8, p. 919-944, 2010.

MONZOTE, L. et al. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from piper auritum. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 168-173, 2010.

MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. Leishmania-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, Philadelphia, v. 4, n. 5, p. 315-22, 1993.

MOSTEFA-KARA, B. et al. New chemical tools for the assessment of hemolytic anemia induced by naphthoquinones. **Der Pharma Chemica**, v. 2, n. 1, p. 14-21, 2010.

MUELLER, H.; KASSACK, M. U.; WIESE, M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. **Journal of Biomolecular Screening**, New York, v. 9, n. 6, p. 506-515, 2004.

NAKAYAMA, H. et al. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 4950-4956, 2005.

NAN, A. et al. Targetable water-soluble polymer-drug conjugates for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Controlled Release**, v. 94, n. 1, p. 115-127, 2004.

NEVES, L. O. et al. Estudo clínico randomizado comparando antimoniato de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutânea ocasionada por *leishmania guyanensis*. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

NOGUEIRA, V. de A. et al. Modulação da resposta inflamatória por *leishmania (Viannia) braziliensis*. **Revista Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Seropédica, v. 24, n. 2, p. 125-128, jul./dez. 2004.

OKUDA, K. et al. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. **Experimental Parasitology**, New York, v. 92, n. 4, p. 223-231, ago. 1999.

OMS. **Leishmaniasis**. Geneve. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: dez. 2013.

OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Experimental studies on the evaluation of antimony-resistant phenotype during the in vitro life of *leishmania infantum*: implications for the spread of chemoresistance in endemic areas. **ActaTropica**, v. 80, p. 195-205, 2001.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, Edinburgh, v. 7, n. 4, p. 257-266, 2004.

PARK, B. S. et al. Antibacterial activity of *tabebuia impetiginosa* martius ex DC (Taheebo) against *helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 105, n. 1, p. 255-262, 2006.

PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 167, p. 3391-3397, 2001.

PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 22, n. 1, p. 1-11, 1996.

PETTY, R. D. et al. Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. **Journal of bioluminescence and chemiluminescence**, Chichester, v. 10, n. 1, p. 29-34, 1995.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. The Trypanocidal activity of naphthoquinones: a review. **Molecules**, v. 14, p. 4570-4590, 2009.

RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate regulates responses of escherichia colito nutritional stringencies, environmental stresses and survival in the stationary phase. **Progress in Molecular and Subcellular Biology**, New York, v. 23, p. 183-195, 1999.

READY, P. D. Leishmaniasis emergence and climate change. **Revue scientifique et technique**, v. 27, n. 2, p. 399-412, 2008

ROSSI, C. N. **Ocorrência de leishmania sp. em gatos do município de Araçatuba-São Paulo - Brasil**. 2007. 87 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal. Campus de Jaboticabal.

RYBNIKER, J. et al. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. International. **Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 16, p. 522-525, 2010.

SACAU, E. P. et al. Inhibitory effects of lapachol derivatives on epstein-barr virus activation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 483-488, 2003.

SANTOS, A. F. dos et al. Molluscicidal and trypanocidal activities of lapachol derivatives. **Planta Medica Journal**, Stuttgart, v. 67, n. 1, p. 92-93, 2001.

SANTOS, A. O. et al. *Leishmania amazonensis*: effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, New York, v. 129, p. 145-151, 2011.

SERENO, D. et al. Novel intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *leishmania donovani*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 3971-3976, 2001.

SILVA, A. J. M. da et al. Antitumoral, antileishmanial and antimalarial activity of pentacyclic 1, 4-naphthoquinone derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 176-182, 2009.

SILVA JÚNIOR, E. N. da et al. Cytotoxic, trypanocidal activities and physicochemical parameters of nor-²-lapachone-based 1, 2, 3-triazoles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 4, p. 635-643, 2009.

SILVA, M. N. da; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. C. B. V. de. Um Panorama atual da química e da farmacologia a de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 407, 2003.

SIMÕES, M. O.; SCKENKEL, E. P.; GOSMANN, G. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 4. ed. Porto Alegre: Ed. Universidade UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2002.

SLADOWSKI, D. et al. An improve MTT assay. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 15, p. 203-207, 1993.

SOUZA, A. I. et al. Domestic feline cutaneous leishmaniasis in the municipality of Ribas do Rio Pardo, Mato Grosso do Sul state, Brazil: a case report. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 15, n. 2, p. 359-365, 2009.

SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

SOUZA, W. de; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The international journal of biochemistry & cell biology**, Exeter, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 4, p. 313-325, 2008.

STEINBERG, T. H. et al. ATP4- permeabilizes the plasma membrane of mouse macrophages to fluorescent dyes. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 18, p. 8884-8888, 1987.

STURION, D. J. et al. Utilización del DMSO por vía intravenosa y tópica en 196 animales de compañía atendidos en el Hospital Veterinario de las Facultades Integradas de Ourinhos-SP. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v. 4, n. 8, p. 302-312, 2011.

SUNDAR, S. Drug resistance in indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, p. 849-854, 2002.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: ciclo de vida da leishmania**. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2013. Consórcio CEDERJ.

TEIXEIRA, M. J. ET al. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 44-48, 2001.

TEMPORAL, R. M. et al. Effects of amidine derivatives on parasite-macrophage interaction and evaluation of toxicity. **Arzneimittel-forschung**, Aulendorf, v. 52, n. 6, p. 489-493, 2002.

TIKKANEN, L.; MATSUSHIMA, T.; NATORI, S. Mutagenicity of anthraquinones in the salmonella preincubation test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 116, n. 3, p. 297-304, 1983.

TIUMAN, T. S. et al. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *tanacetumparthenium*. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v. 49, p. 176-182, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; SOUZA, W. de. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania Mexicana* complex. **Research in Microbiology**, Amsterdam, v. 158, n. 5, p. 456-462, jun. 2007.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Expression and processing of megasome cysteine proteinases during *leishmania amazonenses* differentiation. **Parasitology Research**, v. 88, n. 4, p. 332-337, apr. 2002.

VANNIER-SANTOS, M. A. et al. Cell biology of *leishmaniaspp.*: invading and evading. **Current Pharmaceutic Design**, Schiphol, v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.

ZHANG, K. et al. Leishmania salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 55, n. 5, p. 1566-1578, 2005.