



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Luciana Costa de Souza

**Modulação da atividade microbida de macrófagos pela
pterocarpanoquinona LQB-118 e sua ação terapêutica em modelo
experimental de infecção com *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Rio de Janeiro

2016

Luciana Costa de Souza

**Modulação da atividade microbicida de macrófagos pela pterocarpanoquina
LQB-118 e sua ação terapêutica em modelo experimental de infecção com
*Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof^a. Dra. Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S729 Souza, Luciana Costa de.
Modulação da atividade microbicida de macrófagos pela pterocarpanoquinona LQB-118 e sua ação terapêutica em modelo experimental de infecção com *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Luciana Costa de Souza. – 2016.
123 f.

Orientadora: Silvia Amaral Gonçalves da Silva.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Leishmania brasiliensis* - Teses. 2. Macrófagos - Teses. 3. Imunomodulação. 4. Hamster como animal de laboratório - Teses. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB/7 - 6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Luciana Costa de Souza

**Modulação da atividade microbicida de macrófagos pela pterocarpanoquinona
LQB-118 e sua ação terapêutica em modelo experimental de infecção com
*Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 29 de julho de 2016.

Orientadora: Prof^a. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof^o. Dr. Alexandre Bello

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^a. Dra. Wânia Ferraz Pereira Manfro

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof^a. Dra. Alda Maria da Cruz

Instituto Oswaldo Cruz

Prof^o. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Para minha querida e amada mãe Maria Alice Costa.

AGRADECIMENTOS

Começarei os agradecimentos, dando honras e glórias a Deus, por me conduzir e me permitir concluir mais uma etapa na minha vida.

A minha querida e maravilhosa mãe, obrigada por todo apoio e por orar por mim incansavelmente, a você dedico tudo o que sou.

A minha família na fé, que me sustenta com as orações.

Agradeço a Prof^a Sílvia, pela confiança e orientação. Mais uma vez digo: Obrigada por tudo que fez por mim desde o início.

A todas do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, pelo apoio e ajuda nos experimentos, em especial a Rosiane Freire, Thayssa da Silva, Andréia Brito e Michelly Mendes.

A Prof^a Lea Cisne por ter cedido, gentilmente, a cepa de leishmania a ser estudada. Aos Prof^o Paulo Roberto Ribeiro Costa e Prof^o Alcides da Silva do Laboratório de Química Bioorgânica (LQB) do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), por ter cedido a pterocarpanoquinona LQB-118.

A todos os membros que compõem a banca examinadora, Prof^o. Dr. Alexandre Bello, Prof^a. Dra. Patrícia Dutra, Prof^a. Dra. Wânia Manfro, Prof^a. Dra. Alda Cruz, Prof^o. Dr. Eduardo Caio Santos e Dr. Edézio Cunha-Júnior, que de forma presente estiveram comigo em toda a minha jornada científica, desde a iniciação científica.

Agradeço a Prof^a Dr^a Luciana Rodrigues por suas palavras de incentivo, revisão da Tese e também por sua disponibilidade nas análises das citocinas. A Dr^a Roberta Olmo pela sua generosidade e disponibilidade ao me receber em seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao CNPq pelo suporte financeiro ao trabalho experimental.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente participaram desta nova conquista. Muito obrigada!

RESUMO

COSTA, Luciana. **Modulação da atividade microbicida de macrófagos pela pterocarpanoquinona LQB-118 e sua ação terapêutica em modelo experimental de infecção com *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

As leishmanioses estão entre as mais importantes endemias brasileiras e encontram-se entre as doenças mais negligenciadas no mundo. O arsenal terapêutico disponível é restrito, tóxico, caro e em algumas situações ineficazes, devido ao surgimento de cepas resistentes. No Brasil, são registrados anualmente mais de 20 mil casos de leishmaniose tegumentar, sendo a *Leishmania (Viannia) braziliensis* considerada a principal espécie causadora das formas clínicas cutânea e mucosa. Portanto, tornam-se importante estudos que conduzam ao desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A pterocarpanoquinona LQB-118 é uma molécula que apresenta atividade antitumoral, contra *Trypanosoma cruzi* e espécies de *Leishmania* tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O objetivo da presente tese é estudar a ação moduladora da LQB-118 sintética, sobre macrófagos de hamsters e humanos, infectados ou não por *L. (Viannia) braziliensis*. O efeito antiparasitário foi avaliado sobre o crescimento *in vitro* das formas amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de hamsters e do sangue periférico humano. Para avaliar o modo de ação, foi investigada a ação anti-amastigota, a indução de apoptose usando marcação por TUNEL e a modulação na célula hospedeira foi analisada pela dosagem de óxido nítrico (reagente de Griess) e espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos peritoneais de hamsters e em macrófagos humanos o efeito modulador foi avaliado pela dosagem de óxido nítrico e de citocinas IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α (por citometria de fluxo) nos sobrenadantes de macrófagos tratados com a LQB-118 antes ou após a infecção. A ação da LQB-118 *in vitro* foi dose-dependente inibindo 0,8%, 75% e 88%, nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente para macrófagos de hamster tratados por 48 horas após a infecção. Para macrófagos humanos a inibição foi de 31%, 52% e 81,5% para as mesmas concentrações. Em macrófagos tratados por 24 horas com LQB-118 antes da infecção, a redução do índice de infecção foi de 62%, 89% e 95 nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente para macrófagos de hamster e de 61%, 71% e 79%, para macrófagos humano, nas mesmas concentrações respectivamente. A LQB-118 foi capaz de induzir a fragmentação do DNA das formas amastigotas intracelulares sem alterar a viabilidade da célula hospedeira. Esta substância também foi capaz de modular a resposta dos macrófagos humanos tratados com LQB-118 antes ou após a infecção. *In vivo*, o tratamento por via oral, foi capaz de diminuir a lesão da pata infectada, reduzir a carga parasitária e estimular a resposta intradérmica aos antígenos totais de *Leishmania*. Estes resultados parciais demonstram que a atividade anti-*Leishmania* da LQB-118 é direta sobre o parasito pela indução de morte por apoptose, apresentando também uma ação moduladora da resposta dos macrófagos contribuindo para ação leishmanicida, sem alterar a viabilidade da célula hospedeira. A LQB-118 pode ser uma importante molécula para o desenvolvimento de um novo fármaco.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*. LQB-118. Macrófagos. Célula humana.

Hamster. Imunomodulação. Tratamento oral.

ABSTRACT

COSTA, Luciana. **Activity modulation microbicidal macrophages by pterocarpanquinone LQB-118 and its therapeutic action in experimental infection with *Leishmania (V.) braziliensis***. 2016. 123 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Leishmaniasis is among the leading Brazilian endemics and is among the most neglected diseases in the world. The therapeutic arsenal available is restrictive, toxic, ineffective in situ, due to emergence of resistant strains. In Brazil, there were the 20 most cases of cutaneous leishmaniasis, with one *Leishmania (Viannia) braziliensis* being one of the main causal forms of cutaneous and mucosal surgery. Therefore, important studies that lead to the development of new therapeutic alternatives become important. Pterocarpanoquinone LQB-118 is a molecule which exhibits antitumor activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species both *in vitro* and *in vivo*. The aim of this article is to study the LQB-118 synthetic modulator of movement on hamsters and human macrophages, infected or not by *L. (Viannia) braziliensis*. The antiparasitic effect was evaluated on *in vitro* growth of intracellular amastigote forms in peritoneal macrophages of hamsters and human peripheral blood. The evaluation of apoptosis using an anti-amastigote to move action, and the anti-amastigote noise is the induction of apoptosis using synchronization and anti-amastigote in action (ERO) in peritoneal macrophages of hamsters and in human macrophages of the modulating effect was directed to the measurement of nitric oxide and cytokines IL1- β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 and TNF- α (by flow cytometry) in the supernatants of macrophages treated with a LQB-118 before or after an infection. The action of LQB-118 *in vitro* was dose-dependent inhibition of 0.8%, 75% and 88% in the combinations of 5, 10 and 20 μ M, respectively for treated hamster macrophages for 48 hours post-infection. For human macrophages the inhibition was 31%, 52% and 81.5% for the concentrated conditions. In macrophages treated for 24 hours with LQB-118 prior to infection, the reduction of the hit rate was 62%, 89% and 95 in the combinations of 5, 10 and 20 μ M respectively for hamster and 61% macrophage, 71 % and 79% for human macrophages in them. LQB-118 was able to induce DNA fragmentation of the intracellular amastigote forms, without altering the viability of the host cell. LQB-118 may be used to modulate macrophage before or after infection. *In vivo*, oral treatment was able to decrease infectivity, reduce parasitic capacity and stimulate an intradermal response to total *Leishmania* antigens. The results showed that an anti-*Leishmania* activity of LQB-118 is directly related to the process of induction of death by apoptosis, and also a modulating action of the response of macrophages that contribute to the leishmanicidal action, without any change in cell viability hostess. LQB-118 may be an important molecule for the development of a new drug.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*. LQB-118. Macrophages. Human cell. Hamster Immunomodulation. Oral treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> de acordo com os subgêneros.....	17
Figura 2 –	Esquema das formas evolutivas de <i>Leishmania sp.</i>	18
Figura 3 –	Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	19
Figura 4 –	Manifestações clínicas da Leishmaniose.....	26
Figura 5 –	Linha do tempo – Avanços na pesquisa biológica sobre a biologia dos macrófagos.....	30
Figura 6 –	Formação e diferenciação dos monócitos.....	32
Figura 7 –	Heterogeneidade e sistema de classificação dos macrófagos.....	37
Figura 8 –	Células dendríticas e macrófagos regulando a resposta imune contra a infecção por <i>Leishmania</i>	39
Figura 9 –	Síntese da pterocarpanoquinona.....	45
Figura 10 –	Desenho experimental dos esquemas terapêuticos <i>in vivo</i>	60
Figura 11 –	Viabilidade dos macrófagos tratados com LQB-118.....	64
Figura 12 –	Efeito da LQB-118 sobre o potencial de membrana mitocondrial de macrófagos.....	65
Figura 13 –	Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares.....	67
Figura 14 –	Sobrevivência de amastigotas intracelulares.....	69
Figura 15 –	Tratamento de macrófagos com LQB-118 antes da infecção.....	70
Figura 16 –	Efeito da LQB-118 na indução da fragmentação de DNA do parasito.....	73
Figura 17 –	Efeito da LQB-118 sobre a produção de Óxido Nítrico.....	75
Figura 18 –	Efeito da LQB-118 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos.....	76
Figura 19 –	Atividade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-118.....	77
Figura 20 –	Efeito da LQB-118 na produção de citocinas de macrófagos humanos.....	80
Figura 21 –	Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado após uma semana de infecção.....	84
Figura 22 –	Efeito do tratamento LQB-118 e iniciado após o estabelecimento da lesão.....	87
Figura 23 –	Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado antes da infecção por <i>L. (V) braziliensis</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	As principais espécies de <i>Leishmania</i> que afetam o ser humano	22
Tabela 2 –	Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil de 2006 a 2014.....	24
Tabela 3 –	Citocinas importantes para macrófagos.....	35
Tabela 4 –	Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.....	42
Tabela 5 –	Comparação do tratamento antes e depois da infecção na inibição do índice de infecção.....	71
Tabela 6 –	Valores do aumento das citocinas (<i>Fold increase</i>) produzidas por macrófagos sem infecção e tratados com LQB-118.....	82
Tabela 7 –	Valores do aumento das citocinas (<i>Fold increase</i>) produzidas por macrófagos infectados e tratados com LQB-118.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT –	Alanino aminotransferase
AST –	Aspartato aminotransferase
APCs –	Células apresentadoras de antígeno
BCG –	Bacilo de Calmette-Guérin
CO ₂ –	Dióxido de carbono
DC –	Células dendríticas
DMSO –	Dimetilsulfóxido
DNA –	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTH –	Hipersensibilidade tardia (<i>Delayed-type hypersensitivity</i>)
ECG –	Eletrocardiograma
FCCP –	Carbonil cianeto p-trifluormetoxifenilidrazona
Fiocruz –	Fundação Oswaldo Cruz
gp63 –	Glicoproteína de 63kD
GIP –	Glicoinositolfosfato (<i>Glico inositol phosphate</i>)
GIPLs –	Glicoinositolfosfolipídios (<i>Glico inositol phospholipids</i>)
GM-CSF –	fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HBSS –	Solução salina equilibrada de Hankes
HSC –	Células estaminais hematopoiéticas
H ₂ O ₂ –	Peróxido de hidrogênio (<i>Hydrogen peroxide</i>)
IC50 –	Concentração inibitória de 50 %
IFN- γ –	Interferon gama
Ig –	Imunoglobulina
IL –	Interleucina
IM –	Intramuscular
iNOS –	Óxido nítrico sintase induzida (<i>Nitric oxide synthases</i>)
IV –	Intravenoso
Kg –	Kilograma
LPG –	Lipofosfoglicano
LPS –	Lipopolissacarídeo
LQB-118 –	[2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] - Laboratório de Química

	Bioorgânica
LV –	Leishmaniose visceral
LM –	Leishmaniose mucosa
LC –	Leishmaniose cutânea
LC ₅₀ –	Concentração letal para 50%
M-CFU –	Unidade formadora de colônias de macrófagos
MTT –	Brometo de 3-(4,5 dimetil-2 tiazolil)-2,5-difenil 2H-tetrazólio
M ϕ –	Macrófago
NaNO ₂ –	Nitrito de sódio
NK –	Células <i>Natural killer</i>
NO –	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NO ₂ ⁻ –	Nitrito
OMS –	Organização Mundial de Saúde
PBS –	Solução de tampão fosfato com cloreto de sódio a 0,9% (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PBMC –	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>)
pH –	Potencial hidrogeniônico
RNS –	Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
RPMI –	Meio de cultura RPMI 1640
ROS –	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SNC –	Sistema nervoso central
sp –	Espécie
SD –	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
TCD4 ⁺ –	Linfócitos auxiliares
TCD8 ⁺ –	Linfócitos citotóxicos
TGF- β –	Fator de transformação do crescimento beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th –	Linfócitos T auxiliares
TNF –	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
Tregs –	Linfócitos reguladores

LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta\Psi_m$ –	Potencial de membrana
\pm –	Mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$ –	Graus Celsius
g –	Força centrífuga
% –	Porcentagem
< –	Menor que
® –	Marca registrada
α –	Alfa
β –	Beta
h –	Hora
kg –	Quilograma
mg –	Miligramas
mL –	Mililitros
mm –	Milímetro
μM –	Micromolar
$\text{M}\phi$ –	Macrófago
nm –	Nanometro
pg –	Picograma
rpm –	Rotações por minuto
SD –	Desvio padrão

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	15
1	O PARASITO LEISHMANIA, CICLO DE VIDA E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO VERTEBRADO.....	16
2	AS LEISHMANIOSES.....	21
2.1	Formas clínicas e Situação epidemiológica.....	21
2.2	Infecção por <i>Leishmania (V) braziliensis</i> e modelo de infecção <i>in vivo</i>.....	26
3	A CÉLULA HOSPEDEIRA E SUA INTERAÇÃO COM A LEISHMANIA.....	29
3.1	Sistema fagocítico mononuclear – Histórico.....	29
3.2	Origem dos Macrófagos.....	31
3.3	Papel das citocinas na ativação e heterogeneidade dos Macrófagos	34
3.4	Importância da modulação de macrófagos para o controle da leishmaniose.....	38
4	TRATAMENTO CONTRA LEISHMANIOSE.....	40
5	PTEROCARPANOQUINONA – LQB-118.....	45
6	JUSTIFICATIVA.....	48
7	OBJETIVOS.....	49
8	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
8.1	Aspectos éticos	51
8.2	Obtenção e manutenção do parasito.....	52
8.3	Pterocarpanoquinona LQB-118.....	51
8.4	Isolamento de macrófagos.....	52
8.4.1	<u>Obtenção de monocamadas de macrófagos de <i>Mesocricetus auratus</i> (hamsters golden).....</u>	52
8.4.2	<u>Isolamento de PBMC humano e diferenciação em Macrófagos.....</u>	52
8.5	Efeito da LQB-118 sobre macrófagos.....	53
8.5.1	<u>Ensaio de viabilidade celular.....</u>	53
8.5.2	<u>Avaliação da produção de óxido nítrico (NO).....</u>	54
8.5.3	<u>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).....</u>	54
8.5.4	<u>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m).....</u>	55

8.5.5	<u>Capacidade fagocítica</u>	56
8.5.6	<u>Avaliação da produção de citocinas</u>	56
8.6	Avaliação sobre formas amastigotas intracelulares	57
8.6.1	<u>Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas em macrófagos tratados após infecção</u>	57
8.6.2	<u>Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas em macrófagos tratados antes da infecção</u>	57
8.6.3	<u>Detecção <i>in situ</i> da fragmentação de DNA</u>	58
8.6.4	<u>Sobrevivência de amastigotas intracelulares</u>	59
8.7	Ação terapêutica da LQB-118 em modelo experimental de infecção com <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	59
8.7.1	<u>Avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH)</u>	61
8.7.2	<u>Avaliação da carga parasitária</u>	61
8.7.3	<u>Toxicologia renal e hepática</u>	61
8.8	Análise estatística	62
9	RESULTADOS	63
9.1	Atividade da LQB-118 sobre macrófagos (hamsters/humanos)	63
9.1.1	<u>Avaliação da viabilidade celular</u>	63
9.1.2	<u>Efeito sobre o potencial da membrana mitocondrial</u>	65
9.1.3	<u>Atividade da LQB-118 sobre ação anti-amastigotas intracelular</u>	66
9.1.3.1	Atividade anti-amastigota – Macrófagos tratados após infecção.....	66
9.1.3.2	Sobrevivência de amastigotas intracelulares.....	68
9.1.3.3	Atividade anti-amastigota – Macrófagos tratados antes da infecção.....	70
9.1.3.4	Detecção da fragmentação do DNA <i>in situ</i> em amastigota.....	72
9.1.4	<u>Análise da produção de radicais tóxicos</u>	74
9.1.4.1	Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	74
9.1.4.2	Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	76
9.1.5	<u>Análise da capacidade fagocítica dos macrófagos pré-tratados</u>	77
9.1.6	<u>Avaliação da produção de citocinas por macrófagos humano</u>	79
9.2	Atividade terapêutica da LQB-118 <i>in vivo</i>	83
9.2.1	<u>Tratamento após uma semana de infecção</u>	83
9.2.2	<u>Tratamento após lesão estabelecida</u>	86
9.2.3	<u>Tratamento antes da infecção</u>	89

10	DISCUSSÃO	92
	CONCLUSÃO	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética para cuidado e uso de animais experimentais.....	113
	ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética para uso de células humanas.....	114
	ANEXO C – Artigo Científico.....	115

INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública nos países em desenvolvimento. No Brasil, no período entre 2006 a 2014, foram registrados mais de 191 mil casos de leishmaniose cutânea, sendo a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* a que apresenta maior distribuição no país. Na ausência de vacinas eficazes e medidas de controle de vetores, a principal estratégia de combate à doença é a quimioterapia. (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

O tratamento para leishmaniose tem sido feito basicamente com antimoniais pentavalentes como medicamentos de primeira escolha. Porém, esta terapêutica apresenta alta toxicidade, elevado custo e surgimento de cepas resistentes ao tratamento. Outros fármacos como a Anfotericina B, Miltefosina e Glucantime[®] apresentam ação direta sobre a *Leishmania sp* e possuem ação imunomoduladora que contribui para seu efeito anti-*Leishmania*. Esses fármacos são capazes de modular as células hospedeiras preferenciais da *Leishmania sp*, os macrófagos, aumentando sua capacidade microbicida pela estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico, porém, também apresentam alta toxicidade (BARTHOLOMEU *et al*, 2014 e MENEZES *et al*, 2015).

O presente estudo se propôs a analisar a capacidade da pterocarpanoquinona LQB-118 em modular a ação microbicida dos macrófagos (de hamsters e humanos) e avaliar sua ação terapêutica em hamsters infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A LQB-118 é uma molécula sintetizada a partir da hibridação molecular do lapachol e de um pterocarpano isolado de espécies vegetais, apresentando atividade contra espécies de *Leishmania*.

1 O PARASITO *LEISHMANIA*, CICLO DE VIDA E INTERAÇÃO COM O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Pertencentes a ordem Kinetoplastidae, os tripanossomatídeos são eucariontes unicelulares e distinguem-se pela presença de uma estrutura denominada cinetoplasto, que contém material genético auto-replicável, o DNA mitocondrial (STEVENS, 2008; STUART, 2008 e MENA-BARRETO & DE CASTRO, 2014). Este grupo inclui vários parasitos humanos responsáveis por doenças que afetam mais de 20 milhões de pessoas, principalmente nos países em desenvolvimento. Dois gêneros apresentam grande importância médica, o gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* (BARTHOLOMEU *et al*, 2014).

No gênero *Trypanosoma*, encontramos as espécies *Trypanosoma cruzi* que causa a doença de Chagas ou tripanossomíase americana e *Trypanosoma brucei* causadora da doença do sono ou a tripanossomíase humana africana. O gênero *Leishmania* é composto por espécies que causam diferentes formas clínicas de leishmaniose, categorizadas entre as doenças negligenciadas mais importantes causando cerca de 150 mil mortes por ano (DAVIES *et al*, 2003; SIMPSON, STEVENS, LUKES, 2006 e BARTHOLOMEU *et al*, 2014).

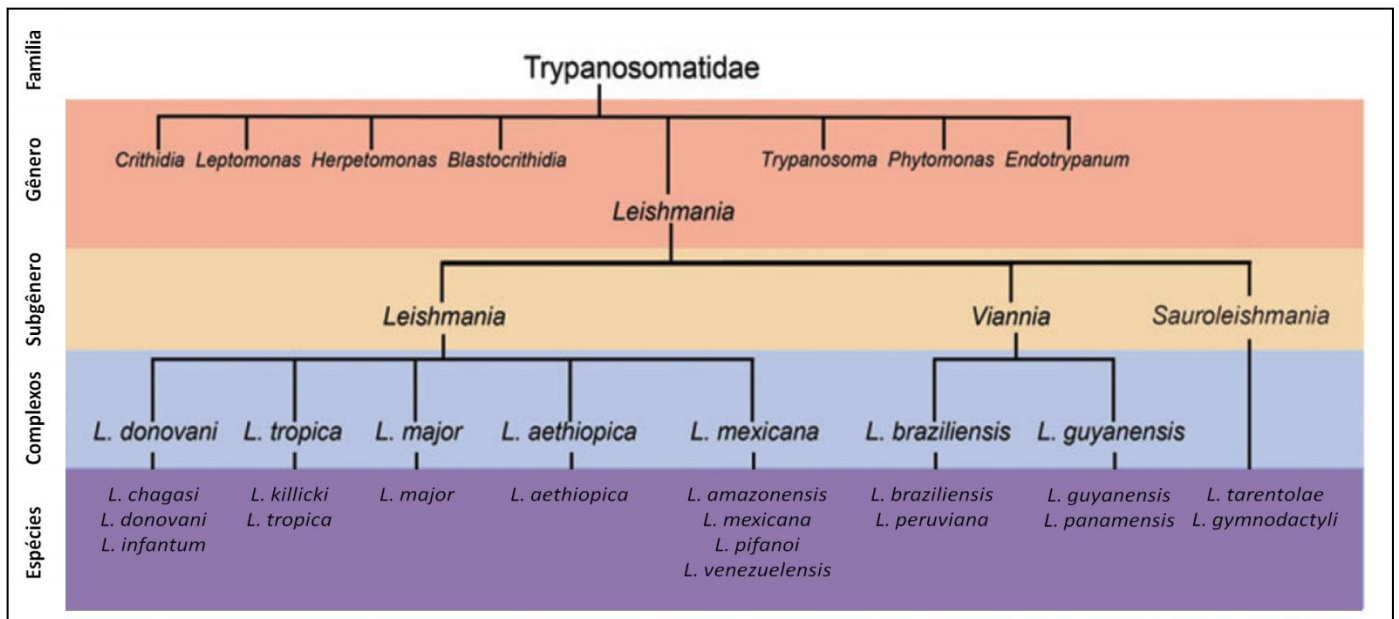
Lainson & Shaw (1987) classificaram o gênero *Leishmania* em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, com base na localização do parasito no trato digestório do inseto vetor.

O subgênero *Leishmania* compreende espécies que se desenvolvem no intestino anterior e no intestino médio do vetor, enquanto o subgênero *Viannia* inclui espécies que se desenvolvem, no intestino posterior que após a metacicloquênese, migram para o intestino médio e posteriormente para o intestino anterior. Um terceiro subgênero tem sido incluído na classificação do gênero *Leishmania*, o subgênero *Sauroleishmania*, que compreende espécies que parasitam exclusivamente lagartos (REAL *et al*, 2013).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são um grupo de parasitos digenéticos (heteroxênico), transmitidos por flebotomíneos hematófagos a várias espécies de mamíferos, incluindo seres humanos (MCGWIRE & SATOSKAR, 2014).

Atualmente mais de vinte espécies de *Leishmania* foram identificadas como patogênicas para o homem e estão agrupadas em complexos (**Figura 1**) com base nas suas características bioquímicas, imunológicas, moleculares e fenotípicas (STRAZZULLA *et al*, 2013).

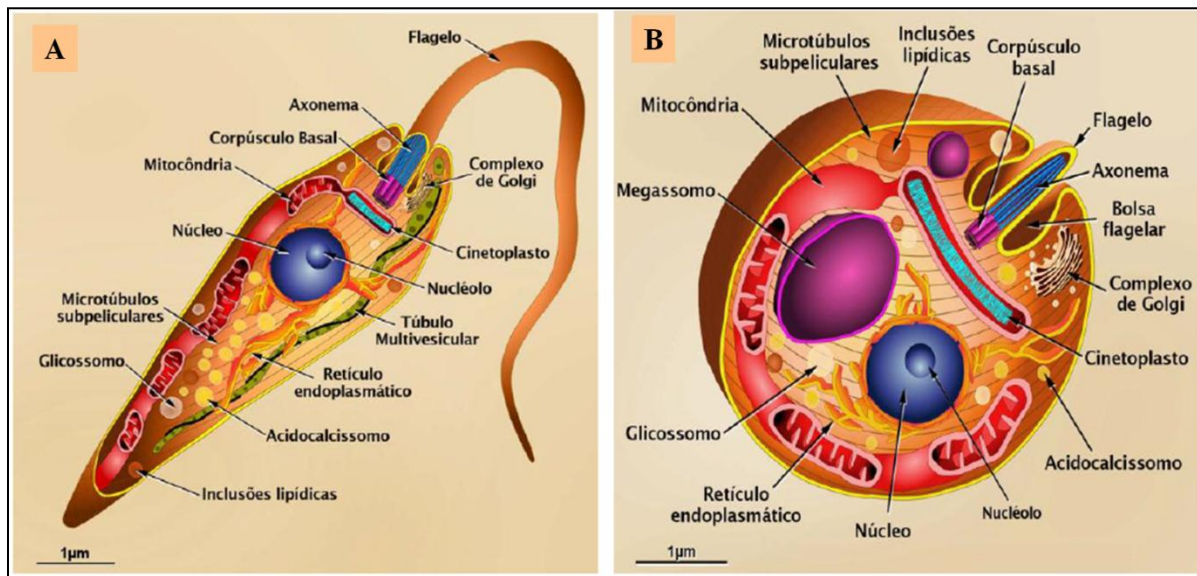
Figura 1 – Classificação das espécies de *Leishmania* de acordo com os subgêneros



Legenda: Divisão da família *Trypanosomatida*, mostrando as espécies de maior relevância–
Fonte: adaptado de Real et al, 2013.

A *Leishmania*, apresenta duas formas evolutivas no seu ciclo de vida: a promastigota e a amastigota (**Figura 2**). A forma promastigota possui um corpo celular longo e achatado, núcleo localizado na porção mediana e o cinetoplasto localizado na parte anterior da célula, de onde emerge o flagelo livre. Esta forma é encontrada nos insetos vetores e se desenvolve em culturas axênicas. A forma amastigota apresenta morfologia arredondada, núcleo relativamente grande, redondo e excêntrico, cinetoplasto visível à microscopia eletrônica, apresenta um flagelo não visível a microscopia óptica e vivem como parasitas intracelulares dentro de vacúolos parasitóforos em células do sistema fagocítico mononuclear de mamíferos, principalmente em macrófagos (DUTRA *et al*, 2010, PAUL KAYE & PHILLIP SCOTT, 2011 e NEDA MORADIN & ALBERT DESCOTEAUX, 2012).

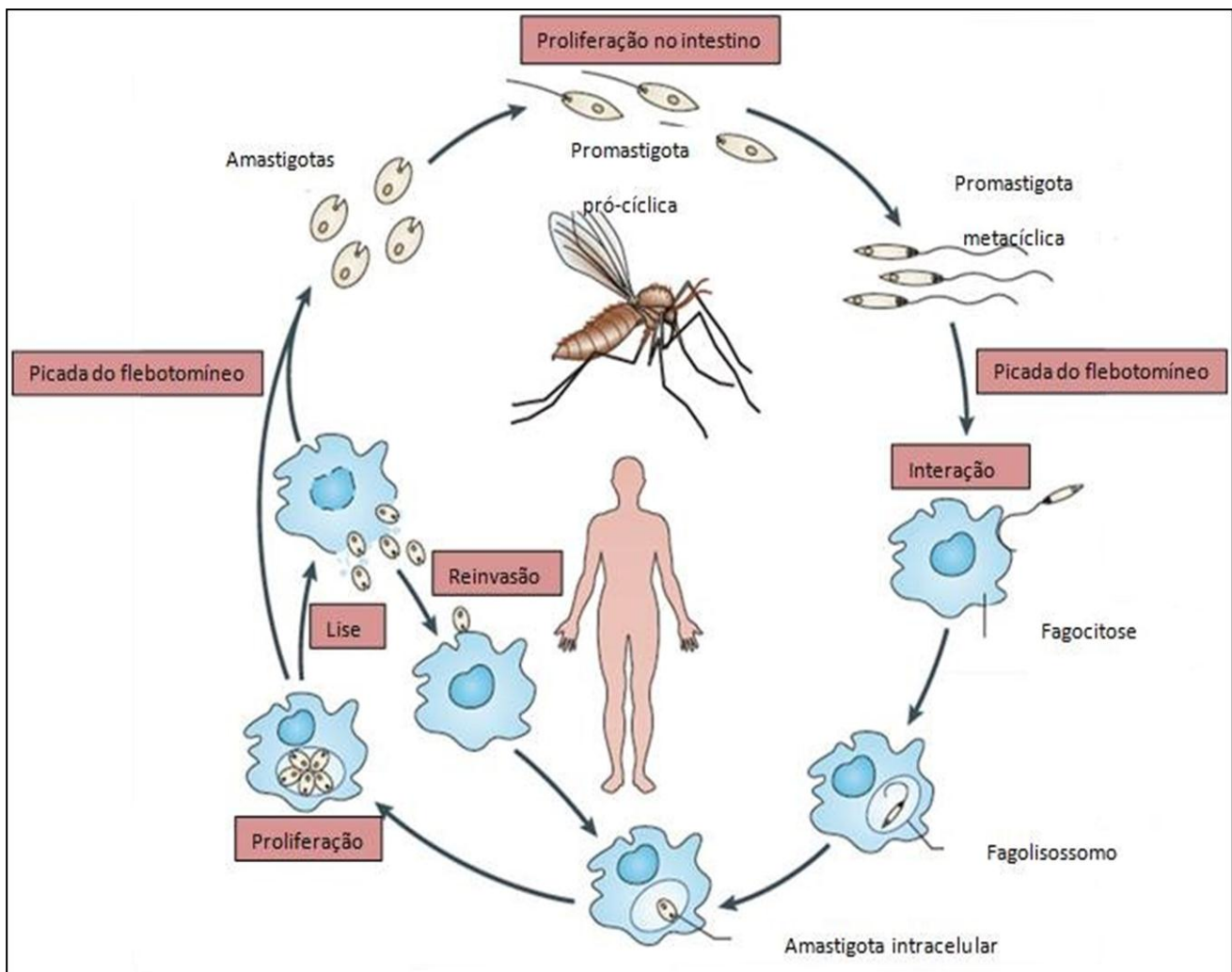
Figura 2 – Esquema das formas evolutivas de *Leishmania* sp



Legenda: (A) Forma Promastigota com formato fusiforme e flagelo livre. (B) Forma Amastigota com formato arredondado e flagelo internalizado. Ilustração mostrando os componentes das células -
 Fonte: Adaptado de Teixeira et al 2013.

O ciclo biológico da *Leishmania* inicia-se quando uma fêmea de flebotomo infectada, pica um hospedeiro vertebrado, a fim de realizar o repasto sanguíneo. Neste momento, as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas na pele do hospedeiro através do aparelho bucal do inseto (**Figura 3**). A saliva do flebotomíneo, que é inoculada juntamente com o parasito na pele, contribui para o estabelecimento da infecção. Entre as substâncias que compõem a saliva, um peptídeo denominado maxadilina, favorece a sobrevivência do parasito recém inoculado, desempenhando um papel imunomodulador da resposta imune. Esta molécula apresenta um efeito sobre as células apresentadoras de antígeno (APCs), como: inibição da produção de TNF por macrófagos, diminuição da capacidade de produção de óxido nítrico (NO) e indução de uma resposta anti-inflamatória que contribui para a sobrevivência do parasito (WHEAT *et al*, 2008 e DUTRA *et al*, 2010).

Figura 3 – Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



Legenda: Promastigotas pró-cíclicas de *Leishmania* se diferenciam em promastigotas metacíclicas, forma infectante, dentro do tubo digestório do flebotomíneo. Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita a forma infectante juntamente com imunomoduladores presentes nos componentes salivares. As formas promastigotas metacíclicas são então fagocitadas. Estas formas, se transformam em amastigotas que se replicam dentro da célula hospedeira, que se rompem quando muitas amastigotas estão presentes, permitindo a reinfeção dos fagócitos locais. O ciclo de transmissão é concluído, quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo e as amastigotas em seguida, se transformam em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de Kaye & Scott, 2011.

No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas da derme. Este processo é mediado por interações entre moléculas de superfície do parasito, como: gp63, lipofosfoglicano (LPG), glicoinositol (GPI), glicoinositolfosfolipídios (GIPLs) e fosfatidilserina (PS) e por receptores na célula hospedeira, tais como: receptores Fc, receptores de lectina e receptores das integrinas, que reconhecem sequências de aminoácidos específicas. As proteínas de superfície da *Leishmania*

auxiliam e facilitam a internalização. Também podem caracterizar um fator de virulência nas espécies, além de desativar o mecanismo microbicida dos macrófagos permitindo a sobrevivência do parasito dentro do ambiente hostil do fagolisossomo (ASSCHE *et al*, 2011; ISNARD, SHIO & OLIVIER, 2012; BARTHOLOMEU *et al*, 2014 e de MORAES *et al*, 2014).

Dentro dos fagolisossomos, as promastigotas metacíclicas, se diferenciam em amastigotas (**Figura 3**), este processo dura em média de 12 a 24 horas. Após este tempo, as amastigotas começam a se multiplicar por divisão binária (KOBAYASHI, 2010 e ASSCHE *et al*, 2011).

O ciclo se fecha quando a fêmea de flebótomo, ao picar um indivíduo ou um animal parasitado, ingere macrófagos e monócitos infectados com as formas amastigotas (**Figura 3**). Ao mudar-se de um hospedeiro mamífero para o intestino do vetor, o parasito requer uma adaptação (tais como a diminuição da temperatura e aumento do pH), sendo assim, os amastigotas irão se diferenciar em promastigotas que se multiplicam e passam por um processo denominado metaciclogênese. Este processo é caracterizado pela transformação de promastigotas pró-cíclicas em promastigotas metacíclicas. Esta transformação é acompanhada por um aumento da capacidade de infectar e sobreviver no hospedeiro vertebrado. As formas promastigotas passam por alterações morfológicas em tamanho, forma, comprimento do flagelo e também na expressão qualitativa e quantitativa de moléculas, tais como LPG e gp63. Os promastigotas metacíclicos migram para o proventrículo do flebotomíneo podendo então, infectar um novo hospedeiro durante seu próximo repasto sanguíneo (NEUBER, 2008; ASSCHE *et al*, 2011 e DOSTÁLOVÁ & VOLF, 2012).

Nos estágios iniciais da infecção é importante para o parasito, que os macrófagos não sejam ativados. Como mecanismo de sobrevivência e escape, os parasitos infectam células polimorfonucleares, como por exemplo, neutrófilos que são recrutados em resposta a picada do flebotomíneo devido à liberação de citocinas e quimiocinas.

Os neutrófilos infectados sofrem apoptose, sendo então fagocitados por macrófagos. Ao fagocitarem neutrófilos apoptóticos, que são considerados “cavalos de Tróia”, os macrófagos não são ativados. Esta entrada silenciosa promove o sucesso da infecção, facilitando a multiplicação e diferenciação do parasito dentro da célula hospedeira, até que esta se rompa liberando as formas amastigotas que irão infectar novas células (RIBEIRO-GOMES *et al*, 2004; FILARDY *et al*, 2011; KAYE & SCOTT, 2011 e DE MORAES *et al*, 2014).

2 AS LEISHMANIOSES

2.1 Formas clínicas e Situação epidemiológica

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, e é a segunda principal causa de morte relacionada a doença causada por parasitos (depois da malária), causando de 20 a 30 mil mortes anualmente (OMS 2015).

No Velho Mundo a leishmaniose é endêmica na Ásia, África e sul da Europa. Já no Novo Mundo é endêmica no centro-sul dos Estados Unidos, passando pela América Central e do Sul. Embora esta doença seja limitada aos trópicos e subtropicais, existem vários fatores que contribuem para sua dispersão para novas áreas. Estes fatores podem ser alterações climáticas, a urbanização, desmatamento, o aumento de viagens turísticas e relacionadas a trabalho, a imigração para países endêmicos e operações militares (KEVRIC *et al*, 2015).

Dependendo de fatores como a espécie e a resposta imune do hospedeiro, a leishmaniose pode cursar sob diversas manifestações clínicas, como visceral - (muitas vezes conhecida como calazar, sendo a forma mais grave da doença), a cutânea (mais comum, podendo ocorrer a cura espontaneamente) e a mucosa (onde pode ocorrer a destruição da região oronasal da pessoa infectada) (**TABELA 1**) (STOCKDALE & NEWTON, 2013 e KEVRIC *et al*, 2015).

Tabela 1 – As principais espécies de *Leishmania* que afetam o ser humano

Espécies	Formas clínicas	Países com maior prevalência	Características
<i>L. (L) donovani</i> <i>L. (L) infantum</i> <i>L. (L) siamensis</i>	Leishmaniose Visceral	Índia, Bangladesh, Nepal, África, Região do Mediterrâneo, América do Sul e Central e Tailândia	Febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia progressiva e perda de peso.
<i>L. (L) donovani</i>	Leishmaniose Dérmica Pós Calazar	Leste da África, Índia, Bangladesh, Nepal	Dermatite grave com lesões cutâneas e placas pelo corpo contendo os parasitos.
<i>L. (L) aethiopica</i> <i>L. (L) killicki</i> <i>L. (L) tropica</i> <i>L. (L) turanica</i> <i>L. (L) major</i>	Leishmaniose Cutânea (Velho Mundo)	Sul da Europa, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e África	Pápulas eritematosas no local da picada do inseto vetor, podendo evoluir para uma forma mais grave.
<i>L. (L) amazonensis</i> <i>L. (V) braziliensis</i> <i>L. (L) colombiense</i> <i>L. (V) guyanensis</i> <i>L. (L) mexicana</i> <i>L. (V) panamensis</i> <i>L. (V) peruviana</i> <i>L. (L) venezuelensis</i> <i>L. (L) pifanoi</i>	Leishmaniose Cutânea (Novo Mundo)	América Central e do Sul	Pápulas eritematosas no local da picada do inseto vetor, podendo evoluir para uma forma mais grave.
<i>L. (L) aethiopica</i> <i>L. (V) braziliensis</i> <i>L. (V) guyanensis</i> <i>L. (V) panamensis</i>	Leishmaniose Mucosa	Etiópia, América do Sul e central	Lesões destrutivas e desfigurantes em mucosas do sistema respiratório superior.

Fonte: Adaptado de Nagle et al, 2014

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 98 países e diversos territórios são endêmicos para leishmaniose, e que por ano em todo mundo, surjam aproximadamente 200 a 400 mil novos casos de leishmaniose visceral e de 700 mil a 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose cutânea (ALVAR, 2012).

A leishmaniose visceral é causada por espécies viscerotrópicas, havendo acentuado tropismo do parasito pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. Esta é a forma clínica mais grave da leishmaniose e os principais sintomas são constituídos de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia e

pode ser fatal se não for tratada (**Figura 4A**) (PÉREZ-ARELLANO *et al*, 2010 e MCGWIRE & SATOSKAR, 2013).

A leishmaniose visceral apresenta um desbalanço na resposta imune, com um perfil misto de citocinas, como IL-10, IL-6, IFN e TGF. Gautam e colaboradores (2014) demonstraram que a IL-10 está relacionada com a cronicidade da infecção, sugerindo que esta citocina promova um efeito inibitório nas células apresentadoras de antígeno e uma redução na ativação das células T (GAUTAM *et al*, 2014 e GOLLOB *et al*, 2014).

Existem dois tipos de leishmaniose visceral (zoonótico e antroponótico) que são definidos pela espécie de *Leishmania* e do reservatório do parasito. A forma zoonótica, causada principalmente pela *L. infantum*, com cães como o principal reservatório, ocorre na bacia do Mediterrâneo, na China, no Oriente Médio e na América do Sul. E a forma antroponótica, com transmissão de humano para humano, sem um animal reservatório, causada principalmente por *L. donovani*, é mais prevalente na África Oriental, Bangladesh, Índia e Nepal (MONGE-MAILLO & LÓPEZ-VÉLEZ, 2013). Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A Índia tem a maior incidência da doença, com aproximadamente 60% de todos os novos casos (NAGLE *et al*, 2014 e RODRIGUES *et al*, 2016).

A leishmaniose tegumentar é a forma clínica mais amplamente distribuída. Na forma cutânea localizada (**Figura 4B**), as lesões ocorrem em qualquer parte do corpo, mas normalmente desenvolvem-se no local da inoculação do parasito pelo vetor. Inicialmente, forma-se uma lesão macular seguido por uma pápula e, posteriormente uma úlcera de bordas elevadas e fundo plano e geralmente autolimitada. Estas lesões podem se desenvolver em semanas, meses ou anos após a infecção. Na leishmaniose cutânea observa-se um balanço entre as respostas T1 e T2, possibilitando a evolução para uma cura espontânea (NEUBER, 2008, PEREIRA-CARVALHO *et al*, 2013 e REVEIZ *et al*, 2013).

Os dez países com o maior número de casos estimados são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, juntos representam de 70 a 75% da prevalência global. No Velho Mundo a leishmaniose cutânea é causada pelas espécies *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* e no Novo Mundo é causada por uma variedade de espécies que pertencem aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia* produzindo as diferentes formas clínicas (REVEIZ *et al*, 2013 e OMS 2015).

No Brasil a leishmaniose tegumentar tem como principais agentes etiológicos as espécies *L. (L) amazonensis*, *L. (V) braziliensis* e *L. (V) guyanensis* (MINODIER & PAROLA, 2007).

Na década de 80 no Brasil, a leishmaniose tegumentar americana foi registrada em 19 Unidades Federativas, quando em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2010). No período de 2006 a 2014 foram registrados mais de 191 mil casos, sendo 80.388 na Região Norte, 60.473 na Nordeste, 28.959 na Centro-Oeste, 16.568 na Sudeste e 3.859 na Sul (**TABELA 2**) (PORTAL DA SAÚDE, 2014).

Tabela 2 - Casos de leishmaniose tegumentar americana. Brasil de 2006 a 2014

Região e UF	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Região Norte	8.833	9.890	8.680	8.272	7.108	8.615	10.196	8.407	10.387
Rondônia	1.204	971	941	1.035	922	697	1.136	1203	1148
Acre	1.124	913	972	906	1.026	878	1.134	923	1030
Amazonas	1.554	2.219	1.778	1.439	1.130	2.282	2.246	1429	1801
Roraima	285	340	350	441	641	222	444	524	463
Pará	3.554	4.305	3.623	3.347	2.331	3.595	4.076	3058	4356
Amapá	595	667	629	513	462	534	693	761	958
Tocantins	517	475	387	591	596	407	467	509	631
Região Nordeste	6.169	5.925	6.003	6.910	8.911	7.952	8.279	5.355	4.969
Maranhão	2.174	2.335	1.661	1.624	2.455	2.746	2.517	1732	2105
Piauí	152	108	73	104	146	173	120	69	85
Ceará	1006	935	700	993	1014	806	940	514	525
Rio Grande do Norte	7	6	6	56	82	7	6	6	8
Paraíba	46	60	53	109	83	26	67	35	28
Pernambuco	413	446	388	501	419	431	314	228	198
Alagoas	33	111	89	77	32	35	62	51	18
Sergipe	6	4	10	11	7	7	9	3	4
Bahia	2.332	1.920	3.023	3.435	4.673	3.721	4.244	2717	1998
Região Sudeste	2.868	1.898	1.592	1.605	2.428	2.179	1.388	1.150	1.460
Minas Gerais	1.855	1.322	1.123	1.021	1.887	1.745	978	781	1033
Espirito Santo	241	109	76	100	124	122	107	73	89
Rio de Janeiro	283	119	55	92	86	65	41	25	19
São Paulo	489	348	338	392	331	247	262	271	319
Região Sul	573	514	630	464	253	317	439	296	373
Paraná	409	438	533	409	228	309	419	273	350
Santa Catarina	158	67	87	45	21	7	13	14	15
Rio Grande do Sul	6	9	10	10	4	1	7	9	8
Região Centro- Oeste	3.852	3.095	3.005	4.492	3.163	2.274	3.118	2.922	3.038
Mato Grosso do Sul	116	99	118	105	89	93	135	128	141
Mato Grosso	3.181	2.715	2.521	3.900	2.466	1.832	2.639	2419	2326
Goiás	505	246	351	460	553	314	310	355	535
Distrito Federal	50	35	15	27	55	35	34	20	36
UF ignorada	102	85	82	81	118	58	127	96	69
Brasil	22.397	21.407	19.992	21.824	21.981	21.395	23.547	18.226	20.296

<http://portalsaude.saude.gov.br>

Uma outra forma clínica da leishmaniose tegumentar, considerada rara, causada principalmente pela *L. (V) amazonensis* é a forma cutânea-difusa, que se desenvolve em pacientes anérgicos e é caracterizada por uma resposta imune celular muito fraca ou inexistente ao antígeno de *Leishmania*. Essa forma clínica se caracteriza pela disseminação de inúmeras lesões não ulceradas na pele contendo um alto número de parasitos (**Figura 4D**). Normalmente, pacientes com leishmaniose cutâneo-difusa, respondem mal ao tratamento (MINODIER & PAROLA, 2007; SINHA *et al*, 2008 e OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012).

Algumas espécies do subgênero *Viannia*, como *L. (V) braziliensis*, *L. (V) panamensis* e *L. (V) guyanensis* podem se disseminar (metástase) a partir da lesão cutânea primária pela via hematogênica ou linfática para a mucosa nasal ou oral causando grande resposta inflamatória e destruição tecidual nestas regiões, gerando a forma clínica da leishmaniose mucosa (**Figura 4C**) (GUERRA *et al*, 2011).

Nesta forma clínica, observa-se um baixo número de parasitos na lesão e uma exacerbação da resposta imune celular (do tipo 1, já que os níveis de produção de IFN- γ e TNF são elevados) que é demonstrada pela resposta intradérmica ao antígeno de *Leishmania* (intradermorreação de Montenegro) e à resposta linfoproliferativa específica *in vitro*. A doença é muitas vezes refratária à quimioterapia e os pacientes podem morrer de infecções secundárias e desnutrição (MCGWIRE & SATOSKAR, 2013 e STRAZZULLA *et al*, 2013).

As espécies *L. (V.) braziliensis* e a *L. (L.) amazonensis* também são reconhecidas por causar a forma disseminada da leishmaniose, onde são observadas múltiplas lesões cutâneas ulceradas e não ulceradas que estão presentes em mais de uma área corporal (**Figura 4E**). Os indivíduos com leishmaniose disseminada apresentam uma resposta imune com baixa produção de IFN- γ e TNF e resposta negativa ao teste para antígeno de *Leishmania* (SCHRIEFER *et al*, 2004; SILVEIRA *et al*, 2009 e VERNAL *et al*, 2016).

Figura 4 – Manifestações clínicas da Leishmaniose



Legenda: (A) Leishmaniose visceral; (B) Leishmaniose cutânea; (C) Leishmaniose mucosa; (D) Leishmaniose difusa e (E) Leishmaniose disseminada.

Fonte: Adaptado de Machado et al, 2011 e OMS 2015.

2.2 Infecção por *Leishmania (V) braziliensis* e modelo de infecção

A leishmaniose cutânea é a forma mais comum da leishmaniose humana e o Brasil está entre os países com um grande índice de prevalência da doença. Dentro da América Latina, a *L. (V) braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose cutânea (QUEIROZ *et al*, 2012).

A infecção humana por *L. (V) braziliensis* leva a um amplo espectro clínico, imunológico e manifestações histopatológicas da leishmaniose, variando de lesões cutâneas simples e auto-limitadas até a forma clínica mais grave e destrutiva, a mucosa. Isto ocorre devido a resposta imune para esta espécie ter um perfil do tipo 1, com altos níveis de IFN- γ e TNF produzidos principalmente por células T CD4⁺. Este padrão de resposta facilita o controle na proliferação do parasito dentro dos macrófagos, mas por outro lado, contribui para

as alterações patológicas que caracterizam a doença. A *L. (V) braziliensis* também pode causar a forma disseminada da doença (CONCEIÇÃO *et al* 2016; LUCCA & MACEDO, 2016).

Apesar de sua ampla distribuição e importância, poucos estudos têm-se centrado na elucidação dos mecanismos imunológicos de invasão e sobrevivência e de fármacos, capazes de controlar a infecção por esta espécie. Isto se deve a dificuldade no cultivo *in vitro* quanto *in vivo* (OLIVEIRA & BRODSKYN, 2012).

Estudos *in vivo* têm sido negligenciados, pois a maioria dos modelos para infecção por *Leishmania*, como C57BL/6, BALB/c, C3H/HeJ e CBA/CaJ são resistentes à infecção por *L. (V) braziliensis*, levando a uma cura espontânea da infecção em aproximadamente 10 semanas, sem produzir lesões (MEARS *et al* 2015).

Os modelos animais podem ser utilizados com o objetivo de desenvolver novas terapias e vacinas que ofereçam um tratamento seguro, eficaz e de menor custo para leishmaniose. A descoberta do hamster como um modelo experimental para a leishmaniose vem da descoberta da susceptibilidade à infecção por *L. donovani*, fato observado inicialmente por Yong e colaboradores (1919) ao utilizarem o hamster chinês (*Cricetulus griseus*) em estudos do Kala-azar no norte da China. Adler & Theodor (1931) infectaram uma espécie nativa da Síria, o hamster dourado (*Cricetus auratus*), com *Leishmania infantum* e também obtiveram sucesso quanto a susceptibilidade da infecção (SMYLYH & YOUNG, 1923; ADLER & THEODOR, 1931 e revisado por FULTON & JOYNER, 1947).

Desde então, o hamster passou a ser utilizado como modelo experimental para outros trabalhos como estudos em febre amarela (FINDLAY, 1934), hanseníase (ADLER, 1937), pneumonia virótica (PEARSON & EATON, 1940) e tuberculose (TCHERNOMORETZ *et al*, 1940).

O hamster também foi utilizado em um dos primeiros trabalhos para estudo da relação parasito-hospedeiro, quando Michalick (1996) avaliou duas espécies de *Leishmania* pertencentes aos complexos *braziliensis* e *mexicana*. Em parte dos seus resultados, demonstrou que a espécie *L. braziliensis* é capaz de desenvolver lesão no local onde foi inoculada quanto é capaz de disseminar para os linfonodos, baço, fígado e pele aumentando os níveis de IgG. Resultado semelhante, também foi observado por Gomes-Silva e colaboradores ao verem que todos os hamsters (*Mesocricetus auratus*) infectados com *L. (V) braziliensis*, por um período de 110 dias, desenvolveram lesões (MICHALICK, 1996 e GOMES-SILVA *et al*, 2013).

Em um estudo mais recente, Ribeiro-Romão e colaboradores (2014) avaliaram a influência do tamanho do inóculo de *L. (Viannia) braziliensis* em hamsters na imunopatogênese da leishmaniose cutânea e mostraram que o tempo de surgimento das lesões e o aspecto clínico das mesmas varia de acordo com o inóculo de *Leishmania* (10^4 , 10^5 e 10^6). Porém apesar desta diferença no número de parasitos inoculados, a carga parasitária foi a mesma entre os três inóculos (RIBEIRO-ROMÃO *et al*, 2014).

Desde a sua descoberta, por se apresentar susceptível a infecções por espécies de *Leishmania*, o hamster tem sido empregado na manutenção de parasitos, nos estudos de seus ciclos biológicos e em estudos de relação parasito-hospedeiro. Este modelo animal desenvolve lesões cutâneas com características histopatológicas muito semelhantes às observadas em lesões de humanos, sem apresentar cura espontânea o que justifica o uso do modelo hamster nos protocolos experimentais para avaliação de fármacos, vacinação, clínica e estudos terapêuticos. Contudo, o uso do hamster como modelo de infecção ainda é limitado, devido à falta de reagentes disponíveis, tais como anticorpos específicos (GOMES-SILVA *et al*, 2013 e SILVA-COUTO *et al*, 2015).

3 A CÉLULA HOSPEDEIRA E SUA INTERAÇÃO COM A *LEISHMANIA*

3.1 Sistema fagocítico mononuclear - Histórico

Sabemos que a *Leishmania* é um parasita intracelular obrigatório e as células hospedeiras fazem parte do Sistema Fagocítico Mononuclear, ou seja, os fagócitos profissionais (macrófagos e células dendríticas), que estão localizados em vários tecidos do organismo.

O cientista russo Elie Metchnikoff (1845-1916) juntamente com Paul Ehrlich (1854-1915) receberam o prêmio Nobel em Medicina no ano de 1908, pelo trabalho sobre a imunidade inata, quando observaram células que se deslocavam em torno de “materiais estranhos” dentro de larvas de estrela-do-mar. Observaram que este processo era semelhante à resposta inflamatória encontrada em animais com sistemas vasculares. Metchnikoff então, sugeriu uma hipótese de que as células “móveis”, ou fagócitos, em larvas de estrela-do-mar, eram os ancestrais evolucionários das células mesodérmicas em animais superiores, e que estas apresentavam uma função digestiva primitiva como uma defesa contra organismos estranhos. A partir desta observação surge a teoria da fagocitose (Revisado por CAVAILLON, 2011 e DUQUE & DESCOTEAUX, 2014).

Metchnikoff foi o primeiro a classificar, apenas por diferença de tamanho, estas células como "macrófagos" (grandes comedores) e "micrófagos" (os polimorfonucleares). Ele demonstrou que estes dois tipos de fagócitos, que eram vistos apenas como “catadores” ou “limpadores”, também apresentavam um papel importante na resistência do hospedeiro contra infecções, porque eles não apenas realizavam a fagocitose, mas rapidamente matavam e digeriam a maioria dos microrganismos invasores, como por exemplo, *Vibrio cholera*, *Bacillus pyocyaneum*, *Bacillus anthracis* e os seus esporos, *Mycobacterium sp*, estreptococos, gonococos, espiroquetas e leveduras (van FURTH *et al*, 1972 e TAN *et al*, 2009).

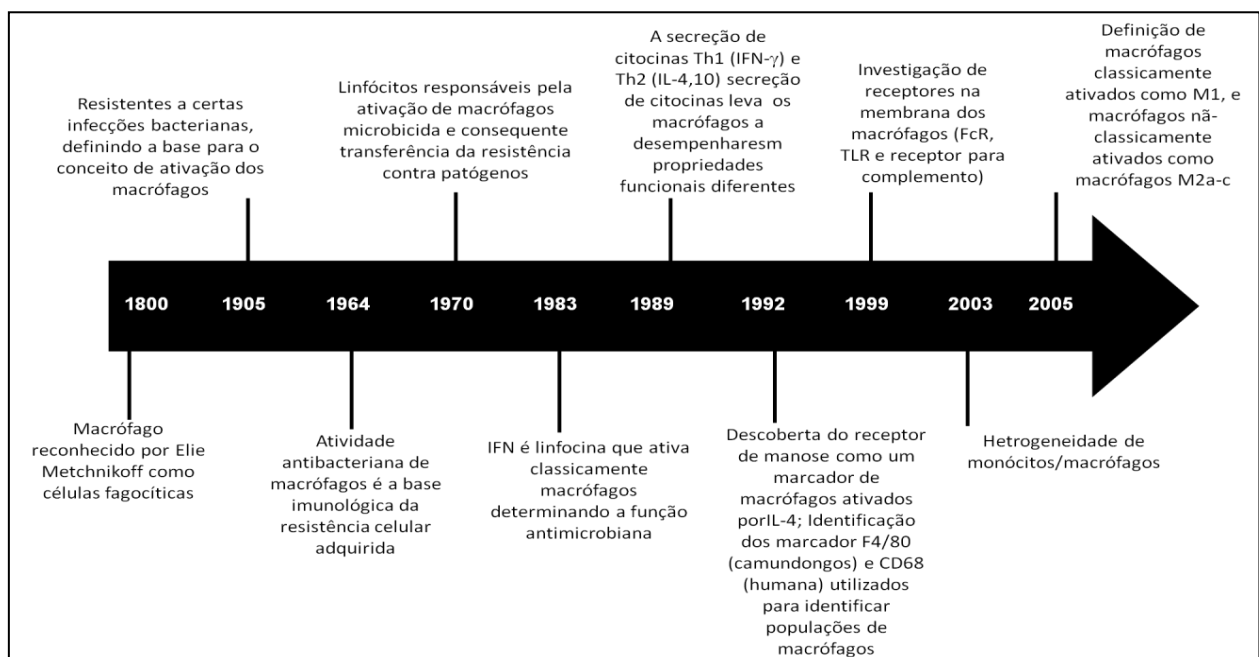
Este estudo resultou na primeira publicação sobre a "digestão intracelular" em 1883 e o surgimento de um novo conceito, a fagocitose, termo que foi usado em seu artigo – *Phagocytosis “Untersuchung uber die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbel tiere”*. Porém, ele reconheceu que não foi o primeiro a observar a captura de materiais particulados por células fagocíticas. Karl Wilhelm von Kupffer (1829-1902) descobriu em 1876, células fagocíticas hepáticas estreladas que receberam o seu nome. Da mesma forma, em 1868, Paul

Langerhans (1847-1888) marcou uma amostra de pele humana com cloreto de ouro identificando as células de Langerhans. No entanto, Metchnikoff foi o primeiro a postular que o processo de fagocitose seria como um sistema imune natural (Revisado por RACINE, 2014).

Nas primeiras décadas do século XX, os esforços eram principalmente dedicados a identificar a origem dos macrófagos. Foi quando Zanvil Cohn juntamente com Ralph van Furth identificaram que a medula óssea era a fonte de monócitos e que estes eram os precursores dos fagócitos (van FURTH & COHN, 1968).

Durante os anos seguintes muitas outras descobertas específicas sobre os macrófagos foram sendo relatadas como, por exemplo: a expressão dos receptores de superfície para porção constante de imunoglobulinas (Fc) (GRIFFIN *et al*, 1975; RHODES, 1975 e 1976), expressão de receptores de complemento (BIANCO *et al*, 1975 e ADEREM & UNDERHILL, 1999), o seu papel na fagocitose de neutrófilos senescentes (NEWMAN *et al*, 1982), seu papel na apresentação de antígenos para linfócitos T (ROSENTHAL & SHEVACH, 1973), a capacidade microbicida mediadas por radicais tóxicos (CHISOLM *et al*, 1983), entre outras (Figura 5).

Figura 5 – Linha do tempo – Avanços na pesquisa sobre a biologia dos macrófagos



Legenda: Ilustração dos resultados mais relevantes no domínio das pesquisas sobre macrófagos até 2005. Fonte: adaptado e revisado por Liu & Yang, 2013.

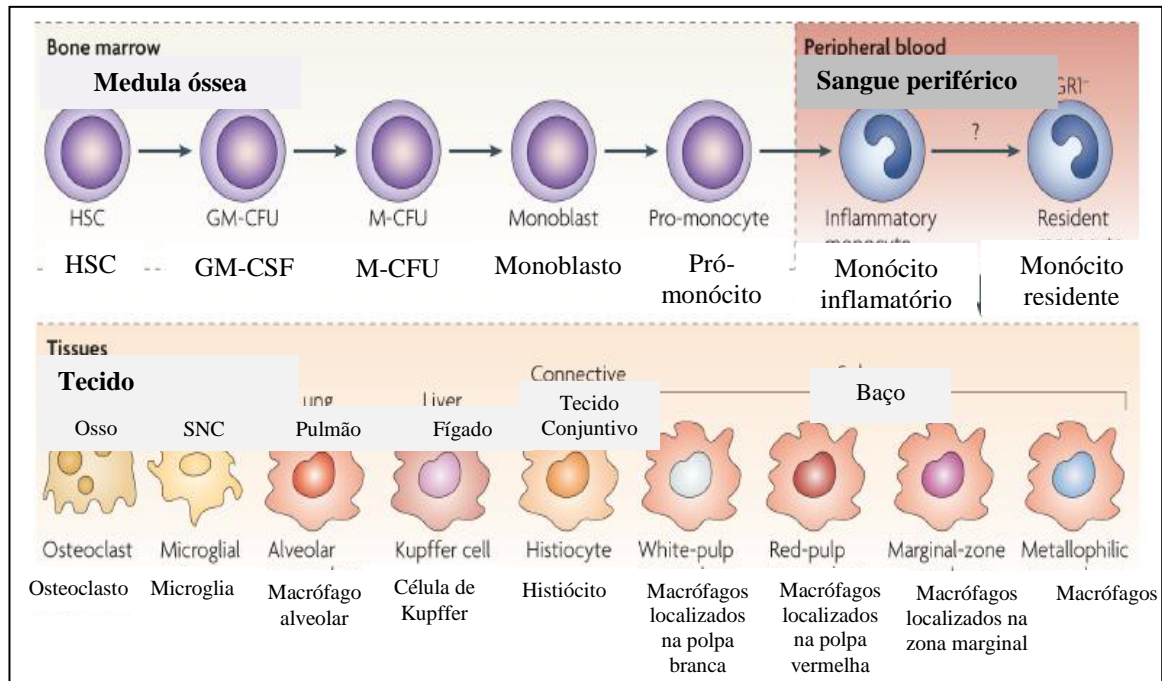
3.2 Origem dos macrófagos

A maioria dos macrófagos é derivada de células precursoras de medula óssea que se desenvolvem em monócitos. Estes monócitos, são formados a partir de células estaminais de linhagem granulócito-monocítica que estão expostas a estímulos, tais como fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e interleucina-3 (IL-3). A diferenciação de células estaminais está associada com a expressão de receptores de membrana específicos para citocinas (DUQUE & DESCOTEAUX, 2014).

Os macrófagos estão presentes em praticamente todos os tecidos. Eles diferenciam-se a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), que migram para os tecidos no estado estacionário ou em resposta a inflamação. Estas PBMCs desenvolvem-se a partir de uma célula progenitora mielóide comum na medula óssea que é o precursora de muitos tipos diferentes de células, incluindo neutrófilos, eosinófilos, basófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e mastócitos.

Durante o desenvolvimento de monócitos, as células progenitoras mielóides dão origem a monoblastos, pró-monócitos e, finalmente, monócitos, que são libertados a partir da medula óssea para a corrente sanguínea (**Figura 6**). Os monócitos, através da circulação sanguínea, migram para os tecidos para reabastecer macrófagos de vida longa, como: Osteoclastos (nos ossos), histiócitos (tecido conjuntivo), Kupffer (no fígado), e macrófagos dos alvéolos, trato gastrointestinal, baço e peritônio. Este processo de diferenciação envolve muitas mudanças como o aumento do tamanho celular (5 a 10 vezes), o número e a complexidade das organelas e o aumento da capacidade fagocítica (MOSSER & EDWARDS, 2008 e PERDIGUERO *et al*, 2015).

Figura 6 – Formação e diferenciação dos monócitos



Legenda: Os monócitos têm origem na medula óssea a partir de uma célula-tronco hematopoética comum. Em resposta ao fator estimulante de colônias de macrófagos, eles se dividem e diferenciam-se. Os monócitos migram para diferentes tecidos, onde através de estímulos se diferenciam em macrófagos. HSC – Células estaminais hematopoiéticas; GM-CSF – fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos; SNC – Sistema nervoso central; M-CFU – unidade formadora de colônias de macrófagos.

Fonte: adaptado de Mosser & Edwards, 2008.

Nem todos os macrófagos, tais como as células de Langerhans (na epiderme) e Microglia (sistema nervoso), desenvolvem-se a partir de monócitos. Alguns estudos com camundongos, utilizando marcadores específicos de células embrionárias, demonstraram que determinadas populações de macrófagos residentes no fígado (células de Kupffer), cérebro (microglia), epiderme (células de Langerhans) e pulmão (macrófagos alveolares) são independentes da diferenciação de monócitos e até mesmo de células precursoras da medula óssea. Estes macrófagos seriam originados a partir de dois precursores durante o desenvolvimento embrionário: do saco vitelino e do fígado fetal (DUQUE E DESCOTEAUX, 2014 e PERDIGUERO *et al*, 2015).

Os macrófagos oriundos do saco vitelino, seriam considerados macrófagos primitivos que posteriormente dariam origem as células da Microglia e os derivados do fígado fetal, chamados de monócitos fetais que dariam origem, por exemplo as células de Langerhans. Estes macrófagos seriam denominados de macrófagos teciduais residentes, sendo considerados uma população de macrófagos de longa duração e auto-renováveis (HOEFFEL & GINHOUX, 2015).

Os macrófagos teciduais residentes apresentam uma gama de funções, como: depuração (degradação dos núcleos eritróides, eritrócitos senescentes, células em apoptose e surfactante pulmonar), desenvolvimento (degradação óssea e angiogênese) e a regulação do metabolismo (regulação da sensibilidade à insulina e termogênese adaptativa no tecido adiposo). Sendo uma das funções de maior relevância a de sentinela do sistema imunológico, como “primeira linha de reconhecimento” contra patógenos na resposta inata e na restauração da homeostasia (DAVIES *et al*, 2013).

Os macrófagos podem passar a expressar propriedades funcionais especializadas e polarizadas para desempenharem as suas funções, para isso, eles precisam ser ativados por diferentes sinais extracelulares, que podem ser citocinas, quimiocinas, antígenos e estímulos microbianos. Esta ativação resulta no aumento da produção de citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios (CORNA *et al*, 2010).

3.3 Papel das citocinas na ativação e heterogeneidade dos Macrófagos

Citocinas e quimiocinas são moléculas de sinalização que são importantes para a vida, assim como, os hormônios e neurotransmissores. Elas são proteínas de baixo peso molecular que medeiam a comunicação intercelular e de forma eficaz, desencadeiam um *link* entre a resposta imune inata e adaptativa. São produzidas por diversos tipos de células (leucócitos, adipócitos, células endoteliais e epiteliais), principalmente por macrófagos e linfócitos. Elas foram descobertas no início dos anos 1960 e 1970, e presume-se que mais de 100 diferentes proteínas são conhecidas como citocinas (DUQUE & DESCOUTEAUX, 2014).

As citocinas ligam-se a receptores de membrana específicos de outras células, e podem exercer um efeito autócrino (quando é capaz de agir sobre as próprias células que a produzem), parácrino (quando age em células vizinhas às que a produzem) ou endócrino (quando age em células distantes ao seu local de produção), podem ser pleiotrópicas (agem em diferentes tipos celulares) e redundantes (diferentes citocinas possuem a mesma função) (STOW & MURRAY, 2013).

Estas moléculas orquestram uma variedade de processos, como regulação da inflamação local e sistêmica, regulação positiva ou negativa de vários genes e de seus fatores de transcrição, produção de outras citocinas, proliferação celular, aumento no número de

receptores de superfície para outras moléculas, e/ou, eventualmente, na supressão do próprio efeito da citocina (**TABELA 3**) (DUQUE & DESCOUTEAUX, 2014).

Para que o sistema imune funcione adequadamente, a síntese e a liberação das citocinas devem ser reguladas. Elas podem aumentar (pró-inflamatórias) ou atenuar (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória. Algumas citocinas podem ter ações pró- (resposta tipo 1) ou anti-inflamatórias (resposta tipo 2), de acordo com o microambiente no qual estão localizadas (BARROS DE OLIVEIRA et al, 2011 e LACY & STOW, 2011).

Dependendo do tipo de citocina a qual são expostos, os macrófagos passam a expressar propriedades funcionais especializadas e polarizadas, podendo ser classificados em dois espectros funcionalmente distintos: em macrófagos classicamente ativado (ou M1) ou macrófagos alternativamente ativados (ou M2) (Figura 7) (CORNA *et al*, 2010 e LIU & UZONNA, 2012).

Tabela 3 – Citocinas importantes para macrófagos

Citocina	Célula (s) produtora (s)	Célula alvo	Ação	Referências
IL-1 β	Monócitos e macrófagos.	Atua sobre o sistema nervoso central.	Provoca vasodilatação e inflamação localizada, atrai granulócitos, aumenta à expansão e a diferenciação de células T CD4 e a produção de óxido nítrico.	BARROS DE OLIVEIRA, 2011.
IL-6	Monócitos, Células T e B.	Células B maduras e fígado.	Promove a maturação e ativação de neutrófilos e macrófagos, a diferenciação das células B e ativa as células T citotóxicas. Recrutamento de monócitos para a inflamação local e inibe a apoptose celular.	HURST <i>et al</i> , 2001 e DUQUE & DESCOTEAUX, 2014.
IL-8	Monócitos, macrófagos e outras células.	Neutrófilos.	Contribui para a infiltração de leucócitos no local da infecção.	STEEVELS & MEYAARD, 2011.
IL-12	Células dendríticas, macrófagos e células B e NK.	Células T e NK.	Ativa as células natural killer e induz a diferenciação de linfócitos T CD4+ naive em células T auxiliares, que são importantes na resposta contra patógenos intracelulares.	VIGNALI & KUCHROO, 2014 e MA <i>et al</i> , 2015.
TNF	Monócitos, macrófagos e linfócitos T.	Neutrófilo, endotélio, hipotálamo, fígado.	Estimula a expressão ou liberação de moléculas de adesão, prostaglandina 2, fator ativador de plaquetas, glicocorticoides e eicosanóides e influencia a apoptose celular.	BARROS DE OLIVEIRA, 2011.
IFN- γ	Células T, B e natural killer.	Monócitos e endotélio.	Inibição da proliferação de células que sintetizam IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13.	KIMA & SOONG, 2013.
IL-4	Células TCD4 ⁺ e mastócitos.	Células T, células B e endotélio.	Determina o perfil da resposta imune tipo 2. Induz a proliferação e diferenciação de células B, aumenta a expressão de MHC-II.	BARROS DE OLIVEIRA, 2011.
IL-10	Monócitos, macrófagos e células T.	Monócitos, macrófagos e células B.	Regula o crescimento e/ou a diferenciação das células B, células natural killer, células T citotóxicas e T auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas e queratinócitos.	GAUTAM <i>et al</i> , 2011 e MA <i>et al</i> , 2015.

Fonte: A autora, 2016.

A ativação clássica de macrófagos é mediada por citocinas inflamatórias como IL-1 β e IFN- γ e por produtos microbianos, como por exemplo, lipopolissacarídeo (LPS) sozinhos ou associados. Estes macrófagos classicamente ativados ou M1, apresentam um fenótipo pró-inflamatório e/ou microbicida, produzindo e secretando citocinas e quimiocinas como IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23, TNF, CCL3, CXL9 e CXCL10, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO); aumentando a expressão MHC de classe II e CD86. Os macrófagos M1 são capazes de apresentar antígenos para a célula T, além de possuir a capacidade fagocítica aumentada. Por apresentarem estas funções, os macrófagos M1 participam como células indutoras e efetoras nas respostas imune do tipo 1 (Th1) que são importantes no controle de parasitos intracelulares e tumores (LIU & UZONNA, 2012; TOMIOKA *et al*, 2012; GABUNIA & AUTIERI, 2014 e GUHA *et al*, 2015).

Em contraste à ativação clássica, a ativação alternativa de macrófagos é induzida por citocinas do tipo 2 (Th2), IL-4 e IL-13 ou glicocorticóides. Os macrófagos M2 são importantes no processo de cicatrização, remodelação de tecidos e regulação da inflamação (FERRANTE & LEIBOVICH, 2011; DAVIES *et al*, 2013 e TIAN & CHEN, 2015).

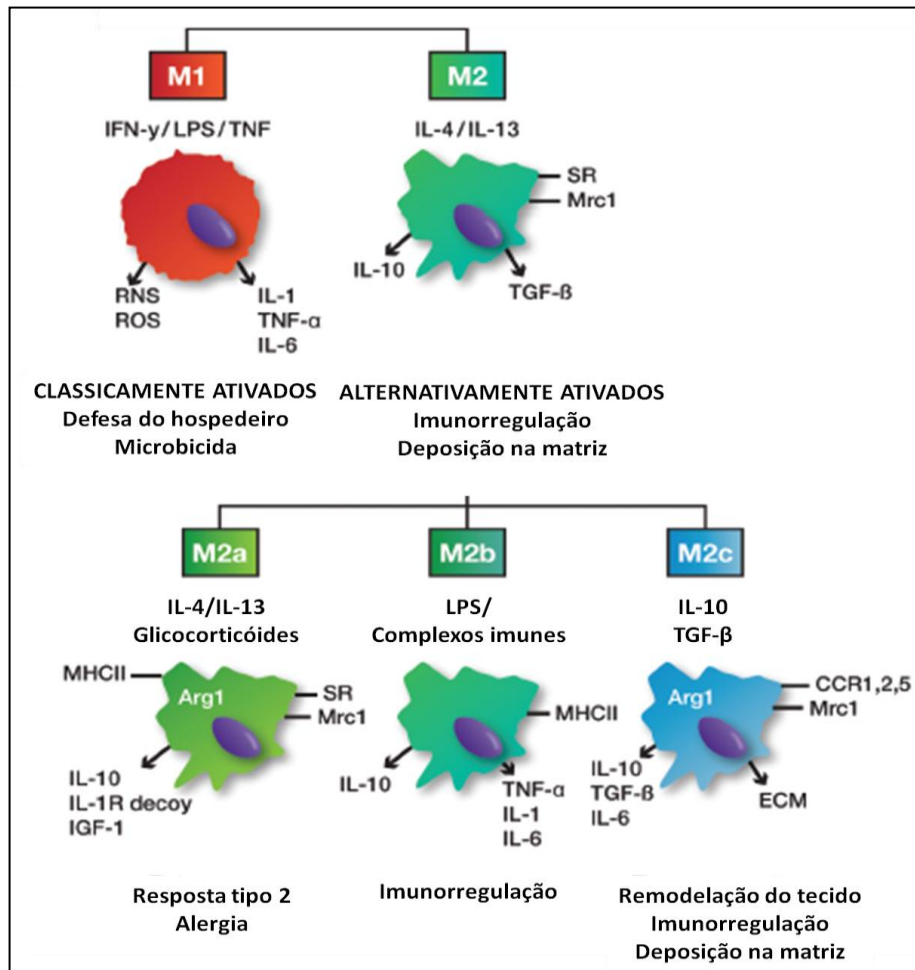
Portanto, macrófagos alternativamente ativados (M2) apresentam fenótipos diferentes, de acordo com o estímulo e função, podendo ser subdividido em várias subpopulações, tais como M2a, M2b e M2c (**Figura 7**).

A produção de IL-4 e IL-13, geradas como parte de um resposta tipo 2, estimula macrófagos a adquirirem um fenótipo M2a. Estes macrófagos diminuem a produção de citocinas pró-inflamatórias e consequentemente a resposta contra patógenos intracelulares, além da redução da sua atividade fagocítica. Os macrófagos M2a produzem mediadores anti-inflamatórios tais como, IL-10 e TGF- β que irão equilibrar a resposta imune do hospedeiro (JONES & RICARDO, 2013).

O fenótipo M2b é induzido por uma combinação de LPS, imunocomplexos, células apoptóticas e IL-1Ra. Estes macrófagos secretam elevados níveis de IL-10 e baixos níveis de IL-12, mas também citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e a quimiocina CCL1 que está envolvida no recrutamento seletivo de células Tregs e eosinófilos, além de expressar iNOS (LABONTE, 2014).

Os macrófagos com o fenótipo M2c são induzidos por glicocorticóides, IL-10 e TGF- β . Macrófagos M2c promovem o desenvolvimento de linfócitos Th2 e Tregs. Estes macrófagos também expressam altos níveis de arginase e promovem a regeneração de tecidos e a angiogênese (TOMIOKA 2012 e DUQUE & DESCOTEAUX, 2014).

Figura 7 – Heterogeneidade e sistema de classificação dos macrófagos



Legenda: Classificação de macrófagos com base na ativação "clássica" (M1) e na ativação "alternativa" (M2). Macrófagos M1 são ativados por estímulos pró-inflamatórios tal como o IFN- γ que irá induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas microbicidas como, espécies reativas de nitrogênio (RNS) e oxigênio (ROS) que medeiam as funções de defesa do hospedeiro. Os macrófagos assumem um estado de ativação alternativo em resposta a exposição a IL-4 / IL-13 e caracterizam-se pela expressão do receptor de manose (MRC1) e liberação de citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 que medeiam uma respostas tipo 2. Considerando a diversidade dentro da categoria alternativa, os macrófagos foram subclassificação em M2a, M2b e M2c, onde cada um apresenta fatores indutores, produção de citocinas e funções características.

Fonte: adaptado de Jones & Ricardo, 2013.

Os macrófagos são, portanto, células importantes para a manutenção da homeostasia. Quando a sua ativação não é equilibrada estas células contribuem para o desenvolvimento e amplificação da inflamação. Os macrófagos também apresentam um papel central nas respostas inata e adquirida, portanto, as respostas envolvidas nas doenças e patógenos depende de como ele será ativado (GUHA *et al*, 2015).

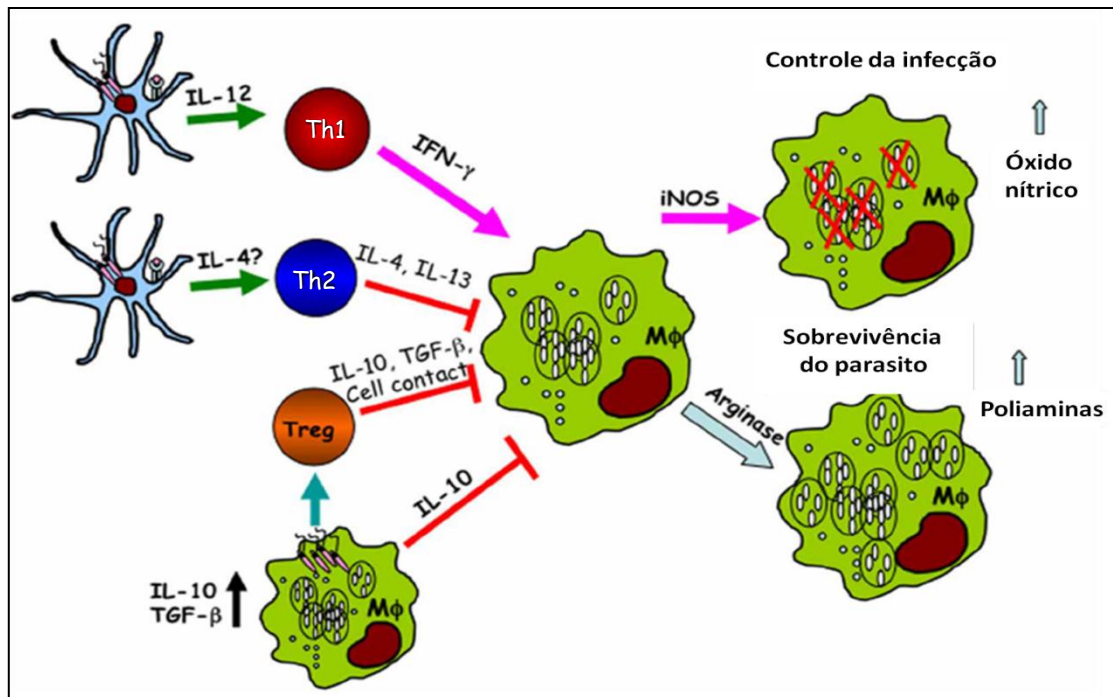
3.4 Importância da modulação de macrófagos para o controle da leishmaniose

As células dendríticas e os macrófagos, desempenham papéis importantes na resposta imune inata e adquirida na infecção por *Leishmania*. Como vimos, o macrófago é a célula hospedeira da *Leishmania*, sendo a susceptibilidade e a resistência à infecção dependente de como ele será ativado (LIU & UZONNA, 2012 e GUHA *et al*, 2015).

Os macrófagos, como uma das células apresentadoras de antígeno (APCs), desempenham um papel crucial na eliminação de agentes patogênicos intracelulares, pois reconhecem os patógenos, opsonizados ou não, fagocitando-os e degradando-os para posteriormente apresentar os antígenos aos linfócitos T. A interação dos macrófagos com as células T e sequencialmente os sinais co-estimuladores (ligação de CD28 e receptor B7), resultam em sua ativação além de estimular a produção de citocinas e quimiocinas. As células T, por sua vez irão modular a atividade de macrófagos auxiliando na eliminação e/ou no controle de patógenos intracelulares. Assim, o macrófago além de atuar na resposta inata, também atua como célula efetora da resposta adaptativa (KHAN *et al*, 2012; VIEIRA *et al*, 2013 e XU & BANCHEREAU, 2014).

A resposta imune contra *Leishmania* está associada a resposta tipo 1. O IFN- γ , estimula a enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS2), que degrada a L-arginina promovendo a produção de óxido nítrico, que mata os parasitos, além da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Por outro lado, a ação das citocinas IL-4, IL-10 ou IL-13, produzidas por uma resposta tipo 2, desativam o mecanismo microbicida de macrófagos, pois ativam a arginase 1 que compete com iNOS pela L-arginina resultando na produção de poliaminas favorecendo então, o crescimento de parasitos intracelulares (**Figura 8**) (DUTRA *et al*, 2010 e RASOLZADEH *et al*, 2015).

Figura 8 – Células dendríticas e macrófagos regulando a resposta imune contra a infecção por *Leishmania*.



Legenda: Após a infecção, os macrófagos e células dendríticas fagocitam a *Leishmania*. As células dendríticas produzem IL-12, que é importante para a produção de IFN- γ que atuará sobre macrófagos infectados levando a sua ativação (ativação clássica), regulando também a iNOS e a produção de óxido nítrico e outros radicais livres que são importantes para matar os parasitos intracelulares. Em contraste, a produção de IL-4 e IL-13 por outros tipos de células (incluindo queratinócitos e células do tipo 2), leva a regulação da atividade da arginase, a ativação alternativa de macrófagos e a produção de poliaminas favorecendo o crescimento e proliferação do parasita intracelular.

Fonte: Adaptado de Liu & Uzonna, 2012.

4 TRATAMENTO CONTRA LEISHMANIOSE

A OMS considera a leishmaniose como uma das principais doenças negligenciadas no mundo. Os fármacos disponíveis, para o tratamento da leishmaniose (**TABELA 4**), não podem ser considerados ideais devido à sua elevada toxicidade, a longa duração do tratamento e pelo desenvolvimento de reações adversas graves, que muitas vezes levam ao paciente abandonar o tratamento. Além disso, os fármacos mais comumente usados não eliminam completamente os parasitos de todos os indivíduos infectados (MENEZES *et al*, 2015).

Um dos fármacos de primeira escolha para a leishmaniose é o Antimonial pentavalente (antimoniato de N-metilglucamina – Sb). O antimônio é indicado para o tratamento de todas as formas de leishmaniose tegumentar e visceral, porém seu mecanismo de ação ainda não está totalmente estabelecido. O efeito sobre a forma amastigota intracelular depende da redução do antimônio pentavalente em trivalente, dentro do macrófago. Devido à acumulação nos tecidos, os antimoniais podem causar efeitos adversos graves, como vômitos, náuseas, anorexia, mialgia, dor abdominal, dor de cabeça, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, artralgia, letargia e em alguns casos arritmia cardíaca (GOTO & LINDOSO, 2010 e TIUMAN *et al*, 2011).

Os fármacos de segunda escolha são Anfotericina B, Pentamidina, Paramomicina e Miltefosina.

A administração da Anfotericina B é intravenosa e as reações são calafrios, febre, associada à miocardite e nefrotoxicidade. Algumas formulações da Anfotericina B (o complexo de lípido, forma coloidal e a forma lipossomal) foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade do fármaco, já que este apresenta uma toxicidade elevada. Embora apresentando uma menor toxicidade, estas formulações alternativas têm limitações, como por exemplo, o alto custo e a instabilidade a temperaturas mais altas (o que exige refrigeração). O mecanismo de ação envolve sua ligação ao ergosterol, principal esterol presente na superfície da *Leishmania*, com consequente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (MINODIER & PAROLA, 2007; MUKHERJEE *et al*, 2010 e CROFT & OLLIARE, 2011).

Ainda nos fármacos de segunda escolha, encontramos a Pentamidina que é recomendada principalmente quando a terapêutica é combinada a outros tratamentos e fármacos como, por exemplo, com o antimônio. A Pentamidina, também apresenta alta toxicidade e desencadeia importantes efeitos adversos, tais como a hipoglicemia grave,

hipotensão, miocardite e toxicidade renal. Sua interferência se dá sobre o DNA da *Leishmania* provavelmente modificando a morfologia do cinetoplasto, fragmentando a membrana mitocôndrial, levando à morte do parasito (BARRAL & COSTA, 2011 e SOTO *et al*, 2016).

A Paramomicina, um antibiótico, mostrou-se eficaz quer como monoterapia ou em combinação com outros fármacos no tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar, principalmente no Velho Mundo. Pode ser bem tolerada, porém pode causar reações adversas graves, incluindo nefrotoxicidade, ototoxicidade e, mais raramente, hepatotoxicidade. O fármaco se liga as proteínas ribossômicas e desta forma induz uma leitura equivocada do mRNA, interferindo assim no complexo de formação dos peptídeos (SOARES-BEZERRA *et al*, 2004 e HENDRICKX *et al*, 2012).

A Miltefosina é administrada por via oral, sendo uma via importante para a autoadministração do fármaco pelos pacientes infectados. No entanto, seu uso é limitado para mulheres grávidas, uma vez que os efeitos secundários mais graves deste medicamento é a indução de teratogênese. Sua atividade sobre o parasito se deve a interação com lipídeos, fosfolipídeos e esteróis da membrana plasmática, bem como a interferência da funcionalidade de diferentes enzimas relacionadas com metabolismo de fosfolipídios, culminando na indução de apoptose nos parasitos (BARRATT & COLS, 2009 e MCGWIRE & SATOSKAR, 2013).

Tabela 4 – Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose

Fármacos	Via de administração	Dosagem	Toxicidade
Antimoniais pentavalentes	IV e IM	20mg/kg/dia (28–30 dias)	Cardiotoxicidade grave, pancreatite, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.
Anfotericina B	IV	0.75-1mg/kg/dia (15-20dias, dose diária ou alternada)	Nefrotoxicidade grave (relacionado com a perfusão), hipocalcemia e febre alta.
Anfotericina B lipossomal	IV	10-30mg/kg dose total (Dose única 3-5mg/kg/dose)	Arrepios durante a infusão e nefrotoxicidade leve.
Miltefosina	Oral	100-150 mg/dia (28 dias)	Vômitos e diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade.
Paramomicina	IM (VL) ou Tópico (CL)	15mg/dia (21 dias) ou 20mg/kg (17 dias)	Neurotoxicidade grave, ototoxicidade e hepatotoxicidade.
Pentamidina	IM	3 mg/kg/dia (4 dias)	Alta taxa de hiperglicemia, como um resultado de dano pancreático; hipotensão, taquicardia e alterações no eletrocardiograma.

Legenda: IV: administração intravenosa; IM: administração intramuscular

Fonte: *adaptado de Menezes et al, 2015*

O arsenal terapêutico contra as leishmanioses é limitado e não existe um tratamento único, que seja eficaz para todas as espécies de *Leishmania* ou manifestação clínica da doença. Alguns compostos com potencial quimioterápico têm sido investigados no Novo Mundo com o objetivo de delinear o papel de substâncias que possam modular a resposta imune, a fim de controlar a doença. O potencial de substâncias imunomoduladoras no tratamento experimental da leishmaniose, ganhou impulso com a descoberta da atividade leishmanicida de Imiquimode (CHOUHAN *et al*, 2014).

Imiquimode, um antineoplásico, foi aprovado pela agência americana *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de verrugas genitais causadas por papilomavírus humano. De uso tópico, o Imiquimode inicia uma reação imunitária local, resultando na resolução da infecção e regressão da lesão causada pelo vírus. Como o Imiquimode modula as células do sistema imune, incluindo macrófagos, que são as células hospedeiras de espécies

de *Leishmania*, testes em pacientes infectados por *L. peruviana* e contra *L. donovani* e *L. major* foram realizados *in vitro* e *in vivo* para analisar a ação desta substância. Para estes testes, Imiquimode foi utilizado em associação com outras substâncias e medicamentos (S-28463 e Glucantime®) (BUATES & MATLASHEWSKI, 1999 e AREVALO *et al*, 2001).

In vitro, o Imiquimode induziu a expressão do gene da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e a liberação de óxido nítrico estimulando a atividade leishmanicida. *In vivo*, o tratamento tópico com Imiquimode reduziu significativamente as lesões, em relação ao controle, causadas por *L. major*. O resultado da análise das células mononucleares do sangue periférico dos pacientes infectados por *L. peruviana*, mostrou que Imiquimode é um potente indutor de citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α (BUATES & MATLASHEWSKI, 1999 e AREVALO *et al*, 2001).

Dos fármacos já utilizados contra leishmaniose, a Anfotericina B, Miltefosina e Glucantime® apresentam ação direta sobre a *Leishmania spp* e possuem ação imunomoduladora que contribui para seu efeito anti-*Leishmania*. A Anfotericina B é capaz de contornar a resposta imunossupressora induzida por *Leishmania* no hospedeiro induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e TNF- α juntamente com o NO. A miltefosina induz uma resposta imune tipo 1 com aumento de IFN- γ e IL-12 e produção de NO (MUKHERJEE *et al*, 2010). Os estudos de Muniz-Junqueira & De Paula-Coelho sugerem que o antimoniato de meglumina age também aumentando a capacidade fagocítica dos macrófagos e a sua produção de superóxidos, TNF- α e óxido nítrico (MUNIZ-JUNQUEIRA & PAULA-COELHO, 2008; WADHONE *et al*, 2009 e MURKHERJEE *et al*, 2010).

A associação de fármacos a outros compostos e substâncias também já vem sendo utilizado em tratamentos contra a leishmaniose. Alguns estudos têm utilizando o Bacilo de Calmette-Guerin (BCG) e Monofosforil-lípido A (MPL), que são dois imunostimulantes, como adjuvantes, pois ambos aumentam a resposta mediada por células. O BCG é um imunomodulador que estimula vários receptores Toll-like (TLRs), o que pode potencializar a resposta imune do tipo 1. Smrkovski & Larson (1977), mostraram que BCG pode proteger camundongos contra a leishmaniose visceral, diminuindo a carga parasitária, e que tem sido muito utilizado como adjuvante em ensaios de eficácia no campo de vacinas contra a leishmaniose (revisado por NOAZIN *et al*, 2008).

MPL, o derivado não tóxico de lipopolissacarídeo (LPS) de *Salmonella minnesota* é um adjuvante seguro e bem tolerado aprovado para uso humano, este ativa a resposta de células T efectoras. Vários estudos de imunização incluindo *Leishmania*, malária, vírus do papiloma humano (HPV), o vírus da Hepatite B (HBV), tuberculose e HIV com diferentes

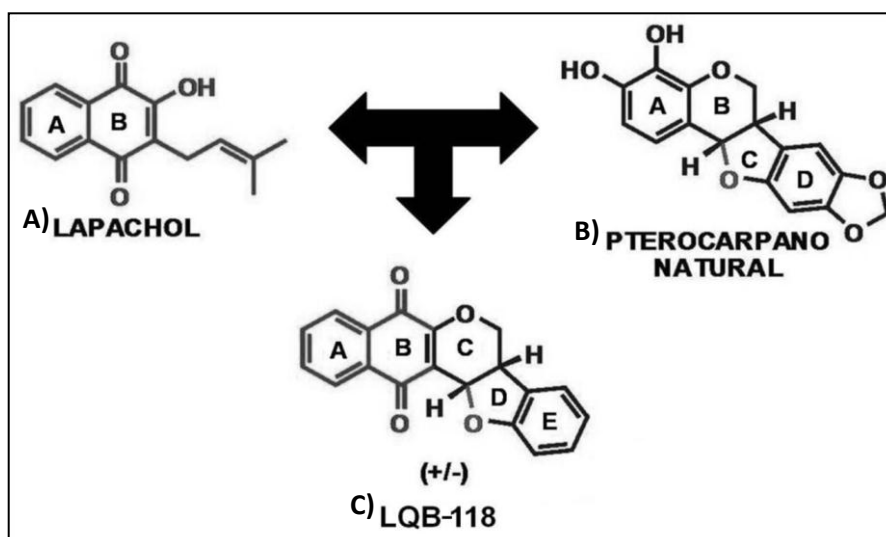
formulações de MPL estabeleceram a segurança e a eficácia deste adjuvante promissor (RAVINDRAN *et al*, 2010)

Entre os recursos naturais, a atividade biológica de extratos vegetais, tem sido atribuída às substâncias e moléculas pertencentes a diferentes grupos químicos, tais como: flavonóides, isoflavonas, alcalóides e quinonas, também são conhecidas pela ação imunomoduladora (TIUMAN *et al*, 2011; NAGLE *et al* 2014; MENEZES *et al*, 2015 e SAVOIA, 2015).

5 PTEROCARPANOQUINONA – LQB-118

A LQB-118, faz parte de um grupo de substâncias sintetizadas pelo Laboratório de Química Bioorgânica, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais Walter Mors (NPPN), da Universidade Federal do Rio de Janeiro, a partir da hibridação molecular do lapachol, isolado de *Tabebuia sp* e do pterocarpano isolado de *Petalostemon purpureus* (**Figura 9**) (DA SILVA, 2009).

Figura 9 – Síntese da pterocarpanoquinona



Legenda: (A) Lapachol isolado de *Tabebuia sp*; (B) Pterocarpano isolado de *Petalostemon purpureus*; (C) Pterocarpanoquinona LQB-118.

Fonte: adaptado de De Sá Bacelar, 2010.

O lapachol é uma naftoquinona e tem sido matéria prima para a síntese de muitas outras moléculas e várias atividades farmacológicas foram atribuídas a ele e a seus derivados semissintéticos, como atividade cercaricida (prevenção contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* na pele); antimalárico (atividade contra eritrócitos parasitados por *Plasmodium falciparum*); ação moluscida (atividade contra caramujos *Biomphalaria glabrata*) e leishmanicida (TEIXEIRA *et al*, 2001; SILVA *et al*, 2003 e SALUSTIANO *et al*, 2009).

O lapachol apresenta a capacidade de induzir o estresse oxidativo promovendo a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, o

ânion-radical superóxido e o radical hidroxila. Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes, tanto em células normais como em células cancerígenas (SILVA *et al*, 2003).

Os pterocarpanos são isoflavonóides isolados, principalmente, de leguminosas. Estes metabólitos atuam como mecanismo de defesa contra patógenos para as plantas. Alguns pterocarpanos, tais como 3,4-Diidroxi-8,9-metilenedioxipterocarpano e seus derivados têm demonstrado efeito citotóxico também para células de carcinoma humano (NETTO *et al*, 2009). Estudos indicam que os isoflavonóides apresentam efeitos antimutagênicos, anticancerígenos, antiproliferativo, principalmente *in vitro*. Os isoflavonóides foram definidos classicamente como antioxidantes, isto é, compostos que podem proteger contra o estresse oxidativo ligada à inflamação e o risco de danos por radicais livres (BEZEK *et al*, 2008).

A pterocarpanoquinona LQB-118 foi testada em linhagens de células cancerígenas e em células oriundas de pacientes com leucemia (Daudi, K562, K562-Lucena, Jurkat, Kasumi-1, MDR, HL60 e U937), sendo capaz de diminuir a viabilidade celular, induzir a externalização da fosfatidilserina, fragmentar o DNA, induzir morte celular por apoptose, aumentar a concentração de cálcio citoplasmático, inibir o ciclo celular, modular vias de sinalização associadas a fatores de transcrição, como FOXO3a e FOXM1, NF-κB. Sendo assim, a LQB-118 apresenta atividade antitumoral (SALUSTIANO *et al*, 2009; MAIA *et al*, 2011; de SÁ BACELAR *et al*, 2013; de SOUZA REIS *et al*, 2013; MARTINO *et al*, 2014; NESTAL DE MORAES *et al*, 2014; de FARIA *et al*, 2015).

Além da atividade antitumoral, a LQB-118 também apresentou atividade contra espécies de *Leishmania*. As formas promastigotas de *L. amazonensis* incubadas com LQB-118 apresentaram um aumento na produção de ROS durante as primeiras horas, levando a um estresse oxidativo, resultando na alteração do potencial da membrana mitocondrial. Ribeiro e colaboradores também observaram, que a LQB-118 é capaz de induzir a morte por apoptose nas formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (RIBEIRO *et al*, 2013).

Em experimentos *in vivo*, camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados com a LQB-118 por via oral, intralesional e intraperitoneal apresentaram uma redução da lesão e uma importante redução na carga parasitária, sem alterar marcadores sorológicos de toxicidade (CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2011).

Em estudos mais recentes, a LQB-118 mostrou-se eficaz no modelo de leishmaniose visceral experimental, em camundongos infectados por *L. infantum*, reduzindo a carga

parasitária no fígado e no baço, com efeito dependente da dose utilizada e sem induzir alterações nos sinais clínicos avaliados e nas análises histopatológicas do esôfago, estômago, intestino delgado, pulmões, coração e rins (CUNHA-JUNIOR *et al*, 2016).

Em *L. (V). braziliensis* o efeito antiparasitário foi avaliado sobre o crescimento *in vitro* das formas promastigotas e sobre amastigotas intracelulares em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss. A ação da LQB-118 inibiu significativamente o crescimento das formas amastigotas intracelulares e promastigotas de maneira dependente da dose, sendo a ação irreversível de acordo com a concentração. A LQB-118 foi capaz de induzir a externalização de fosfatidilserina em promastigotas e também promoveu o aumento da fluorescência nas duas formas evolutivas da *Leishmania* quando comparadas aos controles, demonstrando a indução de fragmentação do DNA do parasito. Esta substância também foi capaz de modular a resposta dos macrófagos infectados por 24 horas aumentando de forma dose-dependente a IL-12 e NO, mantendo constante TNF. Esses dados indicam que a LQB-118 é capaz de modular o macrófago para um estado pró-inflamatório que pode contribuir para a ação leishmanicida (COSTA, 2011).

Em um ensaio piloto, *in vivo*, utilizando hamsters como modelo experimental, observamos uma redução significativa do tamanho das lesões nos animais tratados com LQB-118 intralesional ($p < 0,001$) e no grupo tratado pela via oral ($p < 0,05$) quando comparado com o controle (COSTA, 2011).

6 JUSTIFICATIVA

Apesar da importância da *L. (V) braziliensis*, os estudos com esta espécie em particular são escassos. Isso se deve principalmente às dificuldades em cultivá-la e em mantê-la em animais de experimentação.

O modelo experimental proposto nesse estudo, o hamster, é considerado um bom modelo para infecção por *L. (V) braziliensis* permitindo uma razoável correlação com a infecção humana. E também, o estudo usando as células mononucleares do sangue periférico humano permitirá conhecer a capacidade antiparasitária e imunomoduladora da substância ao analisarmos a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

A molécula estudada (o protótipo LQB-118) já mostrou, em trabalhos realizados, ter atividade terapêutica em camundongos infectados com *L. amazonensis*. Portanto a demonstração do efeito em outra espécie de *Leishmania*, particularmente a *L. (V) braziliensis* pela sua relevância epidemiológica, tem grande importância para ratificar o potencial terapêutico na leishmaniose. Além disso, o estudo no modelo hamster será uma etapa importante para compor os ensaios pré-clínicos dessa molécula.

7 OBJETIVOS

Geral

Estudar a capacidade da pterocarpanoquinona LQB-118 modular a função microbicida de macrófagos e avaliar sua ação terapêutica em hamsters infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Específicos

I HAMSTER

1 – Atividade da LQB-118 sobre a célula hospedeira – Macrófagos – *In vitro*

- a) Analisar os efeitos da LQB-118 sobre macrófagos – Viabilidade celular; Potencial da membrana mitocondrial e Capacidade fagocítica dos macrófagos pré-tratados;
- b) Avaliar a produção de radicais tóxicos – Óxido Nítrico (NO) e de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS);

2 – Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania (V) braziliensis* – *In vitro*

- a) Analisar a atividade sobre amastigotas intracelulares – Macrófagos tratados antes e após infecção;
- b) Avaliar a sobrevivência das amastigotas intracelulares;
- c) Analisar a atividade leishmanicida da LQB-118 por detecção da fragmentação do DNA *in situ*;

3 – Atividade terapêutica da LQB-118 *in vivo*

- a) Estabelecer o melhor esquema de tratamento – Tratamento após uma semana de infecção; Tratamento após lesão estabelecida e Tratamento antes da infecção;
- b) Avaliar os seguintes parâmetros – Tamanho da lesão; Reação intradérmica ao antígeno de *L. (V) braziliensis*; Carga parasitária – Pata e Linfonodo (Unidades arbitrárias e Parasito/Grama) e Marcadores sorológicos de toxicidade.

II HUMANO

1 – Estabelecer protocolo de cultivo e infecção em macrófagos humanos

2 – Atividade da LQB-118 sobre a célula hospedeira – Macrófagos – In vitro

- a) Analisar os efeitos da LQB-118 sobre macrófagos – Viabilidade celular;
- b) Avaliar a produção de radicais tóxicos – Óxido Nítrico (NO);

3 – Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania braziliensis* – In vitro

- a) Analisar a atividade sobre amastigotas intracelulares – Macrófagos tratados antes e após infecção;
- b) Avaliar a sobrevivência das amastigotas intracelulares;

4 – Avaliar a produção de citocinas por macrófagos humano

8 MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Aspectos éticos

Para a realização dos estudos de modulação e ação terapêutica, os modelos escolhidos foram macrófagos peritoneais de Hamster golden (*Mesocricetus auratus*) e oriundos do sangue periférico humano.

Os estudos realizados com o modelo hamster foram aprovados pela Comissão de ética para cuidado e uso de animais experimentais sob o Protocolo n° CEUA/027/2013- IBRAG- UERJ. E, para os estudos com células humanas, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (CEP: 499.945).

8.2 Obtenção e manutenção do parasito

A espécie de estudo neste trabalho foi a *Leishmania (Viannia) braziliensis* cepa cão Thor (MCAN/BR/98/R619), isolada pela Dr^a Maria de Fátima Madeira do IPEC e gentilmente cedida pela Dr^a Lea Cisne (Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, RJ).

Os parasitos foram reisolados sistematicamente a partir de lesões de hamsters infectados e as formas promastigotas foram mantidas em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) suplementada com 20% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), a 28°C com repiques semanais até a quarta passagem.

8.3 Pterocarpanoquinona LQB-118

A síntese da pterocarpanoquinona LQB-118 foi realizada pelo grupo do Prof^o Paulo Roberto Ribeiro Costa do Laboratório de Química Biorgânica (LQB) do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A LQB-118

foi solubilizada em DMSO (Sigma-Aldrich – D4540) para a preparação da solução estoque na concentração de 160mM, a partir da qual foram feitas diluições com meios RPMI (Sigma, Sant Louis, USA) para uso nos experimentos. A concentração final máxima de DMSO nas culturas de células não ultrapassou 0,02%.

8.4 Isolamento de macrófagos

8.4.1 Obtenção de monocamadas de macrófagos de *Mesocricetus auratus* (hamsters golden)

Os hamsters sem infecção foram eutanasiados em câmaras de CO₂ e os macrófagos foram obtidos através de lavagem da cavidade peritoneal destes animais utilizando 10mL de meio de cultura RPMI gelado. Após aspiração as células foram mantidas em gelo, contadas em câmara de Neubauer, a concentração ajustada para 2x10⁶/mL e distribuídas sobre lamínulas de vidro redondas dispostas em placas de 24 poços (500µL/poço) e incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5% por uma hora para aderência. Após este período as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37°C.

8.4.2 Isolamento de PBMC humano e diferenciação em Macrófagos

O sangue periférico de doadores saudáveis, com idade mínima de 18, foi coletado utilizando seringas de 10mL contendo anticoagulante (heparina). Foram excluídos indivíduos que tenham estado doentes apresentado febre, resfriado, crises alérgicas ou que tenham usado antibióticos e/ou anti-inflamatórios até quinze dias antes da coleta.

Os doadores foram previamente informados sobre os objetivos da pesquisa e receberam o formulário do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que foi assinado por todos os doadores e pesquisadores antes da coleta de sangue.

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) foram isoladas a partir do sangue de doadores saudáveis como descrito acima.

O sangue foi diluído em PBS na proporção de 1:1 e transferido para tubos cônicos (50mL) contendo Ficoll-Hypaque (Sigma), também na proporção de 2:1, onde foram centrifugados a 660g por 30 minutos, sem aceleração e freio, a 4°C.

A camada de PBMC obtida entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma foi removida e transferida para novos tubos cônicos, sendo lavada com 20mL de meio RPMI 1640. Depois de uma nova centrifugação a 399g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em 5ml de meio RPMI 1640 e o número de células foi quantificado em câmara de Neubauer.

PBMCs foram distribuídas em placa de cultura de 24 poços, contendo lamínulas redondas na concentração de 2×10^6 células/ml e incubados a 37°C com em atmosfera de CO₂ a 5% durante 72 horas, tempo este estimado para a diferenciação de monócitos em macrófagos e, em seguida, as células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS.

8.5 Efeito da LQB-118 sobre macrófagos

Para avaliar o efeito da LQB-118 as monocamadas de macrófagos já aderidos foram tratadas de duas formas:

a) Tratamento com LQB-118 pós-infecção – Consiste em macrófagos infectados e tratatodos por 48 horas após a infecção.

b) Pré-tratamento com a LQB-118 – Consiste no tratamento de macrófagos por 24 horas antes da infecção com *L. (V) braziliensis*.

8.5.1 Ensaio de viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade em macrófagos foi realizada utilizando o MTT (brometo de 3-(4,5 dimetil-2 tiazolil)-2,5-difenil 2H-tetrazólio) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO), de acordo com as instruções do fabricante.

Macrófagos peritoneais de hamster e as PBMCs foram distribuídas em placa de cultura de 96 poços, na concentração de 2×10^6 células/mL e após a aderência e diferenciação de monócitos em macrófagos, foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118 (0 a

200 μ M) durante 48 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após este período, foram adicionados 20 μ l de MTT (5mg/ml) e a placa foi incubada durante 3 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Posteriormente a placa foi submetida a centrifugação por 10 minutos a 1562g, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 150 μ L de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. Em seguida a absorbância foi medida a 570nm.

8.5.2 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A avaliação da produção de óxido nítrico (NO) foi realizada indiretamente pela dosagem de nitrito (NO₂⁻) nos sobrenadantes das culturas de macrófagos utilizando o método de Griess (Green *et al*, 1982). Em uma placa de 96 poços foram distribuídos 100 μ L de cada amostra a ser analisada e como controle foi utilizado uma curva com diferentes concentrações de nitrito de sódio (NaNO₂) diluído em RPMI. Foram acrescentados então 100 μ L do reagente de Griess (Solução A – 0,1g de N-(1 – naftil) etilene-diamine diidrochloride e Solução B – 2-aminobenzenesulfonamida), na proporção de 1:1 e as amostras foram incubadas por 15 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Após o tempo decorrido as amostras foram analisadas em leitor de microplacas em uma densidade óptica de 492 nm.

8.5.3 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

A cinética de produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi adaptada de Fonseca-Silva e colaboradores (Fonseca-Silva *et al*, 2011). As monocamadas de macrófagos (obtidas como descrito no item 8.4.1 e 8.4.2), aderidas em placas de 96 poços, foram infectadas ou não com promastigotas de *L. braziliensis*, na fase estacionária e tratadas com diferentes concentrações de LQB-118. Após o término do tratamento os poços foram lavados 2 vezes com PBS e a placa foi incubada por 30 minutos com H₂DCFDA (2',7'-diacetato de diclorodidihidrofluoresceína) (Invitrogen, Eugene, USA) que indica a produção de espécies reativas de oxigênio.

Após o tempo necessário, a placa foi levada ao espectrofluorímetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices, Silicon Valley, USA) com comprimento de onda de excitação de 507nm e onda de emissão de 530nm. O resultado foi expresso como unidade relativa de fluorescência. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

8.5.4 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial (Ψ_m)

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado utilizando a sonda fluorescente JC-1 (Sigma-Aldrich), como descrito por Ribeiro e colaboradores (Ribeiro *et al*, 2013).

Para determinar o efeito da LQB-118 sobre o potencial da membrana mitocondrial (Ψ_m), a monocamada de macrófagos na concentração de 2×10^6 células/mL, foram cultivadas com LQB-118 em diferentes concentrações (0 a 200 μ M) durante 48 horas em atmosfera de CO₂ a 5%. Após 48 h, as células foram incubadas durante 10 min com a sonda fluorescente JC-1 (100 μ g/mL/poço) (Sigma-Aldrich), os controles foram macrófagos incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro na presença ou não de 0,02% de DMSO e como controle negativo, os macrófagos foram incubados com 2mM de FCCP (carbonil cianeto p-trifluorometoxifenilidrazona, um protonóforo desacoplador do potencial de membrana mitocondrial). Após, a lavagem foi realizada utilizando a solução salina equilibrada de Hanks (HBSS) e a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Spectra Max M2 - Molecular Devices, Silicon Valley, USA) nos seguintes comprimentos de onda de emissão, 530 e 590 nm, utilizando 485 nm como o comprimento de onda de excitação. A relação entre a fluorescência vermelha e verde (ou seja 590/530 nm) determinou o $\Delta\Psi_m$ (Reers et al. 1995). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

8.5.5 Capacidade fagocítica

A fim de avaliarmos a capacidade fagocítica dos macrófagos, as monocamadas de macrófagos de hamsters foram dispostas em lâminas LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, USA) e incubadas com diferentes concentrações da LQB-118 diluídas em RPMI e suplementada com 10% de soro durante 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Controles foram incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro na presença ou não de 0,02% de DMSO ou incubados com LPS a 1mg/ml . Após o tempo de 24 horas, as monocamadas foram lavadas com PBS morno (37°C) e foram incubados com esferas de látex (17154-beads Polysciences,inc) revestidas com FIT-C na concentração de 1×10^7 /mL, foram adicionadas as monocamadas por 3 horas. As monocamadas foram lavadas três vezes com PBS e analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i).

Os resultados foram expressos como índice de fagocitose contando no mínimo cem macrófagos por lamínula, usando para isso a equação: % de macrófagos com beads x número de beads/número total de macrófagos.

Para calcular a atividade fagocítica (%) apenas os macrófagos com beads foram analisados.

8.5.6 Avaliação da produção de citocinas

A avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes foi realizada por citometria de fluxo pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) utilizando-se o kit *Human inflammation* (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12p70 – BD Biosciences Pharmigen, CA, EUA) que se baseia no uso de esferas de poliestireno marcadas com diferentes graus de fluorescência, recobertas com anticorpos específicos, que são detectados por citometria de fluxo, sendo os resultados expressos em pg/mL.

Os tubos para aquisição foram preparados com os sobrenadantes ou os padrões de citocinas do kit, que foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção conjugado com o ficoeritrina (PE) e as amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente e com ausência de luz. O mesmo procedimento foi realizado para a obtenção da curva-padrão.

Depois do período de incubação foi adicionado a cada tubo 500 µL da solução de lavagem e foram centrifugados a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o “pellet” foi ressuspensionado em 300 µL de solução de lavagem e as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo (marca FACS Canto II) e a análise foi realizada utilizando o programa FCAP Array software específico para este kit. Este ensaio foi realizado no Laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia, FCM-UERJ.

8.6 Avaliação sobre formas amastigotas intracelulares

8.6.1 Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas em macrófagos tratados após infecção

As monocamadas de macrófagos (obtidas como descrito no item 8.4.1 e 8.4.2) foram infectadas com promastigotas de *L. (V) braziliensis*, na fase estacionária, na proporção de 5 parasitos/macrófagos durante quatro horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após quatro horas de interação os parasitos que não foram internalizados, foram removidos com duas lavagens com PBS morno (37°C). A monocamada de macrófagos infectados foi incubada com diferentes concentrações da LQB-118, diluídas em RPMI e suplementada com 10% de soro fetal bovino por 48 horas, e a placa foi mantida a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Os controles foram macrófagos infectados cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro com adição ou não de 0,02% de DMSO (Sigma-Aldrich).

As monocamadas de macrófagos infectados foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C, fixadas e submetida à coloração com Panótico (Laborclin). O número de amastigotas intracelulares por macrófago foi contado em microscópio (cem macrófagos por lamínula) e expresso como índice de infecção (% de macrófagos infectados x número de amastigotas/número total de macrófagos).

8.6.2 Atividade da LQB-118 sobre formas amastigotas em macrófagos tratados antes da infecção

As monocamadas de macrófagos (obtidas como descrito no item 7.3.1 e 7.3.3) foram tratadas com concentrações da LQB-118, por 24 horas antes da infecção. Após o tempo de 24

horas, as monocamadas foram lavadas com PBS morno (37°C) e infectadas com promastigotas de *L. (V) braziliensis*, na fase estacionária, na proporção de 5 parasitos/macrófagos durante quatro horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após quatro horas de interação os parasitos que não foram internalizados, foram removidos com duas lavagens com PBS morno (37°C) e a monocamada foi mantida a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%, por 48 horas com meio RPMI suplementado com 10% de soro. Os controles foram macrófagos tratados apenas com meio RPMI suplementado com 10% de soro com adição ou não de 0,02% de DMSO (Sigma-Aldrich), antes da infecção.

Após 48 horas os sobrenadantes foram coletados e congelados a -20°C, para posterior dosagem de nitrito e citocinas. As monocamadas de macrófagos foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C, fixadas e submetida à coloração com Panótico (Laborclin). O número de amastigotas intracelulares por macrófago foi contado em microscópio (cem macrófagos por lamínula).

8.6.3 Detecção *in situ* da fragmentação de DNA

A detecção da fragmentação do DNA *in situ* foi realizada em formas amastigotas intracelulares utilizando a marcação pelo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling*) de acordo com as instruções do fabricante (*In situ cell death detection Kit - Roche*).

Para avaliação em amastigotas, monocamadas de macrófagos de *Mesocricetus auratus* (hamsters golden) foram infectadas (5 parasitos/macrófagos) dispostas em lâminas LAB-TEK onde foram incubadas com diferentes concentrações da LQB-118 diluídas em RPMI e suplementada com 10% de soro durante 48 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Controles foram incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro na presença ou não de 0,02% de DMSO.

Após as 48 horas de incubação, as lamínas foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos, lavadas uma vez com PBS e incubadas por mais 10 minutos com uma solução bloqueadora (3% de peróxido de hidrogênio e metanol). Após lavagem com PBS, as monocamadas foram permeabilizadas por dois minutos, no gelo, com solução contendo 0,1% de Triton x-100, 0,1% de Citrato de sódio e foram marcadas com a solução de TUNEL, por 1 hora a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%, ambiente úmido e escuro. As monocamadas foram

lavadas três vezes com PBS e analisadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i).

8.6.4 Sobrevivência de amastigotas intracelulares

Para avaliarmos a sobrevivência das amastigotas intracelulares, após a interação com *L. (V) braziliensis* e incubação por 48 horas com as concentrações de LQB-118, a monocamada de macrófagos foi lavada com PBS morno e reincubada com meio Schneider's suplementado com 10% de soro fetal bovino por mais 48 horas a 27°C. Após a lise dos macrófagos, as formas promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer.

8.7 **Ação terapêutica da LQB-118 em modelo experimental de infecção com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.**

Os animais foram separados de 5 a 6/grupo e infectados na pata traseira com promastigotas de *L. (V) braziliensis* na fase estacionária na concentração de 10^7 .

O tratamento foi realizado de três formas diferentes, como mostrado na **FIGURA 10**:

A) Tratamento após uma semana de infecção

Após o sétimo dia de infecção cada grupo foi tratado durante oito semanas com LQB-118 (solubilizada em DMSO) e administrada cinco vezes por semana por via oral (4,3 mg/kg/dia), utilizando como veículo Oraplus. O grupo de animais controle foi deixado sem tratamento. O tamanho da lesão foi medido semanalmente com um paquímetro (Mitutoyo, Brasil).

B) Tratamento após lesão estabelecida

O tratamento com LQB-118 foi realizado, após a quarta semana de infecção, onde podíamos observar uma lesão característica de *L. (V) braziliensis*.

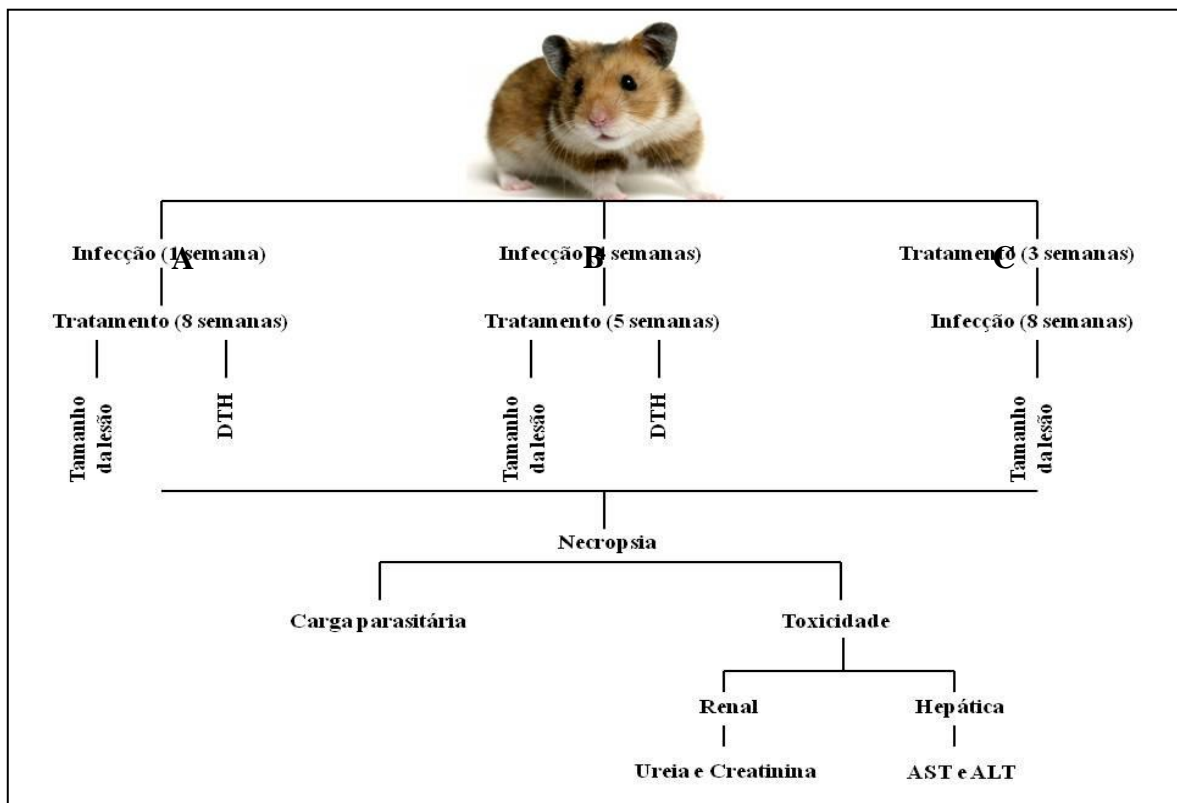
Cada grupo foi tratado durante cinco semanas com LQB-118 (solubilizada em DMSO) e administrada cinco vezes por semana por via oral (4,3 mg/kg/dia), utilizando como veículo Oraplus. O grupo controle foram animais não tratados. O tamanho da lesão foi medido semanalmente com um paquímetro (Mitutoyo, Brasil).

C) Tratamento antes da infecção

Os animais foram tratados com LQB-118 durante três semanas, por via oral (4,3mg/kg/dia), antes da infecção. Após a terceira semana de tratamento, os animais foram infectados e o tamanho da lesão foi medida semanalmente por oito semanas.

Os grupos controles foram animais não tratados. O tamanho da lesão foi medido semanalmente com um paquímetro (Mitutoyo, Brasil), a partir da infecção.

Figura 10 – Desenho experimental dos esquemas terapêuticos *in vivo*



Legenda: Delineamento experimental dos esquemas terapêuticos quanto ao momento do tratamento e análise da eficácia da molécula LQB-118 no controle da infecção por *L. (V) braziliensis*.

Fonte: A autora, 2016.

8.7.1 Avaliação da resposta de hipersensibilidade tardia (DTH)

Após as semanas de infecção e/ou tratamento, a reação intradérmica ao antígeno de *L. (V) braziliensis* foi avaliada.

Na pata traseira esquerda foi injetada 20µL de antígeno total (obtido por congelamento e descongelamento) correspondente a 2×10^6 promastigotas.

Vinte e quatro horas mais tarde, o inchaço da pata foi medida com paquímetro, e a reação intradérmica foi expressa como a diferença entre a espessura de injeção antes e depois.

8.7.2 Avaliação da carga parasitária

Os hamsters foram eutanasiados no final dos experimentos utilizando câmara de dióxido de carbono (CO₂), e suas patas infectadas foram assepticamente excisadas, pesadas e masseradas em meio Schneider's (Sigma) contendo 20% de soro fetal bovino. A suspensão de células foi diluída em série e a carga parasitária foi estimada utilizando o ensaio de diluição limitante (Taswell 1984; Taswell 1981) após 7 dias. Resumidamente, 20µL da suspensão de células foi diluído em 180µL de meio de Schneider's e distribuído na microplaca de 96 poços em quadruplicata. A partir do primeiro poço, foram feitas diluições seriadas. As placas foram então incubadas a 27 °C e avaliados diariamente até observarmos a presença de parasitos. Os resultados foram obtidos a partir da média dos últimos quatro poços, onde observamos parasitos viáveis dividimos pelo peso dos fragmentos e, em seguida, o resultado foi expresso como o número de parasitos por grama de tecido.

8.7.3 Toxicologia renal e hepática

A coleta de sangue para análise bioquímica foi realizada de acordo com o Manual de Utilização de Animais/ Fiocruz .

As amostras de sangue dos hamster foram coletadas e incubadas em estufa 37°C para coagular e após 30 minutos foi centrifugada a 300g por 10 minutos para obtenção de soro. O

equipamento utilizado para os ensaios foi o Vitros 250 (Ortho Clinical - Johnson & Johnson), que se fundamenta na metodologia da bioquímica seca. Os seguintes parâmetros séricos foram analisados: alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), para verificar a função hepática. Além dos parâmetros creatinina e uréia para verificar a função renal.

As análises foram realizadas através da Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz.

8.8 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados pelo teste one way ANOVA de entrada única com pós-teste de Tukey. A determinação da IC50 foi avaliada através de uma regressão linear logarítmica utilizando o programa “GraphPad Prism 5”. Valores de p iguais ou menores a 0,05 foram considerados significativos.

9 RESULTADOS

9.1 Atividade da LQB-118 sobre macrófagos (hamsters/humanos)

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que a LQB-118 é capaz de inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. (V) braziliensis* e de diminuir o número de amastigotas intracelulares de macrófagos de camundongos infectados com *L. (V) braziliensis* e tratados por 48 horas com LQB-118. Macrófagos infectados e tratados com a LQB-118 por 24 horas apresentaram um aumento na secreção de citocinas pró-inflamatórias como, IL-12 e TNF- α , além da produção de óxido nítrico. Também observamos que a LQB-118 foi capaz de induzir a externalização de fosfatidilserina em formas promastigotas e a fragmentação do DNA nas formas amastigotas, demonstrando a ação direta sobre o parasito induzindo-o à morte por apoptose.

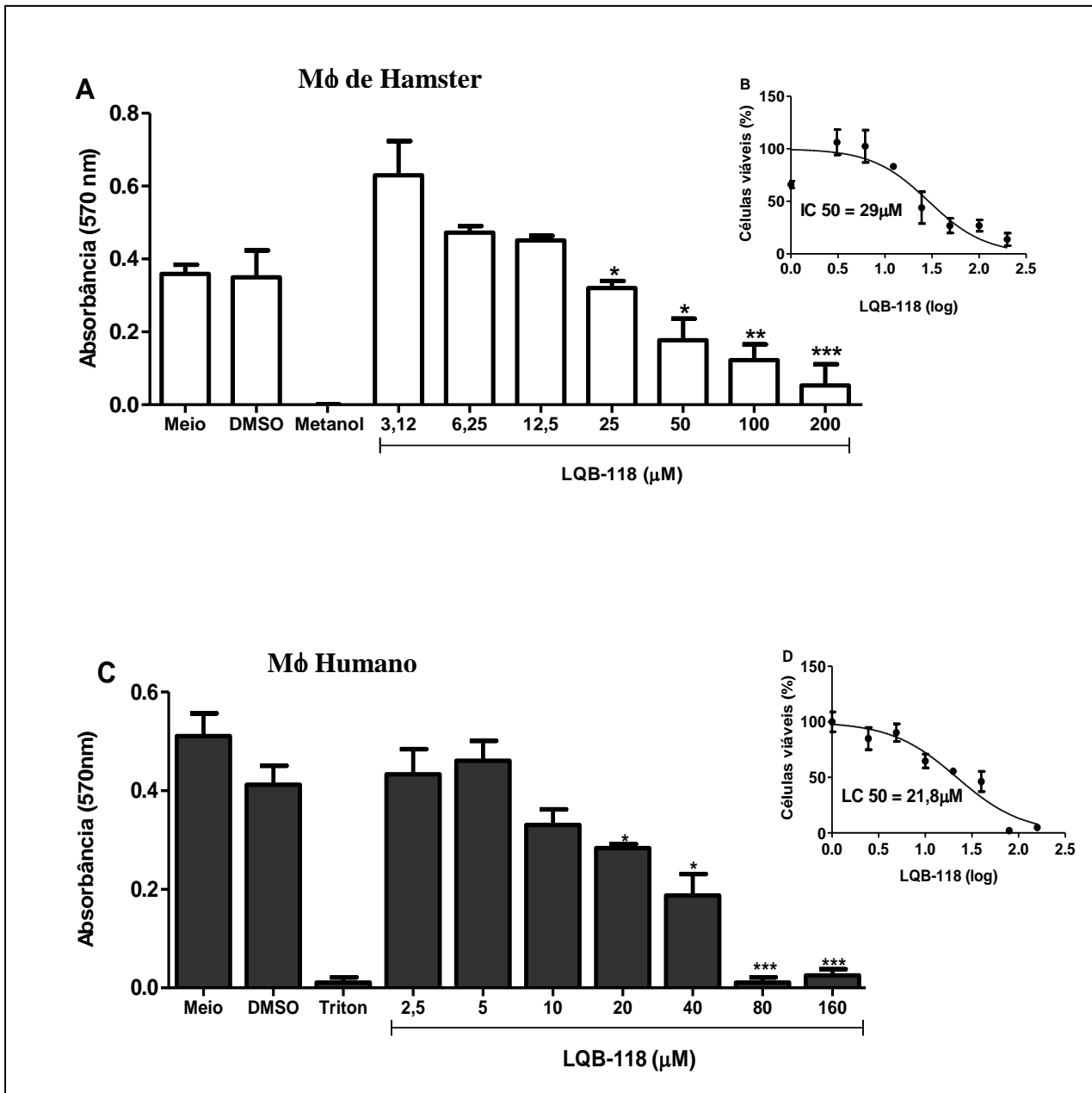
Com o intuito de ampliar os estudos acerca do mecanismo de ação da LQB-118, avaliamos a sua capacidade de modular os macrófagos. Como estratégia, usamos macrófagos de hamsters e humanos.

9.1.1 Avaliação da viabilidade celular

A fim de determinarmos a concentração da LQB-118 que poderia ser tóxica para a célula hospedeira, monocamadas de macrófagos obtidos de hamsters ou de humanos foram tratadas com diferentes concentrações da molécula por 48 horas. Após este período, a viabilidade das células foi analisada pela capacidade de redução do MTT.

A análise indicou que a partir da concentração de 25 μ M de LQB-118 os macrófagos de hamster apresentam perda da viabilidade, sendo mais acentuada na concentração de 100 μ M (redução de 55%) (**Figura 11A**). A concentração de 29 μ M foi estimada como a LC₅₀, em macrófagos de hamster. Em macrófagos oriundos de células mononucleares de sangue periférico humano a perda da viabilidade começa a partir da concentração de 20 μ M, sendo mais acentuada a partir da concentração de 80 μ M e a LC₅₀ foi estimada em 21,8 μ M (**Figura 11B e D**).

Figura 11 – Viabilidade dos macrófagos tratados com LQB-118



Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamster ou oriundas de sangue periférico humano foram incubadas com diferentes concentrações de LQB-118. Os macrófagos incubados com DMSO à 0,02% suplementado com 10% de soro fetal bovino durante 48h a 37°C/5%CO₂ foram considerados como controles. Após esse período, o MTT foi adicionado e as culturas permaneceram por mais 3 horas em estufa a 37°C/5%CO₂. Após foi acrescido 200 μL de DMSO 100% para solubilizar os cristais de formazam. A absorbância foi medida a 570nm. (A e B) Viabilidade celular e determinação da LC₅₀ (por regressão não linear) em macrófagos de hamsters (média ± SD, n=3). (C e D) Viabilidade celular e determinação da LC₅₀ (por regressão não linear) de macrófagos oriundas de sangue periférico humano (média ± SD, n=5). *p<0,01; **p<0,001 e ***p<0,0001.

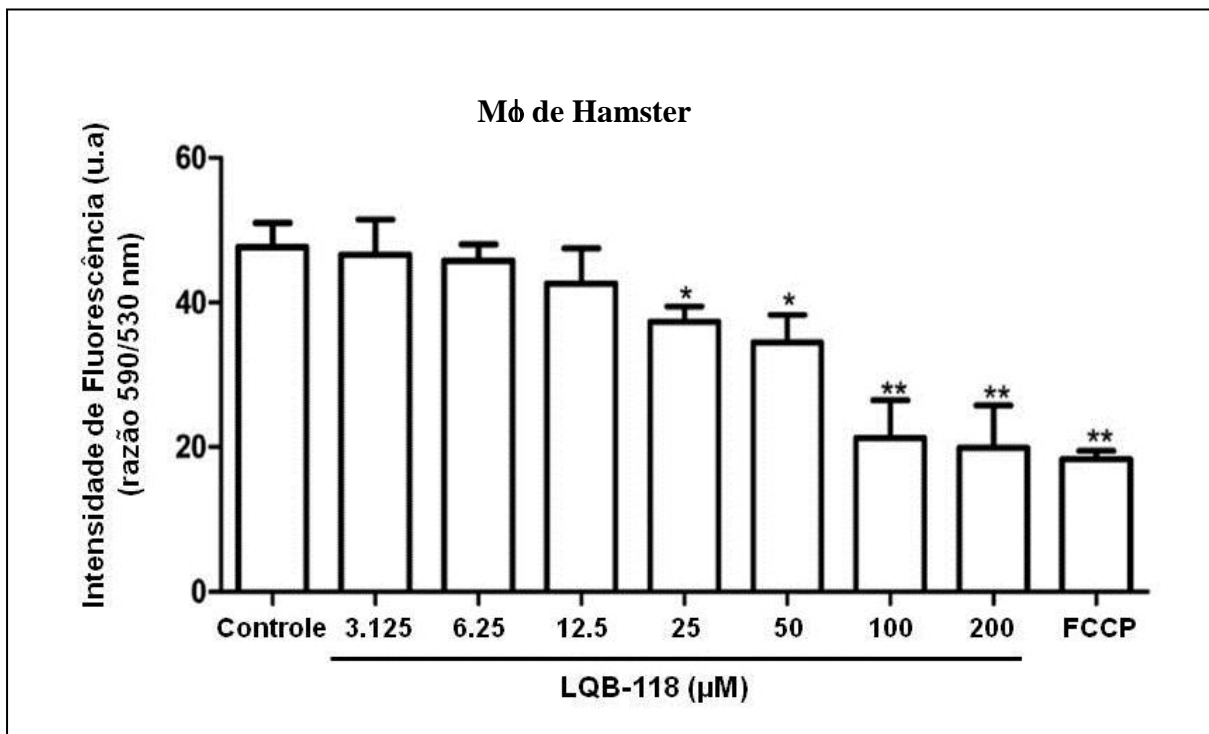
Fonte: A autora, 2016.

9.1.2 Efeito sobre o potencial da membrana mitocondrial de macrófago

Para avaliar mais precisamente a toxicidade da LQB-118 sobre as culturas, investigamos a função mitocondrial de macrófagos de hamster após tratamento com a LQB-118.

A perda do potencial de membrana mitocondrial (λ) foi observada apenas a partir da concentração de 25 μ M, sendo observada uma despolarização expressiva a partir de 100 μ M, após 48 h de tratamento (**Figura 12**). Este dado corrobora com o resultado obtido nos testes de viabilidade celular, usando MTT, como visto na figura 11.

Figura 12 – Efeito da LQB-118 sobre o potencial de membrana mitocondrial de macrófagos



Legenda: Macrófagos peritoneais de hamster (2×10^6 células/ml) foram incubados com LQB-118 por 48 horas a 37°C/5% de CO₂. Como controles, foram utilizadas culturas de macrófagos incubadas com meio suplementados com 10% de soro na presença ou não de FCCP (um protonóforo desacoplador do potencial de membrana mitocondrial). As células foram incubadas durante 10 min com a sonda fluorescente JC-1 e analisadas fluorometricamente. Os resultados são apresentados como média \pm SD, n=3. *p< 0,05; **p< 0,01.

Fonte: A autora, 2016.

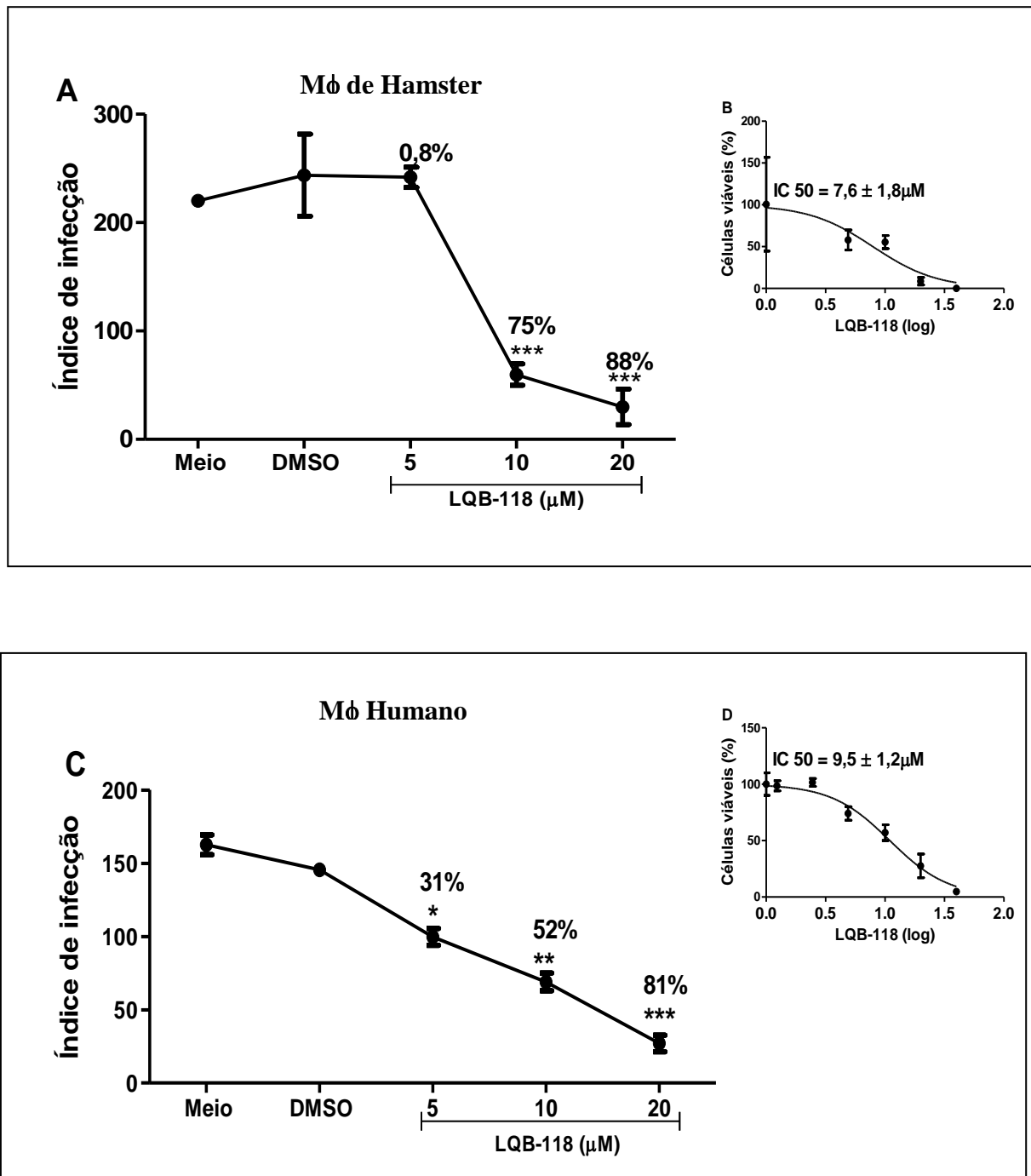
9.1.3 Atividade da LQB-118 sobre ação anti-amastigotas intracelulares

9.1.3.1 Atividade anti-amastigota – Macrófagos tratados após infecção

Com o propósito de avaliarmos a ação da LQB-118 sobre a capacidade do macrófago de controlar a infecção por *L. (V) braziliensis*, incubamos as monocamadas infectadas (5 parasitos/macrófagos) com diferentes concentrações da LQB-118 por 48 horas.

A LQB-118 promoveu uma diminuição no índice de infecção. Em macrófagos de hamster infectados as concentrações de 5 μ M, 10 μ M e 20 μ M inibiram 0,8%, 75% e 88%, respectivamente, sendo a IC₅₀ calculada em 7,6 \pm 1,8 μ M (**Figura 13A e B**). Em macrófagos humano (**Figura 13C e D**), observamos também redução no índice de infecção de 31%, 52% e 81,5% nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M respectivamente, sendo a IC₅₀ calculada em 9,5 \pm 1,2 μ M. O Glucantime foi usado como um controle positivo em macrófagos humano a 1mg/ml e inibiu 67% do índice de infecção (dados não mostrados).

Figura 13 – Atividade da LQB-118 sobre amastigotas intracelulares



Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamster e oriundas de sangue periférico humano foram infectadas com *L. (V) braziliensis* na proporção de 5 parasitos/macrófago e submetidas ao tratamento com as concentrações indicadas de LQB-118 durante 48h a 37°C/5% CO₂. Os controles foram tratados com meio suplementado com 10% de soro com ou sem DMSO a 0,02%. Após esse período as monocamadas de macrófagos infectados foram coradas com Panótico e o resultado expresso por índice de infecção (mínimo de 100 macrófagos/lamínula). (A e B) Índice de infecção e determinação da IC₅₀ (por regressão não linear) de hamster (média ± SD, n=3). (C e D) Índice de infecção e determinação da IC₅₀ (por regressão não linear) macrófago humano (média ± SD, n=5). *p<0,001; **p<0,004; ***p<0,0006 e ****p<0,0001.

Fonte: A autora, 2016.

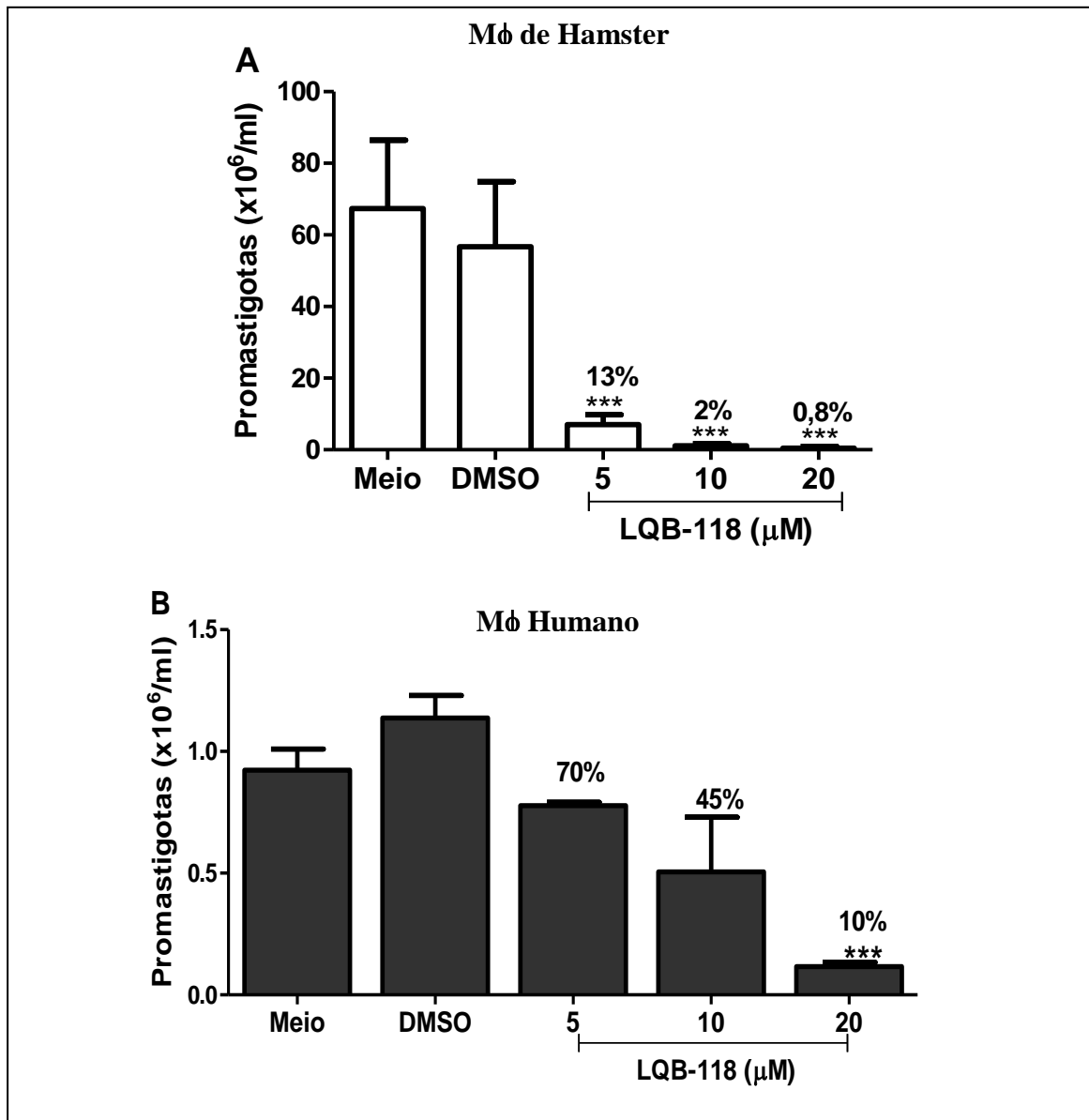
9.1.3.2 Sobrevivência de amastigotas intracelulares

Após avaliarmos a ação da LQB-118 nas formas intracelulares da *L. (V) braziliensis*, investigamos a sobrevivência dessas amastigotas remanescentes, pela sua capacidade de diferenciar em promastigotas.

A monocamada de macrófagos infectada e tratada por 48 horas com a LQB-118, foi lavada com PBS e reincubada com meio Schneider's suplementada com 10% de SFB por mais 48 horas a 27°C, para promover a diferenciação das amastigotas viáveis em promastigotas.

A cultura foi observada diariamente e após 48 horas, os macrófagos romperam liberando as formas promastigotas que foram contadas. Em macrófagos de hamster o percentual de promastigotas foi de 13%, 2%, 0,8%, nas culturas que foram tratadas com LQB-118 nas concentrações de 5, 10 e 20µM, respectivamente, quando comparadas ao controle (**Figura 14A**). Já em macrófagos humanos esse percentual foi de 70%, 45% e 10%, nas concentrações de 5µM, 10µM e 20µM, respectivamente, quando comparado ao controle (**Figura 14B**).

Figura 14 – Sobrevivência de amastigotas intracelulares



Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamster ou de sangue periférico humano infectadas com *L. (V) braziliensis* na proporção de 5 parasitos/macrófago e incubados com as concentrações de LQB-118 indicadas. Culturas controles foram macrófagos infectados incubados ou não com DMSO a 0,02% suplementado com 10% de soro fetal bovino durante 48h a 37°C/5%CO₂. Após esse período a monocamada de macrófagos infectados foi lavada com PBS morno e incubada com meio Scheneider's durante 48 horas em estufa de 27°C. As promastigotas foram contadas em câmara de Neubauer. (A) Macrófagos de hamster (média ± SD, n=3). (B) Macrófagos humanos (média ± SD, n=5). **p<0,001. ***p<0,0001.

Fonte: A autora, 2016.

9.1.3.3 Atividade anti-amastigota – Macrófagos tratados antes da infecção

Com o objetivo de avaliarmos se o tratamento prévio de macrófagos com a LQB-118, poderia modular a sua atividade anti-amastigota, incubamos as monocamadas de macrófagos de hamster ou de humano antes da infecção com *L. (V) braziliensis* com a LQB-118 em diferentes concentrações.

O índice de infecção dos macrófagos de hamster infectados e pré-tratados com a LQB-118, foi reduzido em 62%, 89% e 95%, nas concentrações de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente (**Figura 15A**), enquanto nos macrófagos humanos foi de 61%, 71% e 79% para as concentrações de 5, 10 e 20 μ M, respectivamente (**Figura 15B**).

Observamos que o pré-tratamento dos macrófagos com LQB-118 aumenta consideravelmente a inibição da multiplicação das amastigotas a partir da menor concentração (5 μ M), da LQB-118 (**TABELA 5**).

Figura 15 – Tratamento de macrófagos com LQB-118 antes da infecção

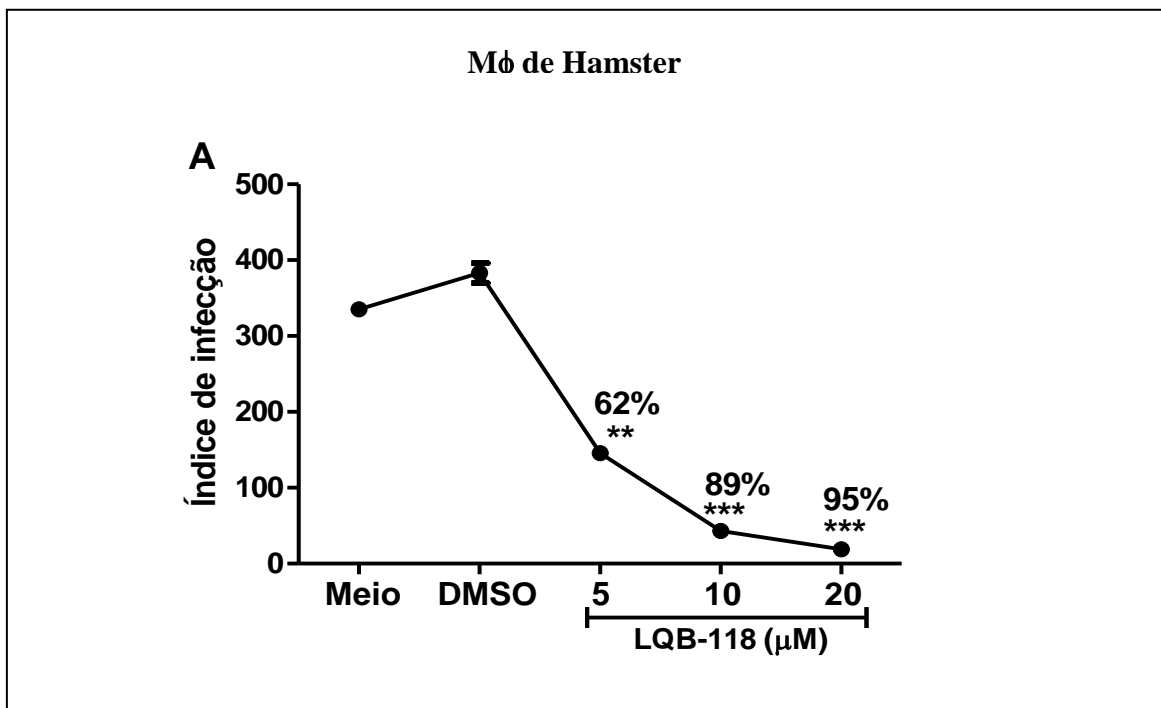


Figura 15 – Tratamento de macrófagos com LQB-118 antes da infecção

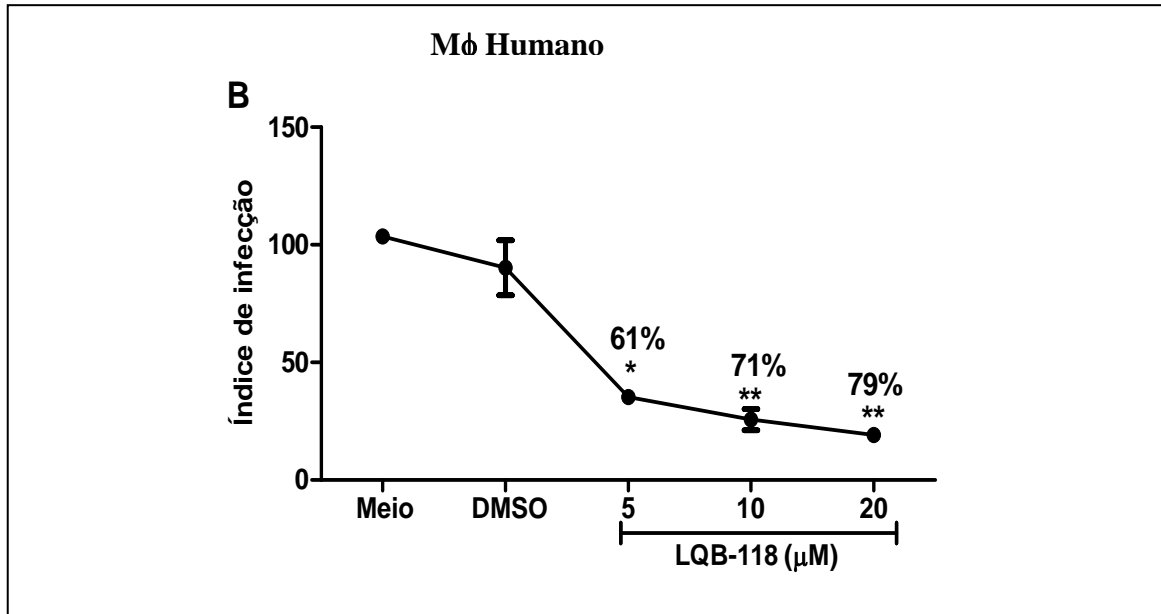
**C**

Tabela 5 – Comparação do tratamento antes e depois da infecção na inibição do índice de infecção

LQB-118 (μM)	5		10		20	
	Hamster	Humano	Hamster	Humano	Hamster	Humano
Tratado após infecção	0,8%	31%	75%	52%	88%	81%
Tratado antes da infecção	62%	61%	89%	71%	95%	79%

Legenda: Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamster e oriundos de sangue periférico humano foram tratados com LQB-118 por 24 horas antes da infecção com *L. (V) braziliensis* (5 parasitos/macrófago). Após a infecção as células foram lavadas, infectadas e incubadas com meio de cultura RPMI suplementado com 10% de SFB por 48h a 37°C/5%CO₂. Após esse período a monocamada de macrófagos infectados foi corada com Panótico e o número de amastigotas intracelulares contados por microscopia, sendo o resultado expresso por índice de infecção - mínimo de 100 macrófagos/lamínula. (A) Macrófagos peritoneais de hamsters (média ± SD, n=3). **p<0,0008 e ***p<0,0001. (B) Macrófagos humanos (média ± SD, n=5). *p<0,01; **p<0,001 e ***p<0,0003. (C) Tabela comparativa da porcentagem de inibição do crescimento de amastigotas.

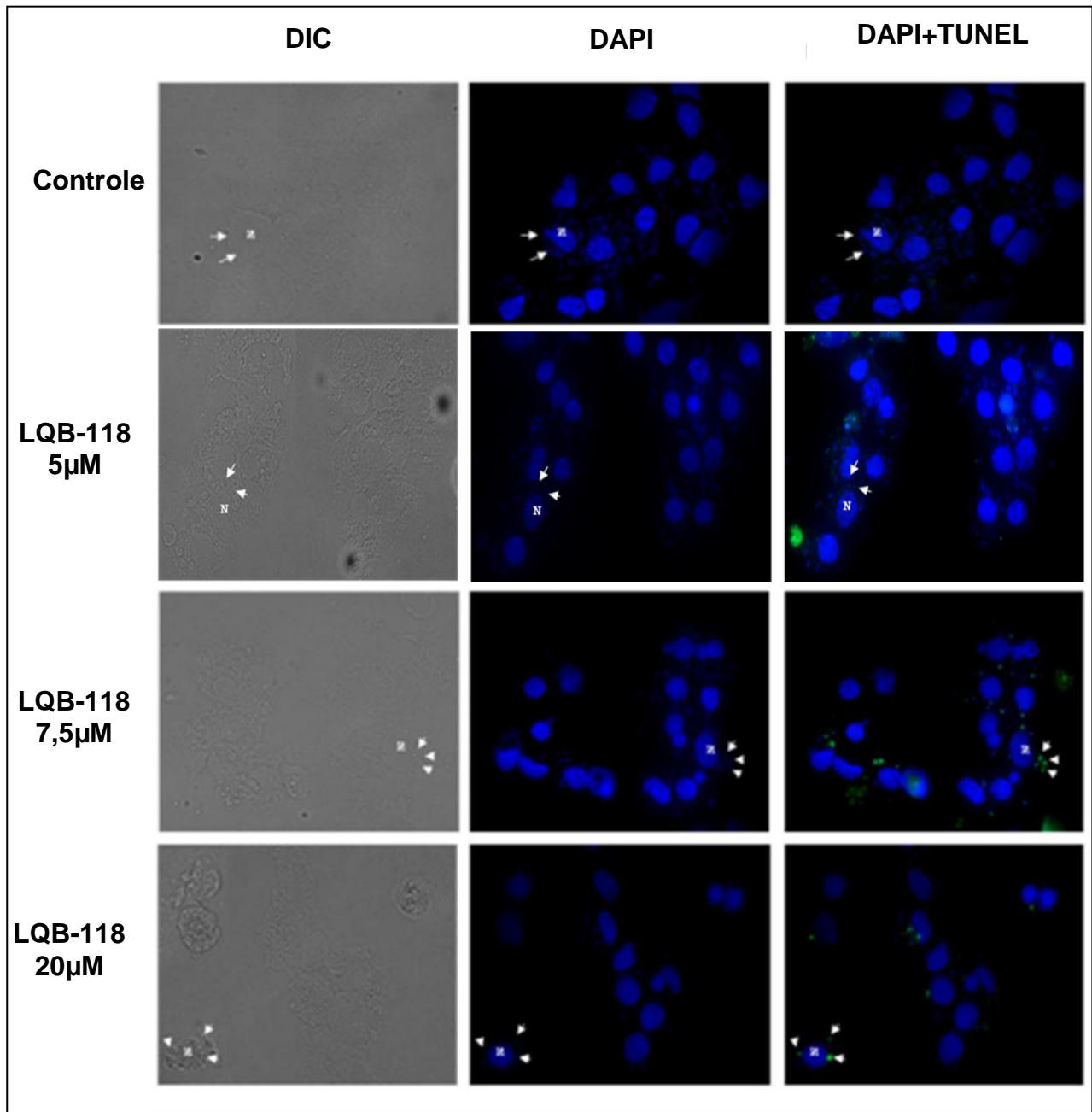
Fonte: A autora, 2016.

9.1.3.4 Detecção da fragmentação do DNA *in situ* de amastigota

Em experimentos anteriores observamos que a LQB-118 era capaz de induzir a fragmentação de DNA e exposição de fosfatidilserina nas formas promastigotas de *L. (V) braziliensis*, sinais estes de morte celular por apoptose (COSTA, 2011). Sendo assim, investigamos se isso ocorreria em amastigotas intracelulares. Para tal, incubamos a monocamada de macrófagos de hamsters infectadas com LQB-118 por 48h, realizamos a técnica denominada “TUNEL” e visualizamos por de microscopia de fluorescência, a fim de detectarmos a fragmentação do DNA *in situ*.

Na **Figura 16** é possível visualizar que apenas as amastigotas foram fluorescentemente marcadas pela técnica de TUNEL, estando o DNA dos macrófagos intactos corados em azul (DAPI). Também é possível observar que mesmo na menor concentração de LQB-118 (5 μ M) e com a concentração correspondente a IC₅₀ (7,5 μ M), ocorreu a fragmentação do DNA.

Figura 16 - Efeito da LQB-118 na indução da fragmentação de DNA do parasito



Legenda: Monocamadas de macrófagos de hamsters infectadas foram tratadas com as concentrações indicadas de LQB-118 e controles foram incubadas com ou sem DMSO a 0,02%. Após 48 horas as monocamadas foram marcadas com TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labelling*) de acordo com as instruções do fabricante (*In situ cell death detection Kit - Roche*) e DAPI. A cor verde nas imagens indica células TUNEL positivas e a cor azul indica células DAPI positiva. Fotos representativas de triplicadas de três experimentos independentes. As setas indicam amastigotas marcadas com TUNEL. N – Núcleo do macrófago. DIC – Campo claro.

Fonte: A autora, 2016.

9.1.4 Análise da produção de radicais tóxicos

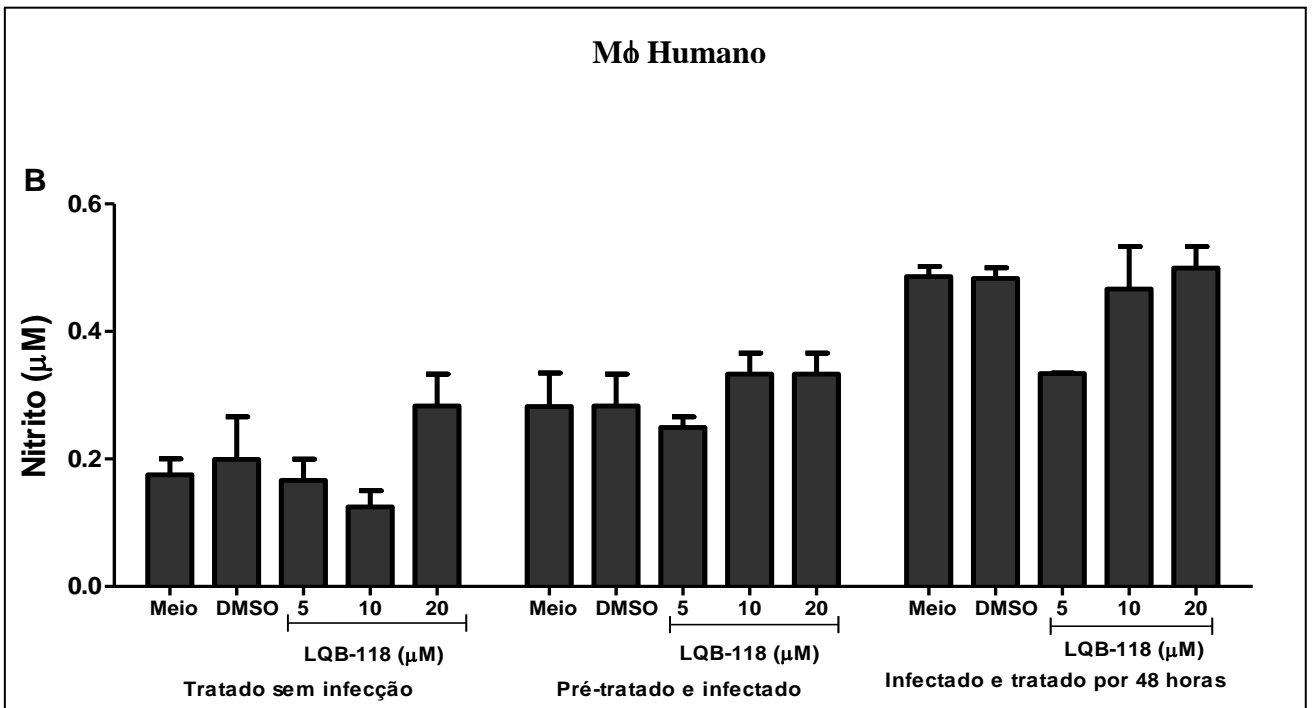
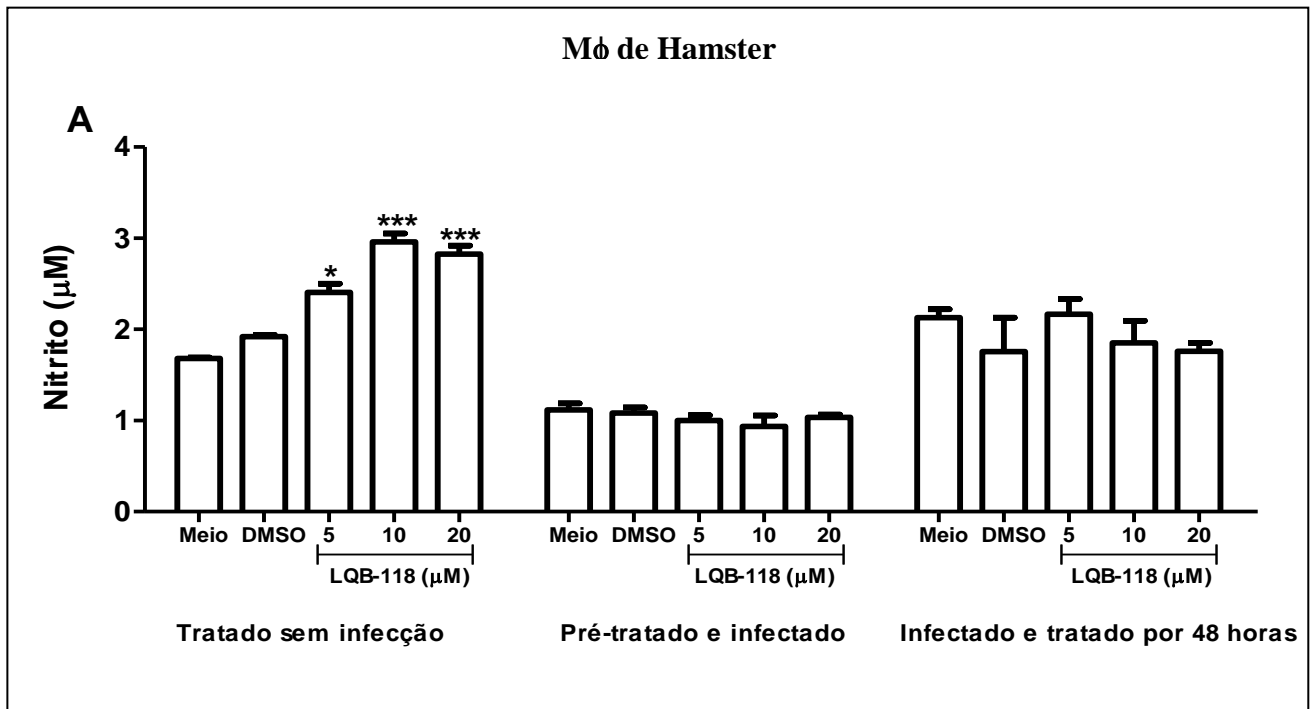
9.1.4.1 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

Para avaliar se a LQB-118 era capaz de modular a produção de NO por macrófagos três sistemas foram testados: macrófagos tratados e sem infecção; macrófagos tratados (por 24 horas – pré-tratamento) e infectados; e macrófagos infectados e tratados por 48 horas.

Em macrófagos de hamsters observamos que houve aumento dose-dependente na produção de NO nos sobrenadantes de culturas de macrófagos tratados por 24 horas sem infecção. Já nos outros dois sistemas não observamos alteração quanto a produção de NO em relação ao controle (**Figura 17A**).

Em macrófagos humanos observamos que a produção se manteve em níveis semelhantes ao controle nos três sistemas avaliados (**Figura 17B**).

Figura 17 – Efeito da LQB-118 sobre a produção de Óxido Nítrico



Legenda: Macrófagos peritoneais de hamsters e oriundos do sangue periférico humano foram tratados por 24 horas com a LQB-118 antes da infecção e tratados por 48 horas após a infecção e os sobrenadantes foram coletados e avaliados quanto à produção de NO. A dosagem foi realizada pelo método de Griess que detecta a presença de NO₂⁻ e a leitura realizada por espectrofotometria a 570nm. (A) Macrófagos peritoneais de hamsters (média ± SD, n=3). *p<0,05. ***p<0,0001. (B) Macrófagos humanos (média ± SD, n=5).

Fonte: A autora, 2016.

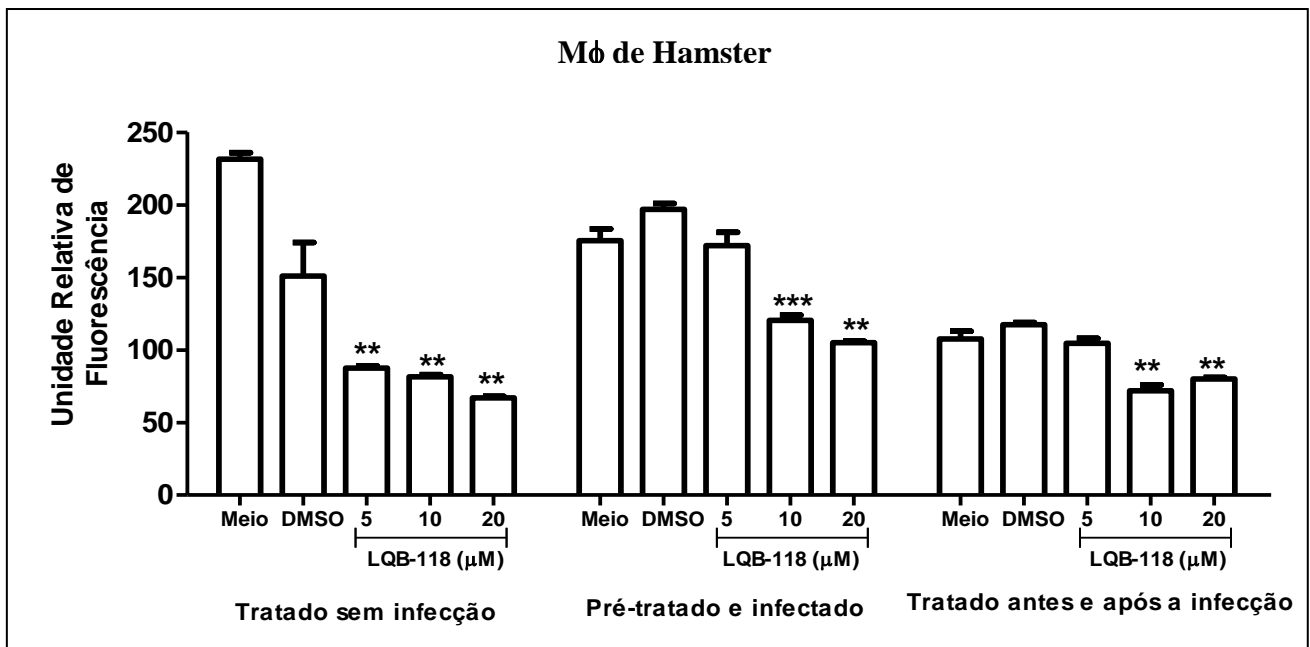
9.1.4.2 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para avaliar se a LQB-118 induziria a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelos macrófagos, foi utilizado a sonda fluorescente H₂DCFDA. Esta sonda detecta, principalmente, os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que após o contato com a substância é desacetilado, tornando-se fluorescente. Sendo assim, o aumento da fluorescência indica aumento da geração de ROS.

Neste experimento três sistemas foram testados: macrófagos tratados e sem infecção; macrófagos tratados (por 24 horas – pré-tratamento) e infectados; e macrófagos tratados antes e depois da infecção.

Os resultados demonstram que nos três sistemas (macrófagos tratado sem infecção, macrófagos tratado antes da infecção e macrófagos tratado antes e depois da infecção) houve redução na produção de espécies reativas de oxigênio quando comparado com o controle (**Figura 18**).

Figura 18 – Efeito da LQB-118 na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em macrófagos



Legenda: Macrófagos peritoneais de hamster golden tratados ou não com LQB-118 nas concentrações indicadas antes ou após a infecção por *Leishmania braziliensis*. A dosagem de EROs foi realizada utilizando a sonda fluorescente H₂DCFDA e a leitura realizada em fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 507nm e emissão de 530nm. O resultado foi expresso como Unidade Relativa de Fluorescência. (Média ± SD, n=3). *p<0,05. **p<0,001. ***P<0,0007.

Fonte: A autora, 2016.

9.1.5 Análise da capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com LQB-118

Macrófagos ativados apresentam uma atividade fagocítica aumentada. Sendo assim, com o objetivo de avaliar a capacidade fagocítica, os macrófagos foram tratados com LQB-118 e incubados com *Beads* fluorescentes.

Observamos que os macrófagos tratados com LQB-118 aumentaram o índice de fagocitose (**Figura 19A**) e tiveram a sua atividade fagocítica aumentada nas concentrações de 5 e 10 μ M em 86,5% e 139,5%, respectivamente sugerindo que estas concentrações podem estar ativando os macrófagos (**Figura 19B**).

Figura 19 – Atividade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-118

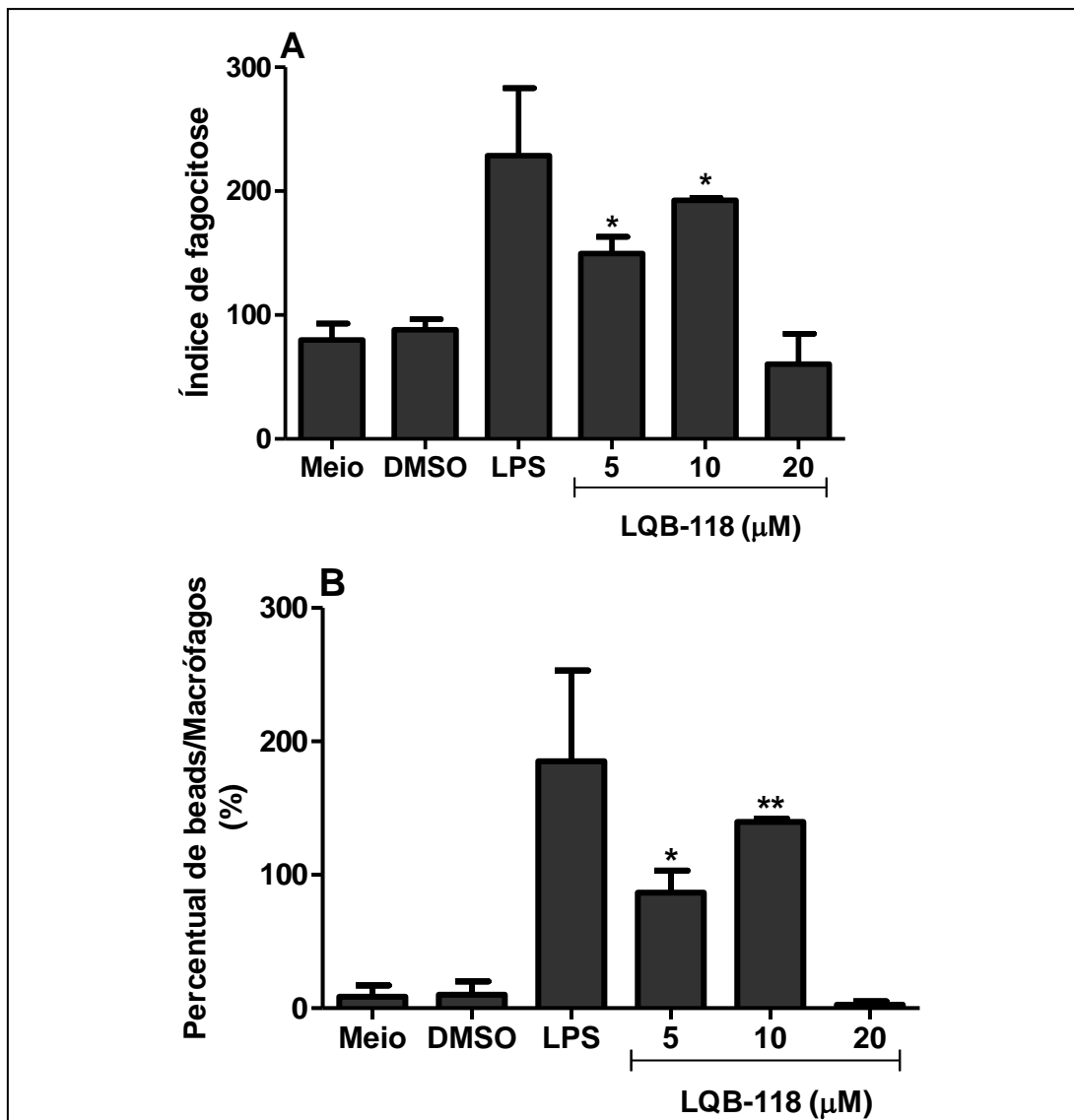
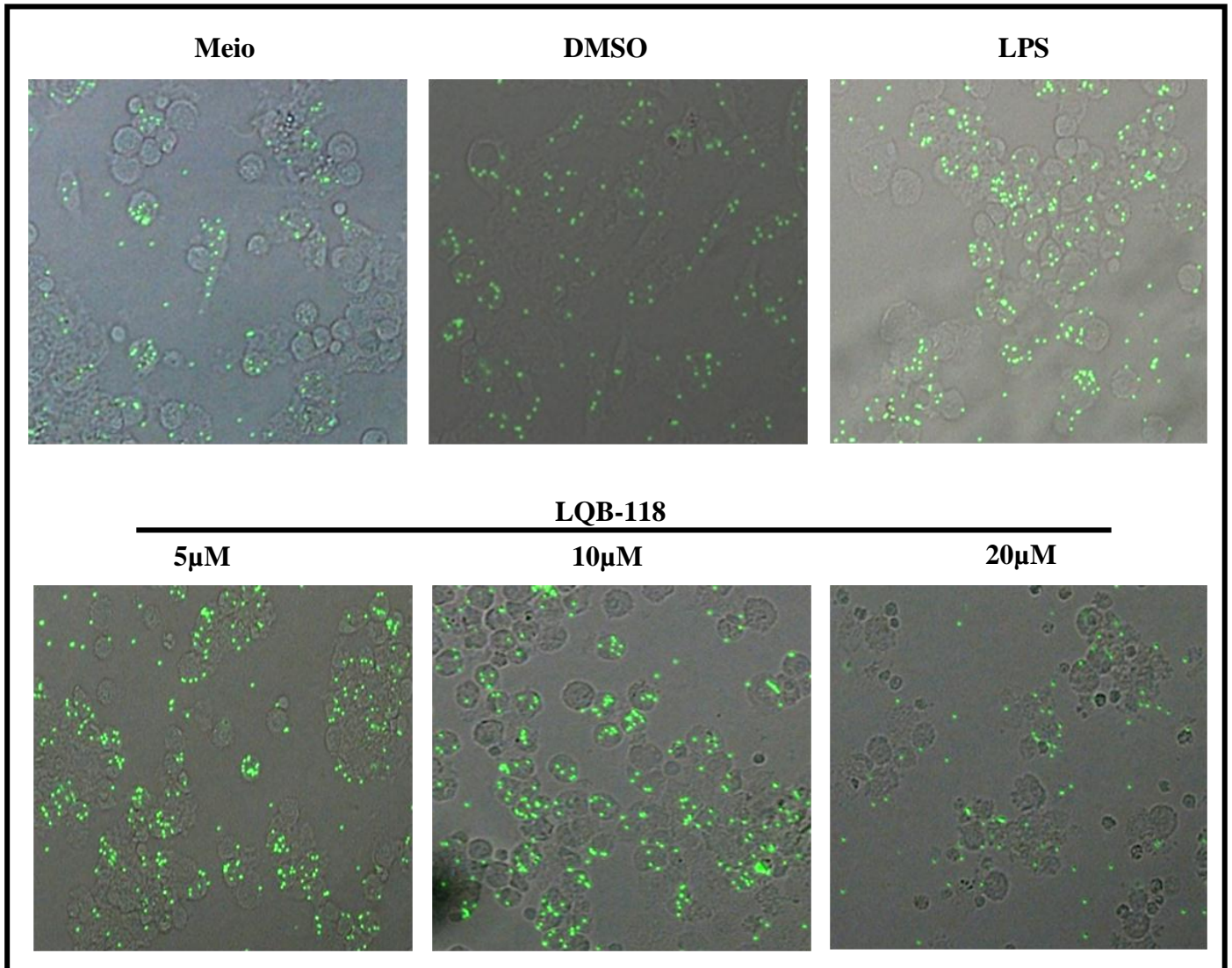


Figura 19 – Atividade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-118

C



Legenda: As monocamadas de macrófagos de hamsters foram dispostas em lâminas LabTec e incubadas com diferentes concentrações da LQB-118 diluídas em RPMI e suplementada com 10% de soro durante 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Controles foram incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro na presença ou não de 0,02% de DMSO. Após as monocamadas foram lavadas com PBS morno (37°C) e as Beads na concentração de 1×10^7 /mL, foram adicionadas as monocamadas por 3 horas. As monocamadas foram lavadas três vezes com PBS analisadas, contadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Nikon eclipse 80i) (média \pm SD, n=3) *p< 0,001. (A) Índice de fagocitose. (B) Porcentagem da atividade fagocítica *p<0,05; **p<0,007. (C) Foto representativa da monocamada tratada ou não com LQB-118.

Fonte: A autora, 2016.

9.1.6 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos humano

Com o objetivo de avaliarmos se o tratamento com LQB-118 modularia a produção de citocinas pelos macrófagos, dosamos citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF- α) nos sobrenadantes de macrófagos humanos tratados sem infecção ou tratados após infecção.

Os macrófagos humanos, infectados ou não, foram tratados com LQB-118 e os sobrenadantes foram utilizados para que as citocinas fossem dosadas.

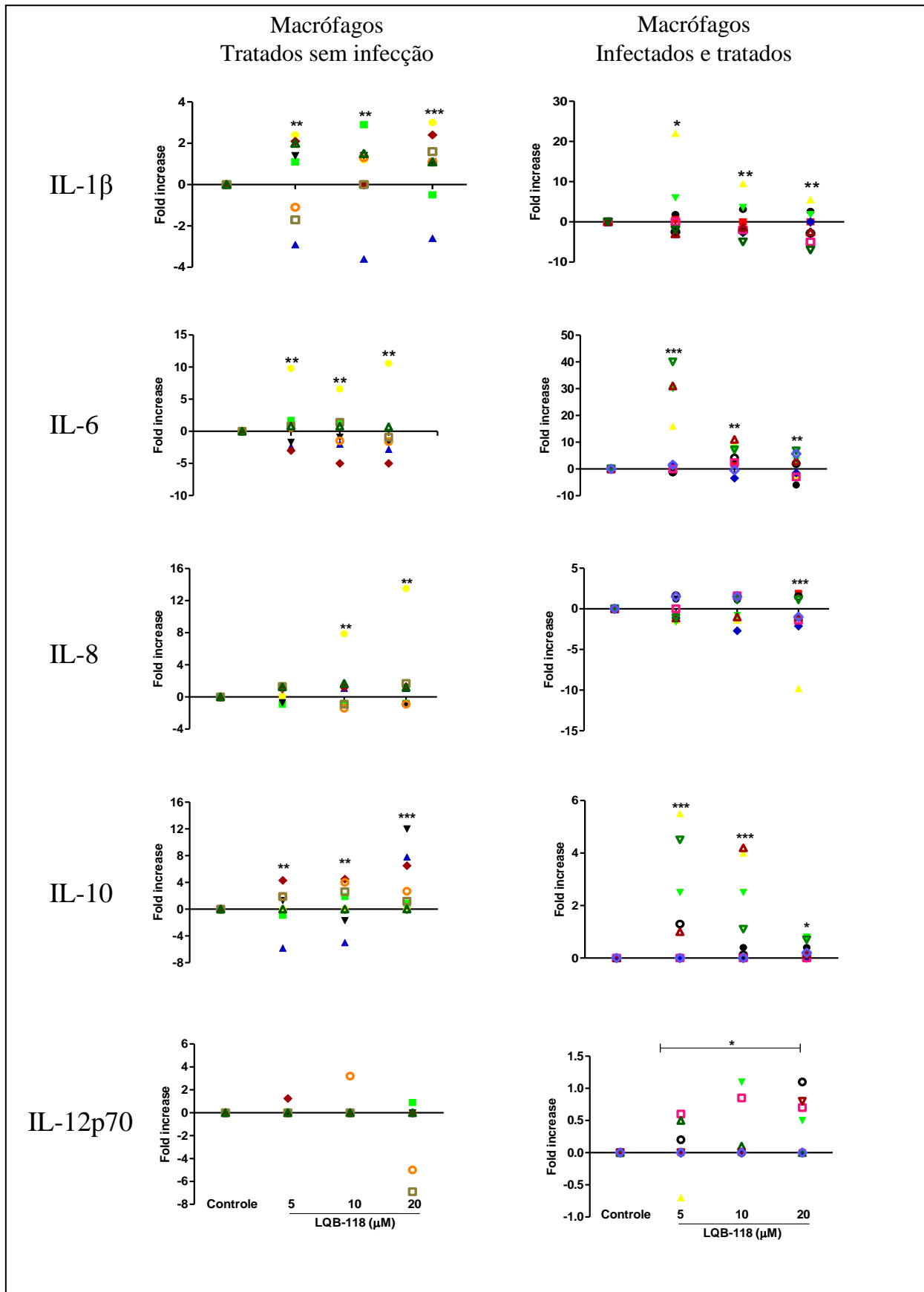
Para uma melhor análise, resolvemos expressar os resultados mostrando quantas vezes à produção das citocinas foram aumentadas (*Fold increase*) em relação ao controle (macrófagos tratados com meio de cultura).

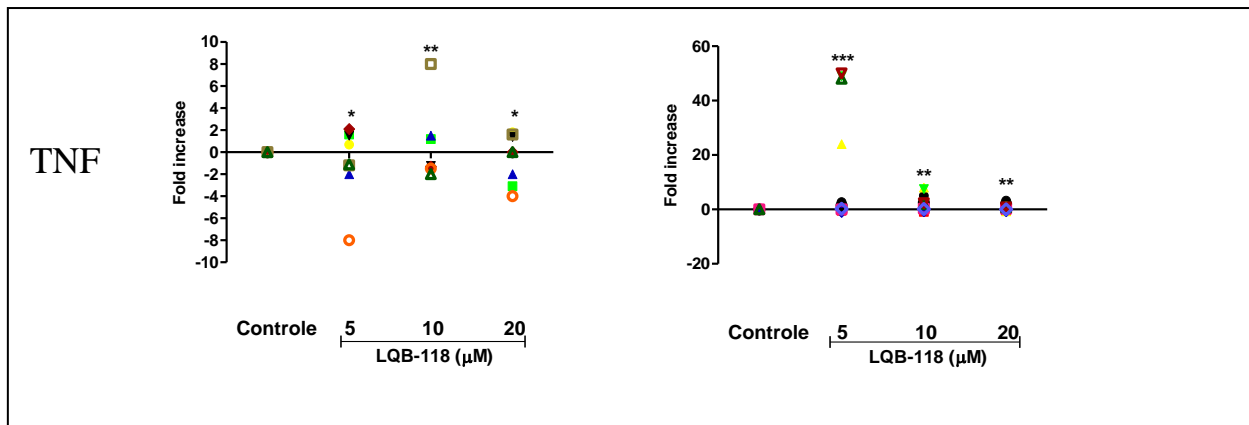
Observamos que os macrófagos tratados apresentaram alteração na produção das citocinas (**Figura 20**). Nos macrófagos sem infecção, o tratamento com LQB-118, em geral aumentou todas as citocinas principalmente, nas concentrações de 5 e 10 μ M. Na concentração de 20 μ M de LQB-118, a citocina IL-6 teve um decréscimo significativo em relação ao controle ($p < 0,01$). Não observamos alterações significativas na produção de IL-12p70 (**Figura 23 e TABELA 6**).

Nos macrófagos infectados e tratados com LQB-118 por 48 horas, observamos aumento das citocinas IL-6, IL-8 e TNF especialmente na concentração de 5 μ M e decaindo com o aumento da concentração da LQB-118. Nas concentrações de 5 e 20 μ M observamos um decréscimo dependente da dose ($p < 0,001$) da citocina IL-10 (**Figura 20 e TABELA 7**).

Nas tabelas 5 e 6 estão mostrados os valores correspondentes às alterações promovidas pelo tratamento dos macrófagos com a LQB-118 em relação à produção de citocinas.

Figura 20 – Efeito da LQB-118 na produção de Citocinas de macrófagos humanos





Legenda: A análise das citocinas foram realizadas em monocamadas de macrófagos humanos oriundos de PBMC sem infecção e tratadas por 24 horas e em macrófagos infectados por *L. (V) braziliensis* e tratados por 48 horas após infecção. Os macrófagos foram mantidos em estufa de 37°C com presença de 5% de CO₂. Após o tempo de cada sistema, os sobrenadantes foram retirados e congelados a temperatura de -20°C. As citocinas foram dosadas no sobrenadante das culturas por CBA. Controles foram incubados com meio RPMI suplementado com 10% de soro. Os ícones coloridos indicam os doadores de sangue (Média ± SD, n=8/10). *p<0,01; **p<0,001 e ***p<0,0001.

Fonte: A autora, 2016.

Tabela 6 – Valores do aumento das citocinas (*Fold increase*) produzidas por macrófagos sem infecção e tratados com LQB-118

Citocinas [LQB-118] (μ M)	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	TNF
5	1,8 \pm 0,2*	2,7 \pm 1,8*	1,0 \pm 0,2*	1,5 \pm 0,6*	0,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,6*
10	1,2 \pm 0,4*	2,5 \pm 1,4*	2,6 \pm 1,3*	2,2 \pm 0,8*	0,4 \pm 0,4	1,5 \pm 1,8
20	1,7 \pm 0,3*	-2,2 \pm 0,6 [#]	3,8 \pm 2,4	2,5 \pm 1	-1,7 \pm 1,1 [#]	1,0 \pm 0,4*

Tabela 7 – Valores do aumento das citocinas (*Fold increase*) produzidas por macrófagos infectados e tratados com LQB-118

Citocinas [LQB-118] (μ M)	IL-1β	IL-6	IL-8	IL-10	IL-12p70	TNF
5	2,0 \pm 1	15 \pm 6,0*	2,1 \pm 0,8*	-1,0 \pm 0,2 [#]	0,2 \pm 0,1	18 \pm 9,0*
10	3,0 \pm 1,9	5,5 \pm 1,4*	1,8 \pm 0,7*	1,1 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2	4,5 \pm 1,1*
20	2,0 \pm 1,0	3,2 \pm 1,4	0,3 \pm 0,1*	-2,2 \pm 1,3 [#]	0,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,4*

Legenda: Valores do aumento das citocinas (*Fold increase*) em relação ao controle – Macrófagos sem infecção.
[#]Decréscimo (vezes) na produção de citocinas. Números sublinhados indicam que não houve produção significativa. *P<0,05.

Fonte: A autora, 2016.

9.2 Atividade terapêutica da LQB-118 *in vivo*

Sendo o hamster golden (*Mesocricetus auratus*) uma espécie suscetível a infecção com *Leishmania* viscerotrópica ou dermatotrópica e que apresenta características clinicopatológica semelhantes à doença humana, torna-se um bom modelo para o estudo relativo a quimioterapia (GARG & DUBE, 2006).

Após observarmos a ação da LQB-118 *in vitro*, resolvemos estudar o efeito terapêutico, tratando os hamsters pela via oral em momentos diferentes da infecção.

9.2.1 Tratamento iniciado após uma semana de infecção

Hamsters foram infectados no dorso da pata direita com *L.(V) braziliensis* e tratados a partir do sétimo dia de infecção o tratamento foi iniciado e mantido durante oito semanas. O tratamento com LQB-118 foi administrado pela via oral cinco vezes por semana.

Observamos que este esquema terapêutico controlou a lesão a partir da quarta semana de tratamento ($p < 0,05$) (**Figura 21A**). Na nona semana, os hamsters que apresentaram lesões menores ou igual a 1 mm foi de 33% (5 de 15 animais) no grupo tratado com a LQB-118, em comparação com 20% do grupo controle (3 de 15 animais). No grupo controle a porcentagem de hamsters que apresentaram lesão com tamanho igual ou maior que 2mm foi de 47% (7 de 15 animais), já no grupo tratado com a LQB-118 a porcentagem foi de 27% (4 de 15) (**Figura 21B**). O tratamento com a LQB-118 por via oral, também foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,0001$) a carga parasitária da pata infectada em relação ao controle não tratado (**Figura 21C e D**).

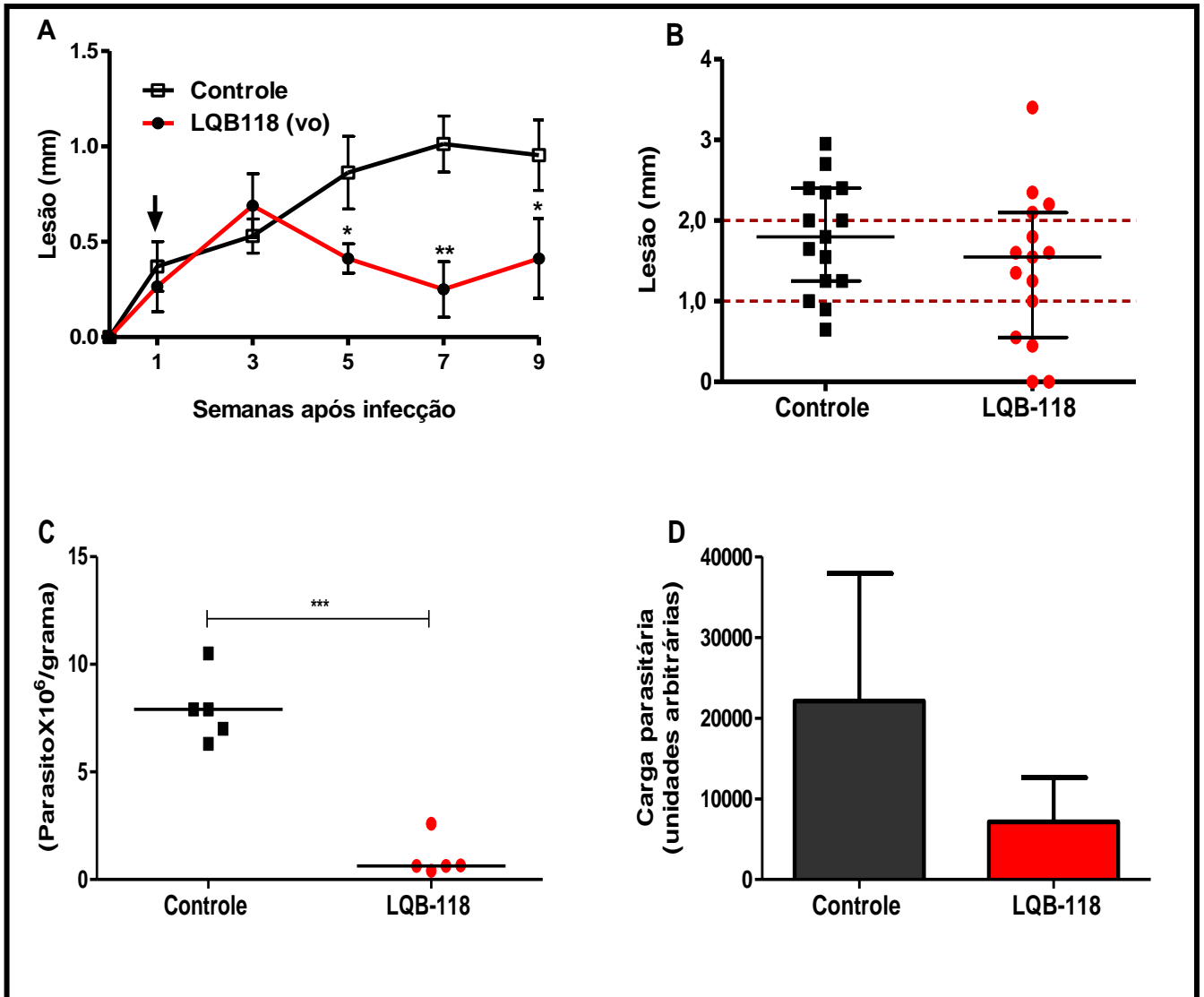
Para avaliarmos o impacto do tratamento na capacidade dos animais responderem ao teste intradérmico (DTH) antígeno total de *L. (V) braziliensis*, avaliamos a resposta em três tempos: 24h, 48h e 72 h após desafio.

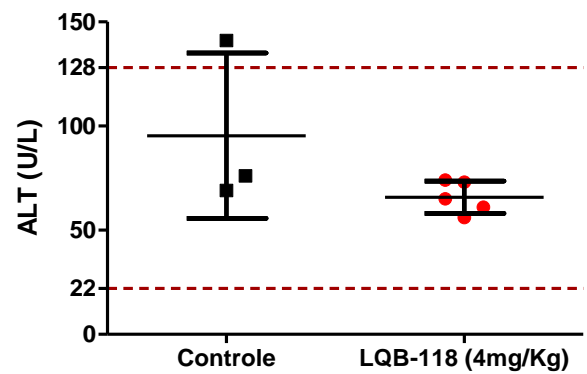
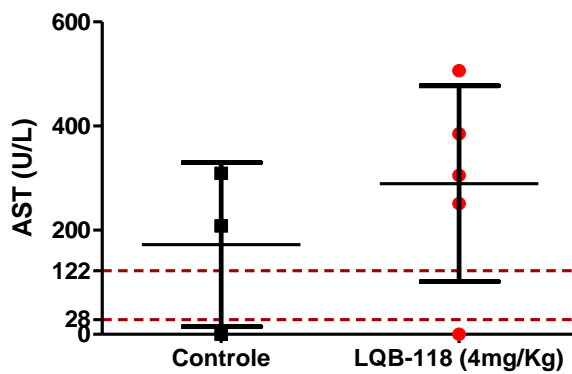
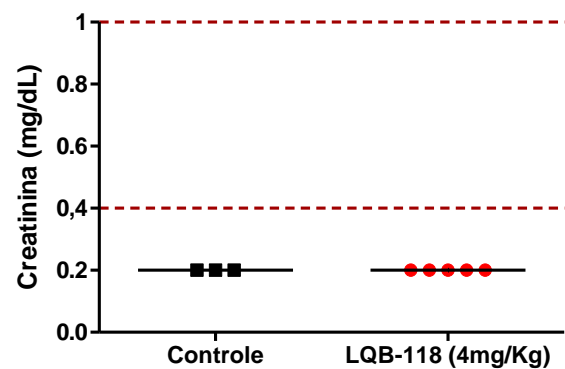
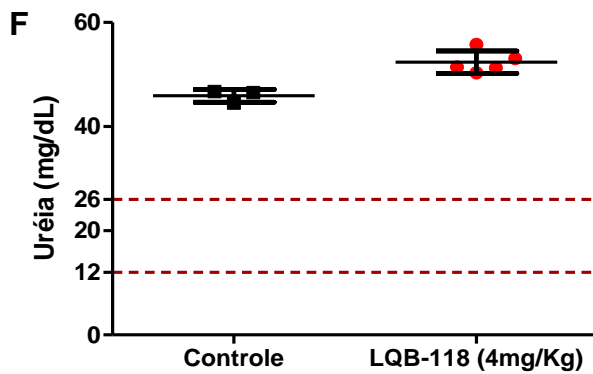
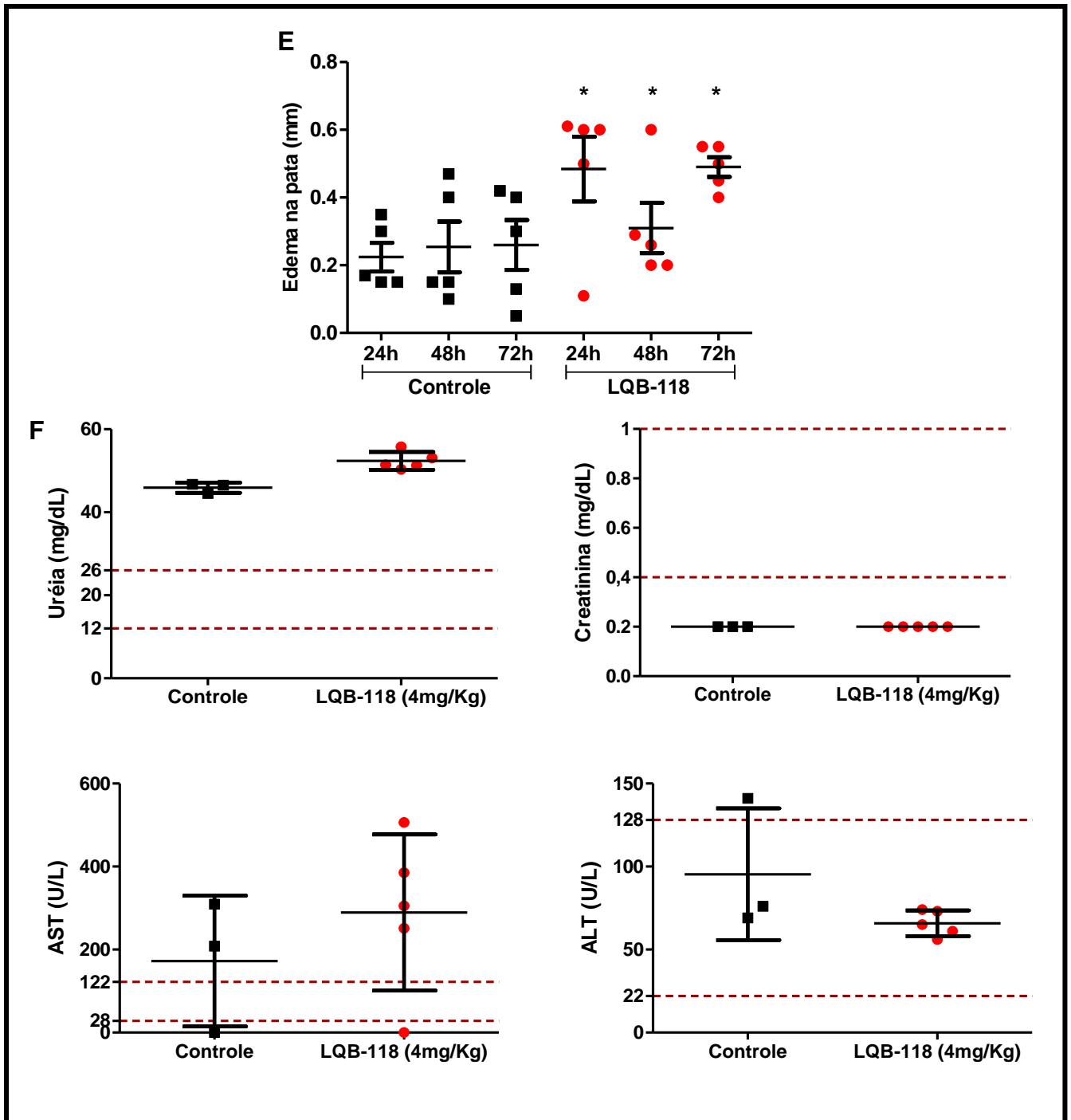
Observamos que, de um modo geral, os animais tratados com LQB-118 apresentaram uma resposta positiva nos três tempos, maior que o grupo controle (**Figura 21E**).

Analisamos os parâmetros toxicológicos séricos e não houve nenhuma alteração significativa nos animais tratados em relação aos não tratados. A enzima hepática aspartato aminotransferase (AST) e os metabólitos renais (uréia e creatinina) ficaram um pouco fora

dos valores de referência em ambos os grupos (tratados e não tratados com LQB-118) (Figura 21F).

Figura 21 – Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado após uma semana de infecção





Legenda: Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado após uma semana de infecção – (A) Curso da lesão: Hamsters golden (5-6/grupo) infectados com *L. (V) braziliensis* na pata traseira e tratados a partir do sétimo dia de infecção com 4mg/Kg de LQB-118 cinco vezes por semana pela via oral durante 8 semanas. Controles foram hamsters não tratados. A seta indica o início do tratamento. O gráfico representa média de 5 animais/grupo \pm desvio padrão. (B) O gráfico indica o tamanho da lesão da pata infectada no 36º dia pós-infecção. Os pontos são valores individuais. As barras horizontais representam os valores medianos. Os dados são de três experimentos independentes. Carga parasitária por grama de tecido (C) da pata infectada. Gráfico representativo de um experimento. Em (D) valores arbitrários correspondentes a três experimentos. (E) A reação intradérmica ao antígeno de *L. (V) braziliensis* foi avaliada na pata contralateral após nove semanas de infecção. O edema foi medido em três tempos diferentes (24, 48 e 72h). (F) Ao final do tratamento, as amostras de soro foram colhidas para determinação colorimétrica dos níveis de ALT (alanina – aminotransferase), AST (aspartato-aminotransferase) e as concentrações de Uréia e Creatinina. As linhas tracejadas indicam os valores mínimos e máximos de referência do CECAL - Fiocruz. * $p < 0,05$; ** $p < 0,006$ e *** $p < 0,0001$.

Fonte: A autora, 2016.

9.2.2 Tratamento após lesão estabelecida

Para avaliar se o tratamento com a LQB-118 teria efeito em um momento mais avançado da infecção, iniciamos o tratamento com a LQB-118 pela via oral (5x/semana) por cinco semanas após a quarta semana de infecção durante 5 semanas. Na quarta semana, podíamos observar uma lesão característica com aproximadamente 0,5mm (lesão estabelecida).

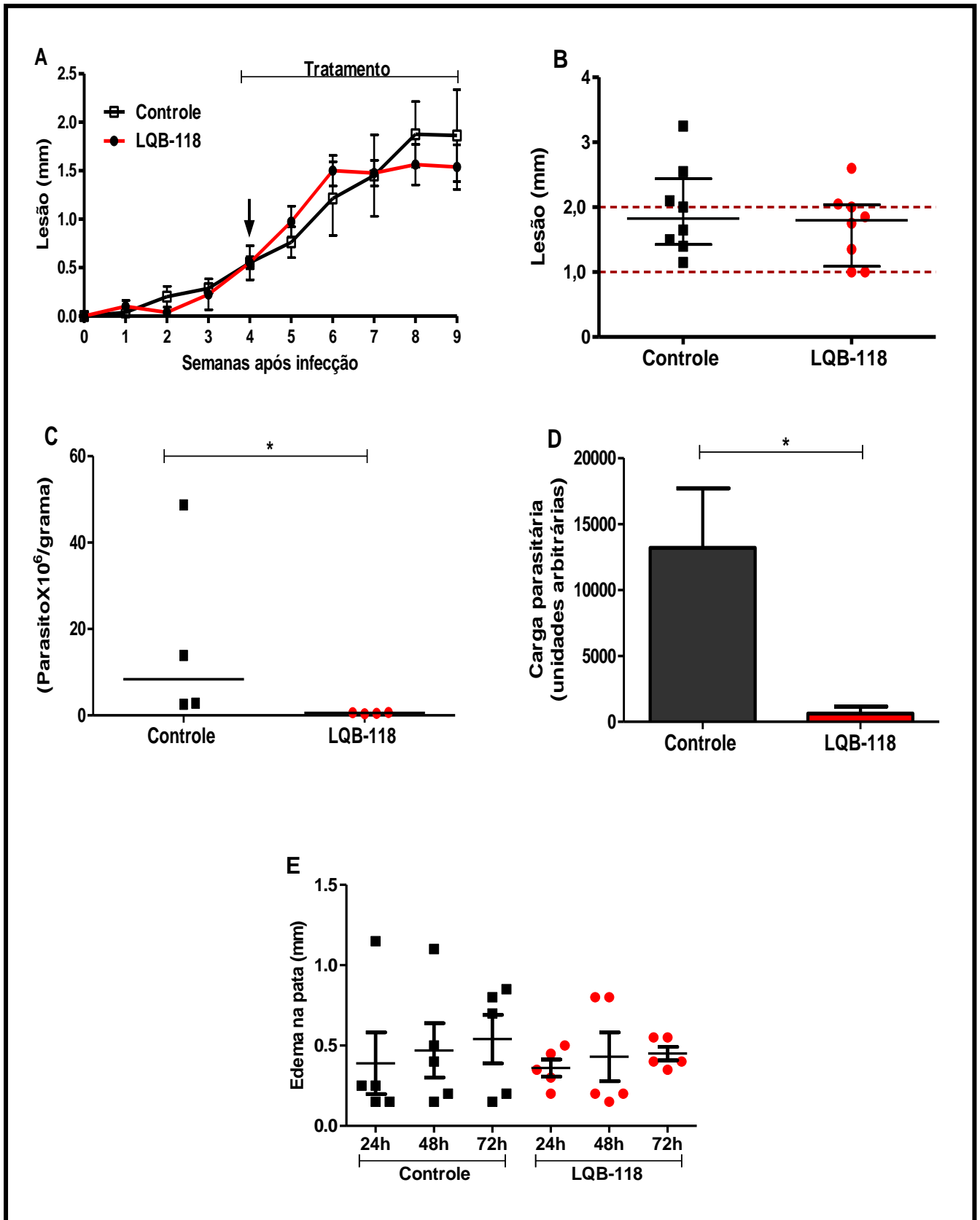
O tratamento com a LQB-118 estabilizou o crescimento da lesão a partir da sexta semana de infecção (com 2 semanas de tratamento), enquanto o grupo não tratado manteve sua tendência ao crescimento (**Figura 22A**).

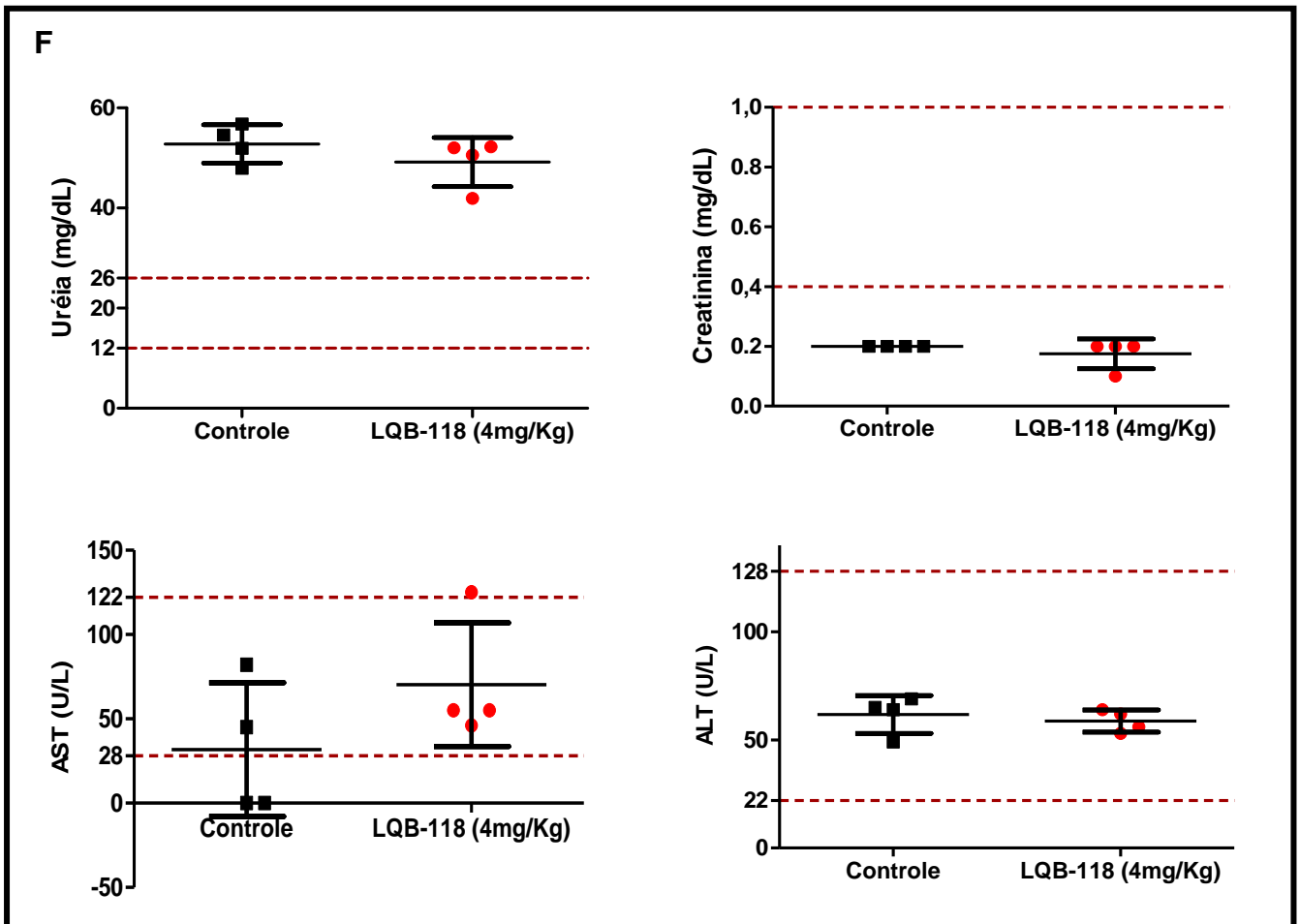
Na última semana de tratamento, observamos que no grupo controle (sem tratamento) a porcentagem de hamsters que apresentaram lesão com tamanho igual ou maior que 2mm foi de 50% (4 de 8 animais), já no grupo tratado com a LQB-118 a porcentagem foi de 37,5% (3 de 8) (**Figura 22B**). O tratamento realizado após o estabelecimento da lesão foi capaz de reduzir significativamente ($p < 0,01$) a quantidade de parasitos/grama de tecido (**Figura 22C e D**).

Observamos que os animais tratados com LQB-118 apresentaram uma resposta intradérmica positiva ao antígeno total de *L. (V) braziliensis*, porém sem diferença significativa quando comparado ao controle não tratado (**Figura 22E**).

Analisamos os parâmetros toxicológicos e, como observado no esquema anterior, não houve nenhuma alteração significativa entre os animais tratados e não tratados na dosagem das enzimas hepáticas (alanina aminotransferase - ALT e aspartato aminotransferase - AST) e metabólitos renais (uréia e creatinina) (**Figura 22F**).

Figura 22 – Efeito do tratamento com LQB-118 e iniciado após o estabelecimento da lesão





Legenda: Efeito do tratamento com LQB-118 e iniciado após o estabelecimento da lesão – Hamsters (4-5/grupo) infectados com *L. (V) braziliensis* na pata traseira e tratados a partir da quarta semana de infecção com 4mg/Kg de LQB-118 cinco vezes por semana pela via oral, por cinco semanas. Controles foram hamsters não tratados. A seta indica o início do tratamento. (A) Curso da lesão: O gráfico representa média de 4 animais/grupo \pm desvio padrão. (B) O gráfico indica o tamanho da lesão da pata infectada no 45º dia pós-infecção. Os pontos são valores individuais. As barras horizontais representam os valores medianos. Os dados são de dois experimentos independentes. Carga parasitária por grama de tecido (C) da pata infectada. Gráfico representativo de um experimento. Em (D) valores arbitrários correspondentes a dois experimentos. (E) A reação intradérmica ao antígeno de *L. (V) braziliensis* foi avaliada na pata contralateral na nona semanas de infecção. O edema foi medido em três tempos diferentes (24, 48 e 72h). (F) Ao final do experimento, as amostras de soro foram colhidas para determinação colorimétrica dos níveis de ALT (alanina – aminotransferase), AST (aspartato-aminotransferase) e as concentrações de Uréia e Creatinina, como parâmetros de toxicidade para o fígado e os rins. As linhas tracejadas indicam os valores mínimos e máximos de referência. * $p < 0,01$.

Fonte: A autora, 2016.

9.2.3 Tratamento antes da infecção

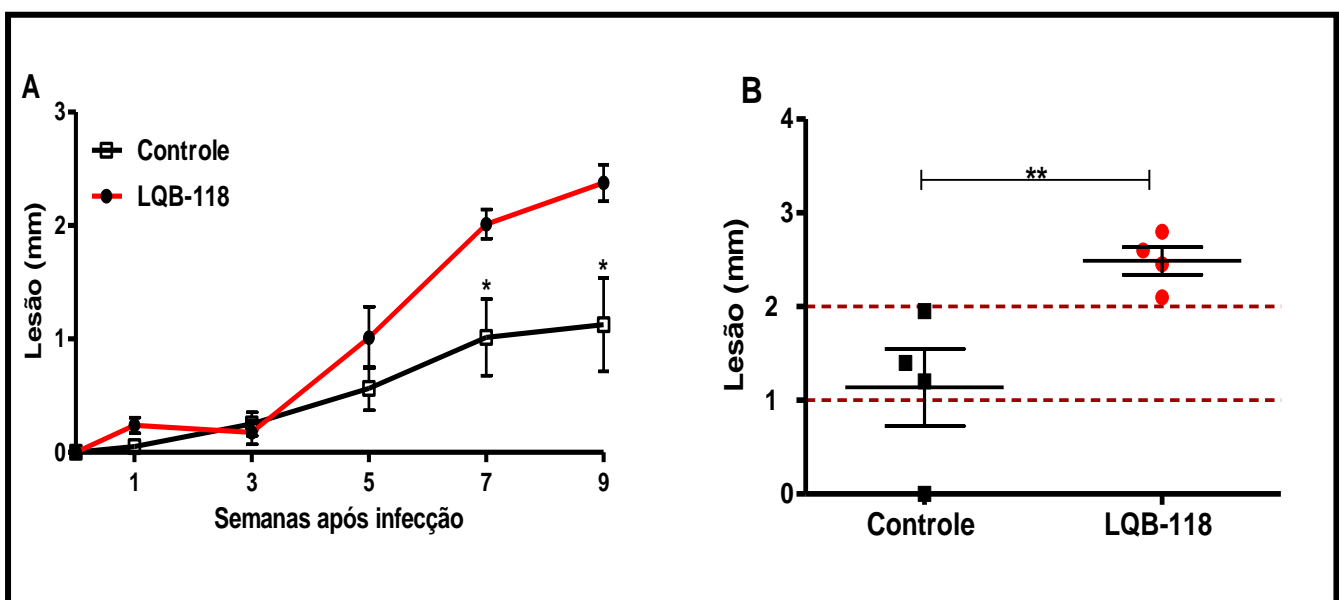
Para uma avaliação da possibilidade da LQB-118 administrada antes da infecção pudesse promover algum efeito no curso da infecção, realizamos um teste piloto. Os animais foram tratados com LQB-118 durante três semanas, por via oral (4,3mg/kg/dia), antes da infecção. Após a terceira semana de tratamento, os animais foram infectados e o tamanho da lesão foi acompanhada por oito semanas.

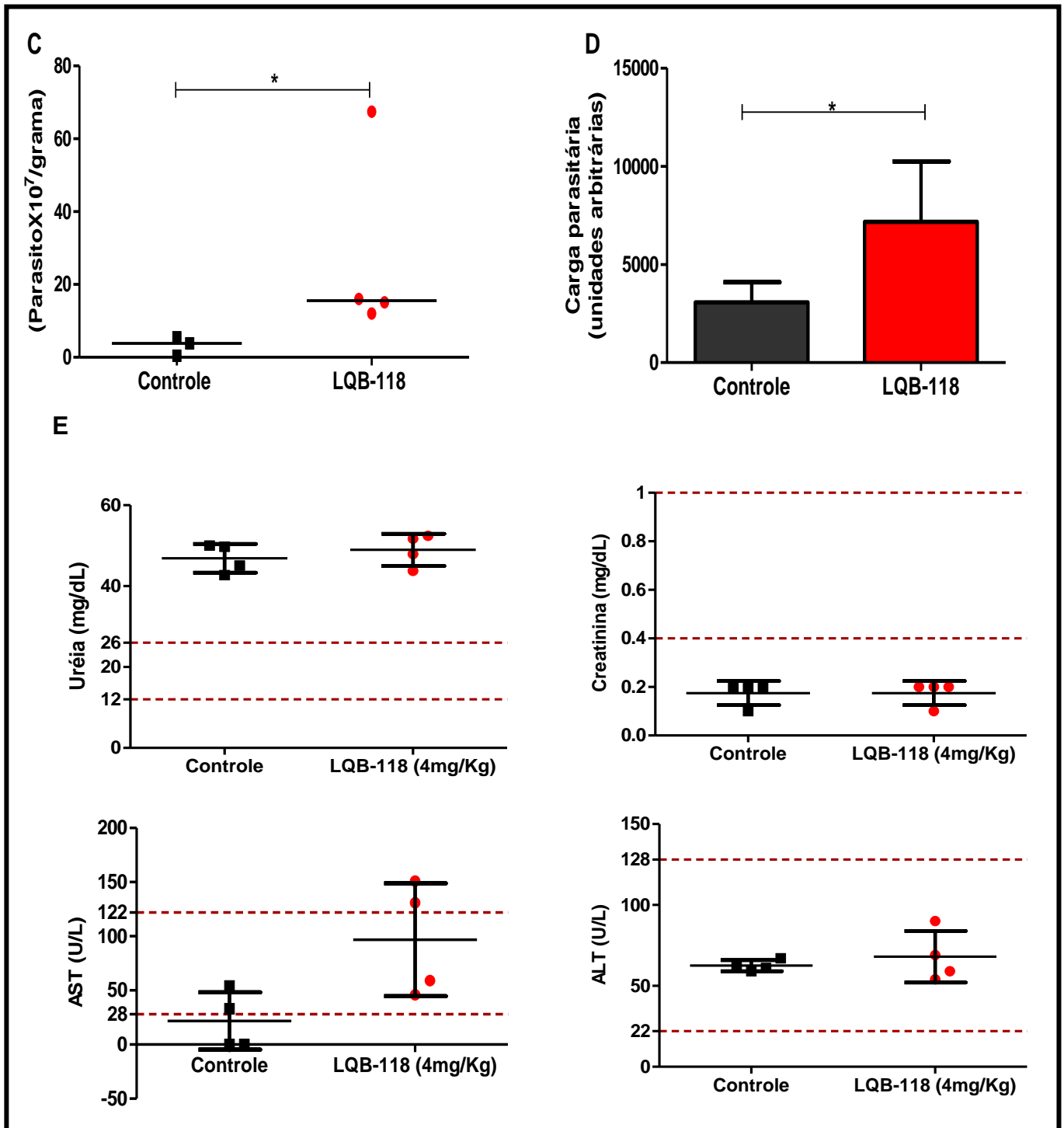
Observamos que a lesão começou a crescer a partir da terceira semana de infecção em ambos os grupos. Entretanto, observamos que o grupo tratado previamente com a LQB-118 apresentou um aumento significativo no crescimento da lesão, quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$) (**Figura 23A**).

Na última semana de medida, observamos que no grupo previamente tratado com a LQB-118, todos os animais (100%) apresentaram lesão maior ou igual a 2 mm. Já no grupo controle o resultado foi inverso, 25% (1 de 4 animais) dos animais apresentaram a lesão menor ou igual a 1 mm e nenhum apresentou lesão maior ou igual a 2 mm (**Figura 23B**). O tratamento realizado antes da infecção levou a um aumento da carga parasitária da pata infectada em relação ao controle (**Figura 23C e D**).

Analisamos os parâmetros toxicológicos séricos renais e hepáticos e, como observado nos esquemas anteriores, não houve nenhuma alteração significativa entre os animais tratados (**Figura 23E**).

Figura 23 – Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado antes da infecção por *L. (V) braziliensis*





Legenda: Efeito do tratamento com LQB-118 iniciado antes da infecção por *L. (V) braziliensis* – Hamsters (4/grupo) tratados com 4mg/Kg de LQB-118 cinco vezes por semana pela via oral antes da infecção por *L. (V) braziliensis* na pata traseira durante três semanas. Controles foram hamsters não tratados. (A) Curso da lesão: O gráfico representa média de 4 animais/grupo \pm desvio padrão. (B) O gráfico indica o tamanho da lesão da pata infectada no 45º dia pós-infecção. Os pontos são valores individuais. As barras horizontais representam os valores medianos. Carga parasitária por grama de tecido (C) da pata infectada. Gráfico representativo de um experimento. Em (D) valores arbitrários correspondentes a dois experimentos. (E) Ao final do tratamento, as amostras de soro foram colhidas para determinação colorimétrica dos níveis de ALT (alanina – aminotransferase), AST (aspartato-aminotransferase) e as concentrações de Uréia e Creatinina, como parâmetros de toxicidade para o

fígado e os rins. As linhas tracejadas indicam os valores mínimos e máximos de referência. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,004$.

Fonte: A autora, 2016.

10 DISCUSSÃO

O tratamento da leishmaniose é restrito a alguns fármacos extremamente tóxicos, caros e cada vez mais contestados pelo surgimento de parasitos resistentes a eles (CROFT *et al*, 2006 e SOTO *et al*, 2008). A miltefosina é o único fármaco administrado por via oral para *Leishmania*, entretanto, há restrições quanto ao custo e toxicidade (MURRAY *et al*, 2005; AMEEN, 2010 e PHAM *et al*, 2013). O desenvolvimento de fármacos que apresentem menor toxicidade, maior eficácia, menor custo e que seja administrado por via oral é muito importante para o tratamento da leishmaniose, sobretudo nos países endêmicos (PHAM *et al*, 2013).

Após serem inoculadas pelos flebotomíneos nos hospedeiros vertebrados, as formas promastigotas de *Leishmania sp* são rapidamente fagocitadas pelos neutrófilos e macrófagos e os macrófagos representam uma importante primeira linha de defesa contra a infecção por *Leishmania sp*. Estudos analisando a ativação dos macrófagos têm revelado que essas células apresentam fenótipos diferentes que podem influenciar na progressão ou resolução da leishmaniose. Sendo assim, os macrófagos são importantes como célula hospedeira e como célula efetora final, uma vez, que são capazes de matar o parasito quando devidamente ativados (LABONTE *et al*, 2014; GLASS & NATOLI, 2015 e DE MENEZES *et al*, 2016).

Após analisarmos a atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 contra *Trypanosoma cruzi* (AZEVEDO, 2013) e espécies de *Leishmania* tanto *in vitro* quanto *in vivo* (CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2011; RIBEIRO *et al*, 2013, COSTA *et al*, 2014 e CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2016), o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial modulador da molécula LQB-118, sobre macrófagos de hamsters/humanos e avaliar a sua eficácia e influência no controle da infecção e lesão *in vivo* em modelo hamster infectados por *L. (V) braziliensis*, que é a espécie de grande relevância no Brasil (QUEIROZ *et al*, 2012 e LUCCA & MACEDO, 2016).

In vitro, mostramos que para macrófagos de hamsters a LQB-118 só demonstrou toxicidade em concentrações acima de 25 μ M e para célula humana a partir de 40 μ M. A concentração de 29 μ M e 21,8 μ M foram estimadas como a LC₅₀, em macrófagos de hamster e humano, respectivamente. Esses valores estão relativamente próximos dos valores encontrados para macrófagos de camundongo que foi de 18,5 μ M (CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2011).

Após analisarmos estes resultados e observarmos que o tratamento de macrófagos com concentrações até 20 μ M não causaria toxicidade à célula hospedeira, elegemos a faixa de concentrações a serem trabalhadas (0-20 μ M).

O tratamento dos macrófagos de hamsters com a LQB-118 após a infecção com *L. (V) braziliensis* foi capaz de reduzir de forma dependente da dose o índice de infecção, sendo a IC₅₀ calculada em 7,6 \pm 1,8 μ M e esta atividade não foi acompanhada da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. A sobrevivência das amastigotas remanescentes foi avaliada e observamos que na concentração de 5 μ M de LQB-118, embora não tenha havido nenhuma redução do número de parasitos houve pouca diferenciação em promastigotas, este resultado sugere que essas amastigotas estavam mortas.

Em macrófagos humanos infectados e tratados, a redução também foi dependente da dose, sendo a IC₅₀ calculada em 9,5 \pm 1,2 μ M e este resultado ocorreu independente da produção de óxido nítrico pelos macrófagos. Nestes macrófagos, a concentração de 20 μ M foi capaz de reduzir em 81% o índice de infecção das amastigotas intracelulares enquanto, nos macrófagos que foram tratados com Glucantime[®] a redução foi de 67%. A porcentagem de amastigotas intracelulares remanescentes também foi reduzida.

Em estudos anteriores realizados com as formas promastigotas de *L. (V) braziliensis*, mostramos que a LQB-118 foi capaz de induzir a morte por apoptose. As formas promastigotas apresentaram redução na produção de ATP e no potencial de membrana mitocondrial, produção de ROS, exposição de fosfatidilserina e fragmentação do DNA (COSTA, 2011 e COSTA *et al*, 2014).

Nesta tese, mostramos que a LQB-118 também foi capaz de induzir a fragmentação do DNA nas formas amastigotas intracelulares sem afetar o núcleo dos macrófagos. Mesmo na menor concentração utilizada (5 μ M), houve indução de fragmentação, corroborando com os resultados da análise das amastigotas remanescentes, em que mostramos a baixa sobrevivência. Analisando estes resultados, é possível dizer que a LQB-118 promova a morte do parasito mais tardiamente, em concentrações menores, permitindo antes a sua replicação. Estes dados corroboram com os estudos de Ribeiro e colaboradores, onde observaram que a LQB-118 foi capaz de induzir a fragmentação do DNA em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Maia e colaboradores também demonstraram que LQB-118 induziu a morte por apoptose em culturas de células de leucemia mielóide crônica, bem como em células de pacientes (MAIA *et al*, 2011 e RIBEIRO *et al*, 2013).

Sabendo que a LQB-118 apresenta efeito direto sobre a *Leishmania*, induzindo a sua morte por apoptose, resolvemos avaliar se esta molécula poderia modular a atividade dos

macrófagos. Para isto realizamos o tratamento com a LQB-118 nos macrófagos de hamsters/humanos sem infecção.

O tratamento prévio dos macrófagos com LQB-118 reduziu o índice de infecção em macrófagos de hamster e humanos. O pré-tratamento dos macrófagos de hamsters foi capaz de aumentar de maneira dependente da dose, a produção de nitrito e em macrófagos humanos a produção de NO ficou inalterada ao controle nos três sistemas.

Os mecanismos de controle da *Leishmania sp* em camundongos exige a ativação de resposta do tipo 1, o que leva à regulação de iNOS por células fagocíticas, resultando na produção de NO e morte dos parasitos. Em humanos, no entanto, a participação da iNOS não é muito clara. *In vitro*, a produção de NO por macrófagos humanos ativados é menos expressiva, o que dificulta a detecção da produção deste radical (NOVAIS *et al*, 2014), talvez por esta razão, não observamos a produção de óxido nítrico por macrófagos oriundos do sangue periférico humano.

Com relação às espécies reativas de oxigênio, não observamos aumento na produção pelos macrófagos, em nenhum dos três sistemas analisados, pelo contrário, houve redução dependente da dose quando comparado com o controle. Sabemos que a produção de EROS é importante para controlar a infecção, porém o excesso de radicais pode desempenhar um papel importante na patogenia e na persistência da inflamação. Portanto, é importante que ocorra a regulação da produção de EROS e NO para evitar uma possível exacerbação da resposta inflamatória, e consequentemente danos no tecido (STEEVELS & MEYAARD, 2011 e RODRIGUES *et al*, 2014), como ocorre na leishmaniose mucosa, uma das formas clínicas causada pela *L. (V) braziliensis* (GUERRA *et al*, 2011).

A LQB-118 é uma molécula sintetizada a partir da hibridação molecular do lapachol e do pterocarpano (DA SILVA, 2009). A naftoquinona apresenta a capacidade redox, portanto dependendo das condições pode inibir ou induzir a produção de EROS. A indução de EROS foi observada nas formas promastigotas de espécies de *L. amazonensis* e *L. (V) braziliensis* tratadas com LQB-118, em tempos menores de 24 horas (CUNHA-JÚNIOR, 2015 e COSTA *et al*, 2014). Os pterocarpanos são isoflavonóides com ação antioxidantes, isto é, compostos que podem proteger contra o estresse oxidativo ligada à inflamação e o risco de danos por radicais livres (BEZEK *et al*, 2008). Sendo assim, esta redução na produção EROS, pelos macrófagos, sugere que a LQB-118 pode apresentar um efeito antioxidante que protege a célula hospedeira após um tempo maior do que 24 horas.

Como vimos, a *Leishmania* apresenta a capacidade de modular o macrófago a fim de contribuir para a persistência da infecção (MOUGNEAU *et al*, 2011). Estes parasitos

intracelulares são capazes de suprimir a produção de IL-12, superóxido e óxido nítrico e promovem a produção de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 e TGF- β . Em contrapartida, macrófagos ativados, por exemplo, pelo IFN- γ , produzem óxido nítrico e citocinas pro-inflamatórias como IL-12 e TNF que promovem o controle da infecção desempenhando então sua função microbicida (NADERER & MCCONVILLE, 2008 e GANNAVARAM *et al*, 2016).

Macrófagos ativados apresentam um aumento da capacidade fagocítica (GUHA *et al*, 2015). Os macrófagos de hamsters tratados com LQB-118 antes da infecção tiveram a sua atividade fagocítica aumentada quando comparadas com as células sem tratamento. Este aumento, nos leva a crer que os macrófagos foram ativados pela ação da molécula LQB-118.

Em um estudo piloto *in vitro* utilizando camundongos BALB/c como modelo experimental, demonstramos que a LQB-118 aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (COSTA, 2011). Como a disponibilidade de reagentes e anticorpos monoclonais para estudos imunológicos em modelo hamster ainda é limitada (GOMES-SILVA *et al*, 2012), analisamos a produção de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e TNF) nos macrófagos humanos.

Observamos que os macrófagos tratados com a LQB-118 e não infectados apresentaram um aumento de todas as citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF), nas concentrações de 5 e 10 μ M. Já na concentração de 20 μ M a citocina IL-6 teve um decréscimo significativo em relação ao controle ($p < 0,01$). O tratamento de macrófagos infectados com a LQB-118 por 48h, também promoveu um aumento, entretanto para a maioria das citocinas esse aumento foi maior na concentração de 5 μ M e decaiu com o aumento da concentração de LQB-118. Nas concentrações de 5 e 20 μ M observamos um decréscimo significativo em relação ao controle ($p < 0,001$) da citocina IL-10. Macrófagos ativados são os principais responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12) (STUMPF, 2014). No entanto, os níveis destas citocinas são expressos de forma diferente dependendo da forma clínica da leishmaniose (GOMES-SILVA *et al*, 2007).

Estudos sobre leishmaniose cutânea mostram que ocorre uma alta produção de citocina pró-inflamatória (IFN- γ e TNF) e aumento de NO. Em pacientes com leishmaniose mucosa, foi observado níveis mais elevados de citocinas inflamatórias e uma menor produção de IL-10. Este tipo de resposta pró-inflamatória, pode contribuir para uma resposta imune inflamatória exacerbada (GOMES-SILVA *et al*, 2007 e LUNDIE *et al*, 2010). A resposta inflamatória será benéfica para o hospedeiro, quando as citocinas forem produzidas adequadamente (DUQUE E DESCOTEAUX, 2014).

O TNF é o primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta às infecções, sendo crucial para induzir proteção local. Quantidades mínimas de TNF contribuem para a defesa do hospedeiro e, quando a produção é excessiva e prolongada, esta citocina torna-se deletéria ao organismo causando desregulação da resposta imune e induzindo a ativação de outras citocinas, os quais promovem inflamação e lesão tecidual (STUMPF, 2014). A produção de IL-10 leva a redução na produção de citocinas relacionadas com o perfil Th1, tais como IL-12 e IFN- γ e isto provoca uma redução da produção de NO e conseqüentemente na capacidade microbicida dos macrófagos (RODRIGUES *et al*, 2014).

Os nossos resultados, demonstram que a LQB-118 é capaz de modular o macrófago para um estado pró-inflamatório o que pode contribuir para a ação leishmanicida. Observamos também, que nos macrófagos tratados antes da infecção, houve produção de IL-10, o que não afetou a capacidade microbicida dos mesmos. É possível que a produção desta citocina, mantenha um equilíbrio na resposta dos macrófagos. Cortez e colaboradores (2011) indicam que a IL-10 é uma importante citocina anti-inflamatória responsável pela resposta imune à prevenção exacerbada a antígenos (CORTEZ *et al*, 2011).

Em um estudo sobre o potencial anti-inflamatório da LQB-118 em modelo de inflamação pulmonar, Riça (2010) mostrou que ocorre a redução dos níveis de TNF, a partir da concentração de 10 μ M, sendo significativa a partir da concentração de 25 μ M em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) humano estimuladas com LPS e incubadas com concentrações (0-100 μ M) de LQB-118. Este resultado corrobora com os observados pelo nosso grupo, onde analisamos que há produção de TNF nos macrófagos infectados e tratados com a menor concentração (5 μ M).

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é altamente suscetível para infecção por *Leishmania sp* e tem sido amplamente utilizado como um modelo para a leishmaniose visceral. Este modelo animal é também apropriado para estudos de leishmaniose cutânea por *L. (V.) braziliensis* porque desenvolve lesões cutâneas crônicas que mimetizam clinicamente as encontradas nos seres humanos (SINAGRA *et al*, 1997; GOMES-SILVA *et al*, 2013 e DA SILVA-COUTO *et al*, 2015).

Cunha-Júnior e colaboradores observaram que o tratamento por via oral com LQB-118 em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*, foi tão eficaz em controlar as lesões neste modelo quanto o tratamento intralesional e intraperitoneal com o antimônio pentavalente (CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2011).

Após observarmos a ação da LQB-118 *in vitro* e *in vivo* na administração intralesional (COSTA, 2011), resolvemos estudar o efeito terapêutico *in vivo*, tratando os animais por via

oral em momentos diferentes da infecção. Sabe-se que esta via é uma das mais importantes devido ao custo e acessibilidade do paciente para a realização do tratamento (MOUGNEAU *et al*, 2011).

Tanto nos animais tratados após uma semana de infecção quanto nos hamsters com lesão estabelecida, o tratamento com a LQB-118 foi eficaz no controle do tamanho da lesão e também foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária. Em relação ao teste intradérmico de reação (hipersensibilidade retardada – DTH) ao antígeno total de *L. (V) braziliensis*, observamos que os animais apresentaram uma resposta positiva nos três tempos, maior que o grupo controle quando tratados com LQB-118. O teste intradérmico é um bom marcador da resposta imune celular na leishmaniose e preditivo de proteção (JOSHI *et al*, 2014 e O'DALY *et al*, 2013).

Ao analisamos os parâmetros toxicológicos não observamos alterações significativas. Entretanto, no grupo tratado após uma semana de infecção, observamos um aumento da enzima hepática AST (aspartato aminotransferase). Porém com relação ao grupo dos animais controle (não tratados) não houve nenhuma alteração significativa. Nos esquemas terapêuticos encontramos um aumento nos níveis de uréia, tanto nos grupos tratados quanto nos grupos não tratados.

A uréia é uma substância tóxica proveniente do metabolismo proteico que é eliminada na urina dos animais. A alta concentração de amônia tem impacto sobre a fisiologia e altas concentrações de amônia são características típicas encontradas na maior parte dos biotérios (FABRÍCIO *et al*, 2012). Porém para análise de toxicidade renal, a creatinina é mais indicada, pois a quantidade de creatinina presente nos rins é mais constante e não é reabsorvida nos túbulos renais, como a uréia (STEVEN & SCOTT, 2002).

Sendo assim, o tratamento com a LQB-118 não parece ser tóxica a nível renal, já que os níveis de creatinina nos experimentos *in vivo* encontram-se abaixo dos valores de referência. Recentemente Cunha-Júnior e colaboradores (2016), realizaram ensaio de toxicidade subaguda utilizando camundongos com um tratamento por via oral com LQB-118 (50mg/kg/dia – por 23 dias), dose e tempos maiores do que os utilizados em nossos experimentos. Eles observaram uma pequena alteração histológica, com pontos de necrose com infiltração leucocitária, no fígado, porém esta observação não foi acompanhada de aumento do nível de transaminases séricas, fosfatase alcalina ou bilirrubina total. Os níveis da proteína total e a concentração de albumina do soro de animais tratados com LQB- 118 estavam normais (CUNHA-JÚNIOR *et al*, 2016). O aumento destas enzimas (AST e ALT) no soro, em associação com a elevação de bilirrubina sérica e uma depleção de albumina,

reflete no dano dos hepatócitos e lesão hepática (GALALY *et al*, 2014), resultado este não encontrado no tratamento de camundongos BALB/c com LQB-118 pela via oral.

Um aspecto crucial na resposta imune a infecções é a adaptação de macrófagos. Dependendo dos estímulos, os macrófagos residentes podem ser direcionados para características fenotípicas distintas (M1 ou M2) (LABONTE *et al*, 2014). Observamos que os macrófagos tratados com LQB-118 apresentam um perfil pró-inflamatório, o que contribui para a diminuição do índice de infecção *in vitro* de amastigotas intracelulares. É provável, que esta ação também ocorra *in vivo* no grupo de animais tratados após uma semana de infecção e no grupo de animais tratados após a lesão estabelecida.

O tratamento com a LQB-118, nos animais infectados, pode ter agido diretamente sobre as formas amastigotas intracelulares levando-as a morte por apoptose e também, pode ter modulado os macrófagos infectados ou não, para um estado ativado induzindo-os a produzir citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, tornando-os mais eficaz em sua função microbicida, resultando na redução da carga parasitária. Além disso, é possível que a ativação destes macrófagos possa recrutar para o local da infecção outras células como, neutrófilos e linfócitos, que trabalhariam em conjunto para a resolução da reação inflamatória por conta da infecção, resultando na redução do edema e lesão da pata infectada.

Como observamos que o tratamento prévio dos macrófagos era eficaz para o controle de amastigotas intracelulares, realizamos um teste piloto tratando um grupo de hamsters antes da infecção. Curiosamente observamos que o grupo tratado previamente com a LQB-118 apresentou um aumento significativo da lesão e da carga parasitária, quando comparado ao grupo não tratado ($p < 0,05$). A meia-vida da LQB-118 poderia ter sido um fator limitante para este esquema terapêutico. Após o tempo de 6,85 horas (CUNHA-JÚNIOR – dados não publicados), a presença da molécula na corrente sanguínea já não seria mais encontrada. Sendo assim, mesmo após as três semanas de tratamento (aproximadamente 15 dias), no momento da infecção é possível que no organismo do hamster, já não houvesse mais a molécula LQB-118 suficiente, o que levaria a um desenvolvimento da lesão e o aumento da carga parasitária. Neste esquema terapêutico, um tratamento com mais doses diárias, poderia ser eficaz para o controle da lesão.

O controle da lesão e a redução da carga parasitária nos outros esquemas foram diferentes, pois ao ser administrada a LQB-118 pode ter sido absorvida e transportada ao local da infecção onde teve ação direta sobre o parasito (como vimos nos experimentos anteriores com macrófagos) e na modulação dos macrófagos o que levaria também a eliminação dos

parasitos. Em estudos realizados *in silico*, a molécula apresentou uma probabilidade de ser 100% absorvida pelo intestino (CUNHA-JÚNIOR, 2015).

A partir deste estudo podemos ressaltar a importância de novas moléculas leishmanicidas. Observamos que a pterocarpanoquinona LQB-118 é capaz de modular inicialmente os macrófagos para um estado pró-inflamatório, contribuindo assim para a sua ação microbicida levando a diminuição do índice de amastigotas intracelulares, e posteriormente regular esta ativação o que faz com que não ocorram danos ou toxicidade à célula hospedeira.

O desenvolvimento de novas moléculas que são oralmente leishmanicidas biodisponível é uma estratégia importante no controle da leishmaniose (PHAM *et al*, 2013). A LQB-118 também é capaz de reduzir a carga parasitária e o tamanho das lesões dos hamsters, tratados pela via oral em diferentes esquemas terapêuticos. Sendo assim, esses resultados sugerem que a LQB-118 pode agir sobre o sistema imune e demonstram a ação terapêutica promissora desta nova molécula sobre a leishmaniose.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os nossos resultados indicam que a LQB-118 é capaz de reduzir o índice de infecção de amastigotas intracelulares em macrófagos tratados antes ou após a infecção com *L.(V) braziliensis* sem causar danos ou toxicidade à célula hospedeira.

O tratamento dos macrófagos com a molécula foi capaz de induzir a fragmentação do DNA nas formas amastigotas, demonstrando a ação direta sobre o parasito induzindo-o à morte por apoptose.

A LQB-118 é capaz de modular e ativar a resposta imune da célula hospedeira levando a produção de citocinas pró-inflamatórias, NO e aumento da capacidade fagocítica dos macrófagos, contribuindo para a resolução da infecção, mas sem que ocorra uma resposta exacerbada.

O tratamento de hamsters, infectados com *L. (V) braziliensis*, com LQB-118 por via oral reduziu significativamente as lesões e a carga parasitária dos animais tratados após uma semana de infecção e no grupo dos animais tratados após lesão estabelecida, sem alterar os marcadores séricos de toxicidade. Os animais tratados com LQB-118, nos dois esquemas terapêuticos foram capazes de apresentar uma resposta intradérmica aos antígenos totais de *L. (V) braziliensis* maior que o grupo controle. No estudo piloto de tratamento antes da infecção, observamos que os animais apresentaram lesão e carga parasitária maiores do que os animais não tratados, sendo necessária uma maior investigação quando a quantidade de doses a serem administradas.

REFERÊNCIAS

- Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages annual review of immunology. *Annurev.Immunol.*1999; (17): 593-623
- Adler S & Theodor O. Investigations on Mediterranean kala-azar. 11. *Leishmania infantum*. *Proc. Roy. SOCB.* 1931, 108, 453.
- Adler S. Inoculation of human leprosy into Syrian hamster. *Lancet.* 1937; 233:714-715.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012; 7(5):e35671.
- Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. *Clinical and Experimental Dermatology.* 2010; (35): 699–705
- Arevalo I, Ward B, Miller R, Meng TC, Najar E, Alvarez E, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis.* 2001; 33(11):1847-51.
- Azevedo BF. Atividade in vitro da pterocarpanoquinona LQB-118 sobre o *Trypanosoma cruzi*. 2013. 76f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.
- Barral A, Costa JML. *Leishmanias A Leishmaniose Tegumentar Nas Américas.* 1º edição,102p. 2011
- Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. *Curr Drug Metab.* 2009;10 (3):247-55.
- Barros de Oliveira CM, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomão R. Citocinas e dor. 2011; *Rev. Bras. Anestesiol.* vol.61 no.2 Campinas Mar./Apr.
- Bartholomeu DC, de Paiva RM, Mendes TA, Da Rocha WD, Teixeira SM. Unveiling the intracellular survival gene kit of trypanosomatid parasites. *PLoS Pathog.* 2014;10(12):e1004399.
- Bezek S, Ujhazy E, Mach M, Navarova J, Dubovicky M. Developmental origin of chronic diseases: toxicological implication. *Interdisc Toxicol* 1. 2008; (1): 29–31.
- Bianco C, Griffin FM Jr, Silverstein SC. Studies of the macrophage complement receptor. Alteration of receptor function upon macrophage activation. *J Exp Med.* 1975; 141(6):1278-90.
- Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis.* 1999; 179 (6): 1485-94.

Cavaillon JM. The historical milestones in the understanding of leukocyte biology initiated by Elie Metchnikoff. *J Leukoc Biol.* 2011; 90 (3): 413-24.

Chisolm Gm, Morel Dw, Cathcart Mk. Macrophage and neutrophil oxidation of low density lipoprotein (LDL) and ldl-induced cell injury. *Circulation* 68,111- 51, 1983.

Chouhan G, Islamuddin M, Sahal D, Afrin F. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. *Front Immunol.* 2014; (5): 193.

Conceição J, Davis R, Carneiro PP, Giudice A, Muniz AC, Wilson ME, Carvalho EM, Bacellar O. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016;10 (5): e0004715.

Corna G, Campana L, Pignatti E, Castiglioni A, Tagliafico E, Bosurgi L, Campanella A, Brunelli S, Manfredi AA, Apostoli P, Silvestri L, Camaschella C, Rovere-Querini P. Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica.* 2010; 95 (11): 1814-22.

Cortez M, Huynh C, Fernandes MC, Kennedy KA, Aderem A, Andrews NW. *Leishmania* promotes its own virulence by inducing expression of the host immune inhibitory ligand CD200. *Cell Host Microbe.* 2011; 9 (6): 463-71.

Costa L, Pinheiro RO, Dutra PM, Santos RF, Cunha-Júnior EF, Torres-Santos EC, da Silva AJ, Costa PR, Da-Silva SAG. Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and controls lesions in infected hamsters. *PLoS One.* 2014; 9 (10): e109672.

Costa L. Atividade da pterocarpanoquinona LQB-118 in vitro e in vivo em *Leishmania braziliensis*. 2011. 72f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 (10): 1478-83.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 2006; 123 (3): 399–410.

Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, Canto-Carvalho MM, Da Silva AJ, Costa PRR, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC. Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1555-9.

Cunha-Júnior EF, Martins TM, Canto-Cavalheiro MM, Marques PR, Portari EA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC, Torres-Santos EC. Preclinical Studies Evaluating Subacute Toxicity and Therapeutic Efficacy of LQB-118 in Experimental Visceral Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60 (6): 3794-801.

Cunha-Júnior EF. Avaliação da atividade e mecanismo de ação da LQB-118 em *Leishmania amazonensis*. 2011. 47f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

- Cunha-Júnior EF. Estudos pré-clínicos da pterocarpanoquinona LQB-118: toxicidade subaguda, eficácia em leishmaniose visceral experimental e mecanismo de ação. 2015. 190f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.
- Da Silva AJM, Netto CD, Pacienza-Lima W, Torres-Santos EC, Rossi-Bergmann B, Maurel S, Valentin A, Costa PRR. Antitumoral, Antileishmanial and Antimalarial Activity of Pentacyclic 1,4-Naphthoquinone Derivatives. *J. Braz. Chem. Soc.* 2009; 20 (1): 176-182.
- Da Silva-Couto L, Ribeiro-Romão RP, Saavedra AF, da Silva Costa Souza BL, Moreira OC, Gomes-Silva A, Rossi-Bergmann B, Da-Cruz AM, Pinto EF. Intranasal vaccination with leishmanial antigens protects golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) against *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9 (1): e3439.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ.* 2003; 15;326 (7385): 377-82.
- Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol.* 2013; 14 (10): 986-95.
- De Luca PM, Macedo AB. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. *Front Immunol.* 2016; 7: 151.
- de Faria FC, Leal ME, Bernardo PS, Costa PR, Maia RC. NFκB pathway and microRNA-9 and -21 are involved in sensitivity to the pterocarpanquinone LQB-118 in different CML cell lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2015; 15 (3): 345-52.
- De Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras PS. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:815023.
- De Menezes JP, Saraiva EM, da Rocha-Azevedo B. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. *Parasit Vectors.* 2016; 9 (1): 264.
- de Moraes CG, Castro Lima AK, Terra R, Dos Santos RF, Da-Silva SAG, Dutra PML. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* infection. *Biomed Res Int.* 2015; 2015:324915.
- De Oliveira CII, Brodskyn CI. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* 2012; 3: 145.
- de Sá Bacelar T, da Silva AJ, Costa PR, Rumjanek VM. The pterocarpanquinone LQB- 118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. *Anticancer Drugs.* 2013; 24:73–83.
- de Sá Bacelar. Indução de Apoptose pela LQB 118, um Novo Composto com Estrutura Pterocarpanoquinona. 2010. 157f. Dissertação (Mestrado em Química Biológica) Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2010.

de Souza Reis FR, de Faria FC, Castro CP, de Souza PS, da Cunha Vasconcelos F, Bello RD, da Silva AJ, Costa PR, Maia RC. The therapeutical potential of a novel pterocarpanquinone LQB-118 to target inhibitor of apoptosis proteins in acute myeloid leukemia cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13(2):341-51.

Dostálová A, Volf P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. *Parasit Vectors.* 2012; 5: 276.

Duque GA, Descoteaux. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol.* 2014; 5: 491.

Dutra PML, Da Silva SAG, Cruz AM, Dutra FL. In: livro Carvalho Alves; Da Poian & Abrahão, 2010) – Bases moleculares em clínica médica/editores Paulo Cesar de Carvalho Alves, Andrea T. Da Poian, Agessandro Abrahão. -- São Paulo: Editora Atheneu, 2010.

Fabício VL, Oliveira AHS, Lapchik VB. Benefícios sanitários do sabugo de milho enriquecido ou não para roedores e técnicos de laboratório. *Resbcal, São Paulo.* 2012. v.1 n.2, p. 169-174.

Ferrante CJ, Leibovich SJ. Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2012;1 (1): 10-16.

Filardy AA, Pires DR, Dos Reis GA. Macrophages and neutrophils cooperate in immune responses to Leishmania infection *Cell. Mol. Life Sci.* 2011; 68:1863–1870.

Findlay GM. The infectivity of neurotropic yellow fever virus for animals. *J. Path.Bact.* 1934; 38:1-6.

Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One.* 2011; 6.

Fulton D & Joyner LP. Infections by *Leishmania donovani* in the Cotton Rat. National Institute for Medical Research, Hampstead, London, 1947.

Gabunia K, Autieri MV. Interleukin-19 can enhance angiogenesis by Macrophage Polarization. *Macrophage (Houst).* 2015; 2 (1): e562.

Gannavaram S, Bhattacharya P, Ismail N, Kaul A, Singh R, Nakhasi HL. Modulation of Innate Immune Mechanisms to Enhance *Leishmania* Vaccine-Induced Immunity: Role of Coinhibitory Molecules. *Front Immunol.* 2016; 7: 187.

Gautam S, Kumar R, Maurya R, Nylén S, Ansari N, Rai M, Sundar S, Sacks D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2011; 204 (7): 1134-7.

Glass CK1, Natoli G2. Molecular control of activation and priming in macrophages. *Nat Immunol.* 2016;17 (1): 26-33.

Gollob KJ1, Viana AG, Dutra WO. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 2014; 36 (8): 367-76.

Gomes-Silva A, de Cássia Bittar R, Dos Santos Nogueira R, Amato VS, da Silva Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol.* 2007; 149 (3): 440-4.

Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology.* 2013; 140 (6): 771-9.

Griffin FM Jr, Griffin JA, Leider JE, Silverstein SC. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. *J Exp Med.* 1975; 142 (5): 1263-82.

Guerra JA, Coelho LI, Pereira FR, Siqueira AM, Ribeiro RL, Almeida TM, Lacerda MV, Barbosa Md, Talhari S. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2011; 85 (3): 524-7.

Guha I, Naskar D, Sen M. Macrophage as a mediator of immune response: Sustenance of immune homeostasis. *Macrophage* 2015; 2: e709.

Hendrickx S, Inocêncio da Luz RA, Bhandari V, Kuypers K, Shaw CD, Lonchamp J, Salotra P, Carter K, Sundar S, Rijal S, Dujardin JC, Cos P, Maes L. Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6 (5): e1664.

Hoeffel G1, Ginhoux F1. Ontogeny of Tissue-Resident Macrophages. *Front Immunol.* 2015; 6: 486.

Isnard A, Shio MT, Olivier M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012; 2:72.

Jones CV, Ricardo SD. Macrophages and CSF-1: implications for development and beyond. *Organogenesis.* 2013; 9 (4): 249-60.

Joshi J, Malla N, Kaur S. A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis-an experimental study. *Parasitol Int.* 2014; 63 (4): 612-20.

Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 2011; 9 (8): 604-15.

Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin.* 2015; 33 (3): 579-93.

Khan N, Gowthaman U, Pahari S, Agrewala JN. Manipulation of costimulatory molecules by intracellular pathogens: veni, vidi, vici!! *PLoS Pathog.* 2012; 8(6): e1002676.

Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *J Leukoc Biol.* 2010; 88 (6): 1157-62.

Labonte AC, Tosello-Trampont AC, Hahn YS. The role of macrophage polarization in infectious and inflammatory diseases. *Mol Cells.* 2014; 37 (4): 275-85.

Lacy P, Stow JL. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood.* 2011; 118 (1): 9-18.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine, Biology and Epidemiology.* W. Peters & R. Killick-Kendrick (eds.). London, Academic press. V. 1, p. 1-120, 1987.

Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:83.

Liu G, Yang H. Modulation of macrophage activation and programming in immunity. *J Cell Physiol.* 2013; 228 (3): 502-12.

Lundie RJ, Young LJ, Davey GM, Villadangos JA, Carbone FR, Heath WR, Crabb BS. Blood-stage *Plasmodium berghei* infection leads to short-lived parasite-associated antigen presentation by dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2010; 40 (6): 1674-81.

Maia RC, Vasconcelos FC, de Sá Bacelar T, Salustiano EJ, da Silva LF, Pereira DL, Moellman-Coelho A, Netto CD, da Silva AJ, Rumjanek VM, Costa PR. LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. *Invest New Drugs.* 2011; 29 (6): 1143-55.

Martino T, Magalhães FC, Justo GA, Coelho MG, Netto CD, Costa PR, Sabino KC. The pterocarpanquinone LQB-118 inhibits tumor cell proliferation by downregulation of c-Myc and cyclins D1 and B1 mRNA and upregulation of p21 cell cycle inhibitor expression. *Bioorg Med Chem.* 2014; 22 (12): 3115-22.

McGwire BS1, Satoskar AR. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 2014 Jan;107(1):7-14.

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9 (9): e0003889.

Menna-Barreto RFS, de Castro SL. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed Res. Int.* 2014; 2014:614014.

Michalick MSM. Comportamento Biológico de Amostras de *Leishmania* dos Complexos *braziliensis* e *mexicana* na Bolsa Alimentar do Hamster (*Mesocricetus auratus*). 1996. 145f. Tese (Doutorado em Imunologia de Prorozoários). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1996.

Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*. 2007; 5: 150–158.

Monge-Maillo B, López-Vélez R. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. *Drugs*. 2013;73(17):1863-88.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008; 8 (12): 958-69.

Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunol Rev*. 2011;240(1):286-96.

Mukherjee AK, Gupta G, Bhattacharjee S, Guha SK, Majumder S, Adhikari A, Bhattacharya P, Majumdar SB, Majumdar S. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. *J Infect*. 2010; 61 (2): 173-84.

Muniz-Junqueira MI, De Paula-Coelho VN. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2008; 8(12):1633-8.

Murray RZ, Stow JL. Cytokine Secretion in Macrophages: SNAREs, Rabs, and Membrane Trafficking. *Front Immunol*. 2014; 5: 538.

Naderer T, McConville MJ. The leishmania–macrophage interaction: A metabolic perspective. *Cell Microbiol*. 2008; 10(2):301-8.

Nagle AS, Khare S, Kumar AB, Supek F, Buchynskyy A, Mathison CJ, , Chennamaneni NK, Pendem N, Buckner FS, Gelb MH, Molteni V. Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human African trypanosomiasis. *Chem Rev*. 2014; 114 (22): 11305-47.

Moradin N, Descoteaux A. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012;2:121.

Nestal de Moraes G, Castro CP, Salustiano EJ, Dumas ML, Costas F, Lam EW, Costa PR, Maia RC. The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells of distinct molecular subtypes and targets FoxO3a and FoxM1 transcription factors. *Int J Oncol*. 2014; 45 (5): 1949-58.

Netto CD, Santos ESJ, Castro CP, Silva AJM, Rumjanek VM, Costa PRR. 3(+/-)-3,4-dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. *European Journal Of Medicinal Chemistry*. 2009; 44: 920-925.

Neuber H. Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2008; 6(9): 754-65.

Newman HN, Addison IE. Gingival crevice neutrophil function in periodontitis. *J Periodontol*. 1982 Sep;53(9):578-86.

Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasseri K, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM, Kieny MP, Tanner M: First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine*. 2008; 26:6759-6767.

O'Daly JA, Spinetti HM, Gleason J, Rodríguez MB. Clinical and Immunological Analysis of Cutaneous Leishmaniasis before and after Different Treatments. *J Parasitol Res*, 2013;1–12.

OMS – Organização Mundial de Saúde - WHO – World Health Organization (2016). Acessado em Abril de 2016. <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

Person HE, Eaton MD. A virus pneumonia of Syrian hamsters. *Proc.Soc. Exp.Biol. Med*, v.45, p.677-679, 1940.

Perdiguero EG, Klapproth K, Schulz C, Busch K, de Bruijn M, Rodewald HR, Geissmann F. The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity*. 2015; 43(6):1023-4.

Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJ, Bertho AL, Da-Cruz AM, Gomes-Silva A. Leishmania braziliensis-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous Leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *PLoS One*. 2013; 8 (11): e81529.

Pérez-Arellano JL, Carranza-Rodríguez C, Cordero-Sánchez M, Muro A. Infecciones por protozoos hemoflagelados I: leishmaniosis. *Medicine*. 2010; 10 (54) : 3621-31

Pham TT, Loiseau PM, Barratt G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *INT J PHARM*. 2013;454(1):539-52.

Portal da Saúde (Brasil) - <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/723-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/leishmaniose-tegumentar-americana-lta/11328-situacao-epidemiologica-dados>. Acesso em: 11 de Junho de 2016.

Queiroz A, Sousa R, Heine C, Cardoso M, Guimarães LH, Machado PR, Carvalho EM, Riley LW, Wilson ME, Schriefer A. Association between an emerging disseminated form of leishmaniasis and Leishmania (Viannia) braziliensis strain polymorphisms. *J Clin Microbiol*. 2012; 50 (12): 4028-34.

Racine V. Ilya Ilyich Mechnikov (Elie Metchnikoff) (1845-1916). *The Embryo Project Encyclopedia*. 2014.

Rasolzadeh S, Haji Fatahalih M, Hosseini M, Jafari R, Miahipour A, Sadreddini S, Babalo Z, Samadi Kafil H, Yousefi M. Recombinant LPG3 Stimulates IFN- γ and TNF- α Secretion by Human NK Cells. *Iran J Parasitol*. 2015; 10 (3): 457-64.

Ravindran R, Bhowmick S, Das A, Ali N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. *BMC Microbiol*. 2010; 10: 181.

Real F, Vidal RO, Carazzolle MF, Mondego JM, Costa GG, Herai RH, Würtele M, de Carvalho LM, Carmona e Ferreira R, Mortara RA, Barbiéri CL, Mieczkowski P, da Silveira JF, Briones MR, Pereira GA, Bahia D. The genome sequence of Leishmania (Leishmania)

amazonensis: functional annotation and extended analysis of gene models. *DNA Res.* 2013;20(6):567-81.

Reveiz L, Maia-Elkhoury ANS, Nicholls RS, Romero GAS, Yadon ZE. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review. *PLoS One.* 2013; 8 (4): e61843.

Rhodes J. Macrophage heterogeneity in receptor activity: the activation of macrophage Fc receptor function in vivo and in vitro. *J Immunol.* 1975; 114 (3): 976-81.

Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavalheiro MM, da Silva AJ, Costa PR, Netto CD, Melo RC, Almeida-Amaral EE, Torres-Santos EC. LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68 (4): 789-99.

Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2004 Apr 1;172(7):4454-62.

Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF. Comparative evaluation of lesion development, tissue damage, and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations. *Infect Immun.* 2014; 82(12):5203-13.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Akharid K, Silvestre R, Estaquier J. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8 (2): e2567.

Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R, Estaquier J. Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit Vectors.* 2016; 9 (1): 118.

Rosenthal AS, Shevach EM. Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig T lymphocytes. I. Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. *J Exp Med.* 1973; 138 (5): 1194-212.

Salustiano EJS, Netto CD, Fernandes RF, Silva AJM, Bacelar TS, Castro CP et al. Comparison of the cytotoxic effect of lapachol, α -lapachone and pentacyclic 1,4-naphthoquinones on human leukemic cells. *Invest New Drugs.* 2009.

Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries.* 2015; 9 (6): 588-96.

Schriefer A, Schriefer AL, Góes-Neto A, Guimarães LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004; 72 (1): 508-14.

Silva MN da, Ferreira VF, Souza MCBV de. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na beta-lapachona e derivados. *Quim. Nova* 2003; 26 (3): 407–16.

Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31 (8): 423-31.

Simpson AG, Stevens JR, Lukes J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 2006; 22 (4): 168-74.

Sinagra A, Riarte A, Luna C, Campanini A, Segura EL. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from argentine patients. *AM J TROP MED HYG.* 1997; 57 (1): 115-8.

Sinha S, Fernández G, Kapila R, Lambert WC, Schwartz RA. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. *Int J Dermatol.* 2008; 47(12):1263-70.

Smylyh J & Young CW. Experimental kala-azar in a hamster (*Cricetulus griseus*, M.-Edw.). *Proc. SOCe. xp. Biol., N. Y.* 1923; 21, 357.

Soares-Bezerra RJ, Leon L, Genestra M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.* 2004; 40 (2): 139-149.

Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, Berman JD. Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78 (2): 210-1.

Soto J, Paz D, Rivero D, Soto P, Quispe J, Toledo J, Berman J. Intralesional Pentamidine: A Novel Therapy for Single Lesions of Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2016; 94 (4): 852-6.

Steevels TA, Meyaard L. Immune inhibitory receptors: essential regulators of phagocyte function. *Eur J Immunol.* 2011;41(3):575-87.

Stevens JR - Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite.* 2008;15 (3): 226-32.

Stow JL, Murray RZ. Intracellular trafficking and secretion of inflammatory cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013; 24 (3): 227-39.

Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, Cacopardo B, Nunnari G. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed Res Int.* 2013; 2013: 805108.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, Mckerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 2008; 118 (4): 1301-10.

Stumpf ARL. Perfil de citocinas pró- e anti-inflamatória e da Proteína c-reativa no tratamento do tumor Venéreo transmissível canino. 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

Tan SY, Dee MK. Elie Metchnikoff (1845–1916): discoverer of phagocytosis. *Singapore Med.* 2009; 50 (5): 456.

Tchernomoretz, I, Bergman, F. et al. A note on the susceptibility of the hamster *Cricetus auratus* to *Mycobacterium tuberculosis* of bovine origin. *Refuah Vet.* 1940; v.2, p.46.

Teixeira MJ, de Almeida YM, Viana JR, Holanda Filha JG, Rodrigues TP, Prata JR, et al. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). *Phytother. Res.* 2001; 15(1):44–8.

Tian S, Chen SY. Macrophage polarization in kidney diseases. *Macrophage (Houst).* 2015;2 (1). pii: e679.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis.* 2011; 15 (8): e525-32.

Tomioka H, Tatano Y, WinMaw W, Sano C, Kanehiro Y, Shimizu T. Characteristics of Suppressor Macrophages Induced by Mycobacterial and Protozoal Infections in relation to Alternatively Activated M2 Macrophages. *Clinical and Developmental Immunology.* Volume 2012, Article ID 635451, 19 p.

Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. Leishmania-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(2):337-51.

van Furth R, Cohn ZA. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med.* 1968; 128 (3): 415-35.

van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ.* 1972;46(6):845-52.

Vernal S, De Paula NA, Gomes CM, Roselino AM. Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. *Open Forum Infect Dis.* 2016; 3 (1): ofv184.

Vieira ÉL, Keesen TS, Machado PR, Guimarães LH, Carvalho EM, Dutra WO, Gollob KJ. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. *Parasite Immunol.* 2013; 35 (2): 65-72.

Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Kamat V, Martin S, Saha B. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol.* 2009; 182 (11): 7146-54.

Wheat WH, Pauken KE, Morris RV, Titus RG. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7 and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells1. *J Immunol.* 2008; 180 (12): 8286–8298.

Xu W, Banchereau J. The antigen presenting cells instruct plasma cell differentiation. *Front Immunol.* 2014; 4: 504.

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética para cuidado e uso de animais experimentais



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES



COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEUA/027/2013 sobre "Estudo da atividade de substâncias antiparasitárias e imunomoduladoras em modelo de infecção com *Leishmania sp* e *Trypanossoma cruzi*", sob a responsabilidade de **Silvia Amaral Gonçalves da Silva**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em 27/06/2013. Este certificado expira em 27/06/2017.

Rio de Janeiro, 27 de Junho de 2013.

Patricia Lisboa

Israel

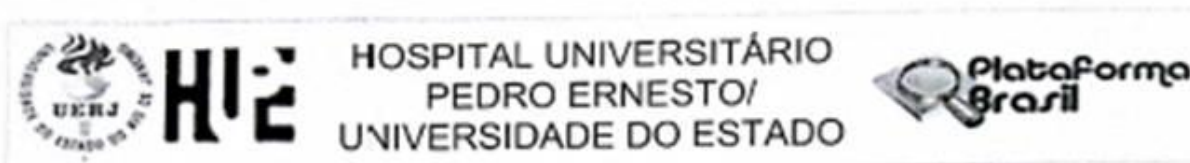
Prof. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

L.055

Prof.ª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Prof. Adj. do Dep. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8
(21) 2567-2188 / 2567-8109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética para uso de células humanas



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da atividade imunomoduladora da pterocarpanoquinona sintética LQB 118 na infecção experimental com *Leishmania braziliensis* em hamsters e em células humanas.

Pesquisador: Sílvia Amaral Gonçalves da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 18479113.0.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 499.945

Data da Relatoria: 09/10/2013

Apresentação do Projeto:

Adequada.

Objetivo da Pesquisa:

Estudar a ação imunomoduladora da pterocarpanoquinona sintética LQB-118 usando o modelo de infecção com *Leishmania braziliensis* em hamsters e em células humanas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos relacionados apenas com a coleta de sangue.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo em humanos e em animais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apropriadas

Recomendações:

Pequenos ajustes listados abaixo a serem realizados diretamente pela pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

No projeto, em "Critérios para seleção de doadores", definir se uso de anti-inflamatórios é critério de inclusão ou exclusão. Informação está ambígua.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2865-8253

Fax: (21)2264-0553

E-mail: oop-hupe@uerj.br

ANEXO C – Artigo Científico

O artigo em anexo intitulado *Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in Leishmania (Viannia) braziliensis and Controls Lesions in Infected Hamsters* (COSTA *et al*, 2014), foi desenvolvido a partir dos resultados sobre o mecanismo de ação da LQB-118 sobre o parasito e sobre macrófagos de camundongos obtidos no mestrado e resultados parciais sobre o tratamento de hamsters pela via intralesional e oral obtidos durante o doutorado.



Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters

Luciana Costa¹, Roberta O. Pinheiro², Patrícia M. L. Dutra³, Rosiane F. Santos¹, Edézio F. Cunha-Júnior⁴, Eduardo C. Torres-Santos⁴, Alcides J. M. da Silva⁵, Paulo R. R. Costa⁶, Sílvia A. G. Da-Silva^{1*}

1 Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Bioquímica de Protozoários e Imunofisiologia do Exercício, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil, **5** Laboratório de Catálise Orgânica, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Laboratório de Química Bioorgânica – Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Abstract

Previous results demonstrate that the hybrid synthetic pterocarpanquinone LQB-118 presents antileishmanial activity against *Leishmania amazonensis* in a mouse model. The aim of the present study was to use a hamster model to investigate whether LQB-118 presents antileishmanial activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which is the major *Leishmania* species related to American tegumentary leishmaniasis. The *in vitro* antileishmanial activity of LQB-118 on *L. braziliensis* was tested on the promastigote and intracellular amastigote forms. The cell death induced by LQB-118 in the *L. braziliensis* promastigotes was analyzed using an annexin V-FITC/PI kit, the oxidative stress was evaluated by 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) and the ATP content by luminescence. *In situ* labeling of DNA fragments by terminal deoxyribonucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) was used to investigate apoptosis in the intracellular amastigotes. *L. braziliensis*-infected hamsters were treated from the seventh day of infection with LQB-118 administered intralesionally (26 µg/kg/day, three times a week) or orally (4,3 mg/kg/day, five times a week) for eight weeks. LQB-118 was active against the *L. braziliensis* promastigotes and intracellular amastigotes, producing IC₅₀ (50% inhibitory concentration) values of 3,4±0,1 and 7,5±0,8 µM, respectively. LQB-118 induced promastigote phosphatidylserine externalization accompanied by increased reactive oxygen species production and ATP depletion. Intracellular amastigote DNA fragmentation was also observed, without affecting the viability of macrophages. The treatment of *L. braziliensis*-infected hamsters with LQB-118, either orally or intralesionally, was effective in the control of lesion size, parasite load and increase intradermal reaction to parasite antigen. Taken together, these results show that the antileishmanial effect of LQB-118 extends to *L. braziliensis* in the hamster model, involves the induction of parasite apoptosis and shows promising therapeutic option by oral or local routes in leishmaniasis.

Citation: Costa L, Pinheiro RO, Dutra PML, Santos RF, Cunha-Júnior EF, et al. (2014) Pterocarpanquinone LQB-118 Induces Apoptosis in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and Controls Lesions in Infected Hamsters. PLoS ONE 9(10): e109672. doi:10.1371/journal.pone.0109672

Editor: Ger van Zandbergen, Federal Institute for Vaccines and Biomedicines, Germany

Received: May 30, 2014; **Accepted:** September 3, 2014; **Published:** October 23, 2014

Copyright: © 2014 Costa et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability: The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), PMLD ECTS AJMS PRRS SAGS. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: silvasag@gmail.com

Introduction

Leishmaniasis are neglected diseases that occur in 98 countries and show an annual incidence of 1 to 1.5 million people worldwide [1–3]. American tegumentary leishmaniasis (ATL) presents with a spectrum of clinical forms, including cutaneous, mucosal and disseminated and diffuse cutaneous leishmaniasis. *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the important species that causes ATL and is the major agent for the mucosal forms in Brazil [4,5]. In general, treatment failures and relapses are common for this form, leading to the mutilation or destruction of the affected nasopharyngeal area [5].

The treatment of leishmaniasis is restricted to a few extremely toxic drugs, quite costly and increasingly challenged by the

development of parasite resistance to drugs [6,7]. Moreover, the treatment is complicated by intrinsic, species-specific differences, resulting in variable drug susceptibilities in determinate geographical locations. Because of high cost or limited effectiveness, the supply of the new formulations of amphotericin B and oral miltefosine have been insufficient to meet the demand, especially in endemic regions [8–10]. The development of drugs that are less toxic, more effective, less costly and orally administrable is critical for the treatment of leishmaniasis in endemic countries [10].

Naphthopterocarpanquinone LQB-118 is a synthetic molecule produced through the hybridization of a naphthoquinone with a pterocarpan (isoflavonoid). Previous studies demonstrated that LQB-118 has antitumoral activity and induces apoptosis in cells

derived from chronic myeloid leukemia patients [11]. Our group has recently demonstrated the antileishmanial activity of LQB-118 administered by the local or oral route in the treatment of BALB/c mice infected with *L. amazonensis*. This treatment was able to control the lesions and parasite load with the same efficacy as Glucantime, which was used as the reference drug [12].

Mice are naturally resistant to *L. braziliensis* infection and resolve the infection in approximately 5 weeks [13,14]. The infection of golden hamsters with *L. braziliensis* results in a localized lesion and the dissemination of the parasite, which resembles the infection profile in humans [15,16].

In the present study, we evaluated the activity of LQB-118 on *L. braziliensis* using golden hamster as the infection model. Our findings indicated that LQB-118 is therapeutically effective when administered orally or intralesionally and is active *in vitro* against *L. braziliensis*, selectively inducing DNA fragmentation in the intracellular amastigote.

Materials and Methods

LQB-118

LQB-118 was synthesized as previously described [17] in the Laboratory of Bioorganic Chemistry of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. LQB-118 was dissolved in DMSO (dimethylsulfoxide) (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA).

Parasites

Leishmania braziliensis (MCAN/BR/98/R619) was routinely isolated from hamster lesions and maintained as promastigotes in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) containing 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Cultilab, Brazil) and 100 µg/ml gentamicin (Schering-Plough). The parasites were used after no more than five passages.

Animals

Female golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) six to eight weeks old were obtained from Fundação Oswaldo Cruz. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Brazilian National Council of Animal Experimentation. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro-UERJ, by the number protocol 044/2009.

Antipromastigote growth

Stationary-phase, *L. braziliensis* promastigotes at 5×10^5 cells/mL were cultured in a 24-well culture plate (1 mL/well) at 28°C in Schneider's medium plus 20% heat-inactivated fetal calf serum containing the indicated concentrations of LQB-118. The controls were treated with 0,2% DMSO, which was the highest concentration of DMSO present in the LQB-118 treatments (0–20 µM). To determine whether the antileishmanial effect of LQB-118 was reversible, the parasites were incubated with LQB-118 (0–20 µM) for 48 h at 26°C, and the number of parasites was then counted. The cells were centrifuged (1000 ×g for 10 min), washed twice in PBS, their number adjusted and incubated again for another 48 h at 28°C with Schneider's medium plus 20% fetal bovine serum, and then the promastigotes were counted in a Neubauer chamber.

Antiamastigote activity

Resident macrophages were obtained from the peritoneal cells of golden hamsters after the peritoneal injection of 10 mL of DMEM. The peritoneal cells (2×10^6 /mL) were plated onto glass

coverslips placed within the wells of a 24-well culture plate (0,5 mL/well) and incubated at 37°C in 5% CO₂ for 1 h. After removing the nonadherent cells, the monolayers were infected with 5 promastigotes for each macrophage for 4 h at 37°C in 5% CO₂. The infected macrophages were washed and incubated with several concentrations of LQB-118 for 48 h at 37°C in 5% CO₂. The monolayers were then stained with Giemsa, and at least 100 infected macrophages per sample were counted under optical microscopy. The supernatant was collected for nitric oxide analysis. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was determined by logarithmic regression analysis using GraphPad Prism 5.

Determination of nitric oxide production

For the analysis of the production of nitric oxide (NO) by the infected macrophages, the culture supernatant was collected after 48 h of LQB-118 treatment, as described above. The production of NO was measured by assaying nitrite (NO₂) using the Griess reaction, as described previously [18].

Measurement of ROS levels in *L. braziliensis* promastigotes

Intracellular ROS levels were measured in treated and untreated cells as described previously [19]. Briefly, promastigotes of *L. braziliensis* were cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% HIFCS and incubated at 26°C in concentrations of LQB-118 ranging from 0 to 10.0 µM. After 48 h, the cultures were washed three times and the parasite concentration was adjusted to 1×10^7 cells/mL. Then, 20 µM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) was added, and the samples were incubated for 30 min under dark conditions. The fluorescence was monitored using a Spectra Max GEMINI XPS spectrofluorometer (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA) at excitation and emission wavelengths of 507 and 530 nm, respectively.

ATP content determination

Intracellular ATP concentration was measured in treated and untreated cells using a CellTiter-Glo luminescent assay (Promega), which generates a signal proportional to the ATP amount. Briefly, promastigotes of *L. braziliensis* were cultured in Schneider's insect medium supplemented with 10% HIFCS and incubated at 26°C in the absence or presence of LQB-118 (2,5, 5, 10 and 20 µM). After 48 h, the cultures were washed three times and the parasite concentration was adjusted to 1×10^7 cells in 200 µL of PBS. A 50 µL aliquot of each sample was transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo and incubated in the dark for 10 min, and the bioluminescence was measured using a GloMax-Multi Microplate Multimode Reader (Promega). ATP concentrations were calculated from the ATP standard curve. The respiratory chain inhibitor KCN 1 mM (inhibitor of the complex IV) was used as control.

Mitochondrial membrane potential (Ψ_m)

To determine the effect of LQB-118 on the $\Delta\Psi_m$ in macrophages (2×10^6 cells/mL) were cultured in the presence of 3,125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 and 200 µM of LQB-118 at 37°C/5%CO₂. After 48 h, the cells were incubated for 10 min with JC-1 (Sigma-Aldrich), washing in Hanks balanced salt solution (HBSS) and fluorescence was measured spectrofluorometrically at both 530 and 590 nm using 485 nm as the excitation wavelength. The ratio between red and green fluorescence (i.e. 590/530 nm) determined the $\Delta\Psi_m$ [20].

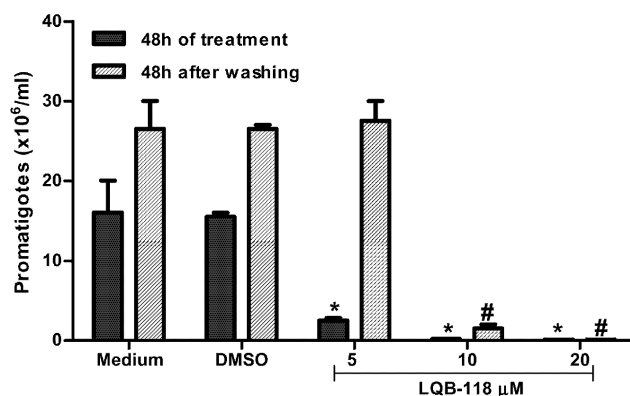


Figure 1. *In vitro* anti-Leishmanial effect of LQB-118 on promastigotes. Promastigote forms of *L. braziliensis* were treated with the indicated concentrations of LQB-118 for 48 h/28°C. Parasite number was counted (black bars), washed and incubated for more 48 hours at 28°C without LQB-118 (crosshatched bars). Mean \pm SD, n = 3, *p < 0.001 (LQB-118 treatment in relation to DMSO), # p < 0.001 (LQB-118 in relation DMSO after washing and incubated). doi:10.1371/journal.pone.0109672.g001

In situ detection of DNA fragmentation by terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

DNA fragmentation into the cell was analyzed using an *in situ* cell death detection kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Briefly, the hamster macrophages (4×10^7 /well) were adhered in monolayers to Lab-Tek eight-chamber slides (Nunc, Roskild, Denmark), infected (5 promastigotes per macrophage) and treated with LQB-118 for 48 h at 37°C in 5% CO₂. The monolayers were washed twice in PBS and fixed in paraformaldehyde (4%) for 10 min. The cells were washed in PBS, incubated in a solution of 3% hydrogen peroxide and methanol for 10 min and then washed again with PBS. The monolayers were permeabilized with a solution of 0.1% Triton x-100 and 0.1% sodium citrate and then labeled with the TUNEL solution for 1 h at 37°C. Finally, the monolayers were washed with PBS and analyzed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse-80i).

Flow cytometric analyses of externalized phosphatidylserine

The phosphatidylserine externalization by the parasites was assessed using an annexin V-FITC staining kit (BD Biosciences, San Diego, USA). Briefly, promastigotes (2×10^6 cells/mL) were incubated in the absence or presence of LQB-118 (5, 10 or 20 μM) for 24 and 48 h at 28°C. The cells were washed twice and resuspended in 100 μl binding buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂), containing 1 μl annexin V-FITC. After 20 min, the cells were washed twice and resuspended in 300 μl of binding buffer; then, at the time of data acquisition, 1.67 μg/mL of propidium iodide was added. The data were acquired using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Accuri, Ann Arbor, MI, USA) and analyzed with CFlow software.

In vivo activity

Golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) were used for the infection model. The animals were held 5–6/group and infected in the hind footpad with 10⁷ stationary-phase, *L. braziliensis*

promastigotes. Beginning 7 days postinfection, each group was treated for eight weeks with LQB-118 (solubilized in DMSO) administered three times a week by the intralesional route (26 μg/kg/day), LQB-118 (partially solubilized in PBS) given five times a week by the oral route (4.3 mg/kg/day) or meglumine antimoniate (Glucantime, Sanofi-Aventis) given by the intraperitoneal route (70 mg/kg/day). The groups of control animals received 10 μl DMSO (Sigma) by the intralesional route three times a week or were left untreated. The lesion sizes were measured weekly with a dial caliper (Mitutoyo, Brazil). In the eighth week of infection, the intradermal reaction of *L. braziliensis* antigen was evaluated. The left hind footpad was injected with 20 μl of total antigen (obtained by freezing and thawing) corresponding at 2×10^6 promastigotes. Twenty-four h later the footpad swelling was measured with dial calliper, and the intradermal reaction was expressed as the difference between thickness prior and to injection. The hamsters were euthanized at the end of the experiment using carbon dioxide chamber, and their infected paws were aseptically excised, skinned, weighted and ground in Schneider's medium (Sigma) containing 20% fetal calf serum. The cell suspension was serially diluted, and the motile parasites were evaluated using limiting dilution analysis after 7 days.

Statistical Analysis

The statistical analyses of the *in vitro* drug effects on the promastigote and amastigote forms were performed using Student's t-test. The statistical analyses of the *in vivo* experiments were performed using analysis of variance (ANOVA) and the Tukey post hoc test.

Results

In vitro antileishmanial activity against *L. braziliensis*

To evaluate whether the previously demonstrated antileishmanial activity of LQB-118 on *L. amazonensis* also occurred on *L. braziliensis*, promastigotes were initially cultivated in the presence of different concentrations of LQB-118 (0–20 μM) for 3 days. LQB-118 inhibited the growth of the parasites in a dose-

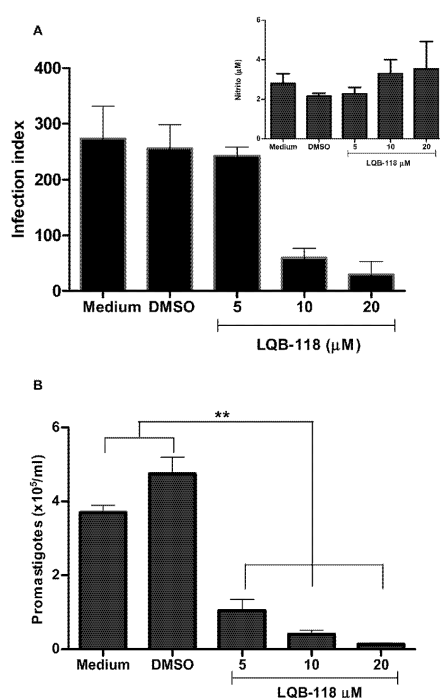


Figure 2. In vitro Activity of LQB-118 on *L. braziliensis*-infected macrophages. Monolayer of hamster peritoneal macrophage were infected with *L. braziliensis* (ratio of 5 parasites/macrophages) and subjected to treatment with the indicated concentrations of LQB-118 for 48 hours at 37°C/5% CO₂. **A**) Macrophage monolayer was stained and the infection index was determined by counting at least 100 macrophage. Nitric oxide production in the supernatants was measured by assaying for nitrite using Griess method (inset) or **B**) After 48 h of the treatment the monolayers of infected macrophages were washed twice and incubated with Schneider's medium and 20% fetal bovine serum at 28°C for more 48 h and promastigotes were counted (mean ± SD, n=3). * p<0,01, ** p<0,001(LQB-118 treatment in relation to control). doi:10.1371/journal.pone.0109672.g002

dependent manner and completely prevented growth at the 20 μM concentration (p<0,001) (Figure 1A, black bars). The value of the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was estimated at 3,4±0,1 μM. To determine whether the decrease in the promastigote multiplication induced by LQB-118 was reversible, we treated the promastigotes with LQB-118 for 48 h and after this time, the cells were washed and reincubated for another 48 hours in the absence of LQB-118. The inhibitory effect on growth was not reversed when LQB-118 (at 10 or 20 μM) was removed from the culture (Figure 1, crosshatched bars).

To investigate whether the antileishmanial effect of LQB-118 observed in the promastigote forms extended to the intracellular amastigote, infected hamster macrophages were treated with different LQB-118 concentrations (0–20 μM) for 48 h. Figure 2A shows a dose-dependent inhibition of the infection index (p<0.01). The IC₅₀ was calculated as 7,5±0,8 μM. The nitric oxide concentration was measured in the supernatants of the cultures,

and there were no changes in its production under these conditions (Figure 2A, inset). To evaluate the survival of the amastigotes remaining after LQB-118 treatment, we investigated the ability of these amastigote to differentiate into promastigotes. The monolayers of infected and treated macrophages were washed and reincubated with Schneider's medium and 20% fetal bovine serum at 28°C for another 48 hours, and the promastigotes were then counted in a Neubauer chamber (Figure 2B). The results showed that the remaining amastigotes lost the capacity to differentiate into promastigotes. Although the treatment at 5 μM did not decrease the number of intracellular amastigotes (Figure 2A), their capacity to differentiate into promastigotes was compromised (Figure 2B).

Induction of apoptosis in *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes by LQB-118

To determine whether the irreversible effect of LQB-118 observed on *L. braziliensis* occurred because of the induction of apoptosis, cells treated with LQB-118 were investigated for labeling with annexin V-FITC/PI, ROS production, ATP depletion and DNA fragmentation. The promastigote forms treated with 3,5 μM (IC₅₀) and 20 μM LQB-118 showed annexin labeling (AnV⁺, PI⁻) at 48 h (Figure 3A). The treatment with 20 μM LQB-118 at 24 h and 48 h promoted the labeling of 16.9% and 30.3%, respectively (Figure 3B). As oxidative stress is other hallmark of apoptosis, we also analyzed the generation of reactive oxygen species (ROS) by LQB-118-treated promastigotes. A concentration-dependent increase in ROS production was achieved in cells treated with LQB-118 (Figure 3C). Interestingly, this increase in ROS production was paralleled to a severe depletion of ATP stocks (Figure 3D). To extrapolate these findings to the clinically relevant form of the parasite, hamster peritoneal macrophages were infected with *L. braziliensis*, treated with LQB-118 and DNA fragmentation was evaluated by TUNEL assay. Fluorescence analysis revealed that 7.5 μM LQB-118 was enough to induce DNA fragmentation in intracellular amastigotes (green-labelled structures in Figure 3E) and a concentration as high as 20 μM kept the selectivity against the parasite, as no label is seen in the host cell nucleus (Figure 3E).

Effect of LQB-118 on the mitochondrial membrane potential (ΔΨ_m) of hamster macrophages

To evaluate the selectivity of LQB-118, we sought to investigate the mitochondrial function of LQB-118-treated hamster macrophages. In agreement with our previous results on mice macrophages (data not shown), no toxicity in hamster macrophages was observed in the IC₅₀ range. Loss of ΔΨ_m in host cells was weakly observed just with 25 μM LQB-118. Expressive mitochondrial depolarization was obtained only in concentrations higher than 100 μM after 48 h LQB-118 treatment (Figure 4).

Effect of LQB 118 on hamsters infected with *L. braziliensis*

The therapeutic effect of LQB-118 was evaluated in *L. braziliensis*-infected hamsters. Seven days after footpad infection, the hamsters were treated with LQB-118 by the intralesional (three times a week) or oral (five times a week) route for eight weeks. The controls were hamsters treated with intralesional DMSO (three times a week) or Glucantime (five times a week) by the intraperitoneal route or left untreated. LQB-118 decreased the lesion size from the fourth week of the treatment (fifth week of the infection) (Figure 5A). Although not statistically significant, the lesion size was decreased from the fourth week of the treatment (fifth week of the infection) in the groups treated with LQB-118 by

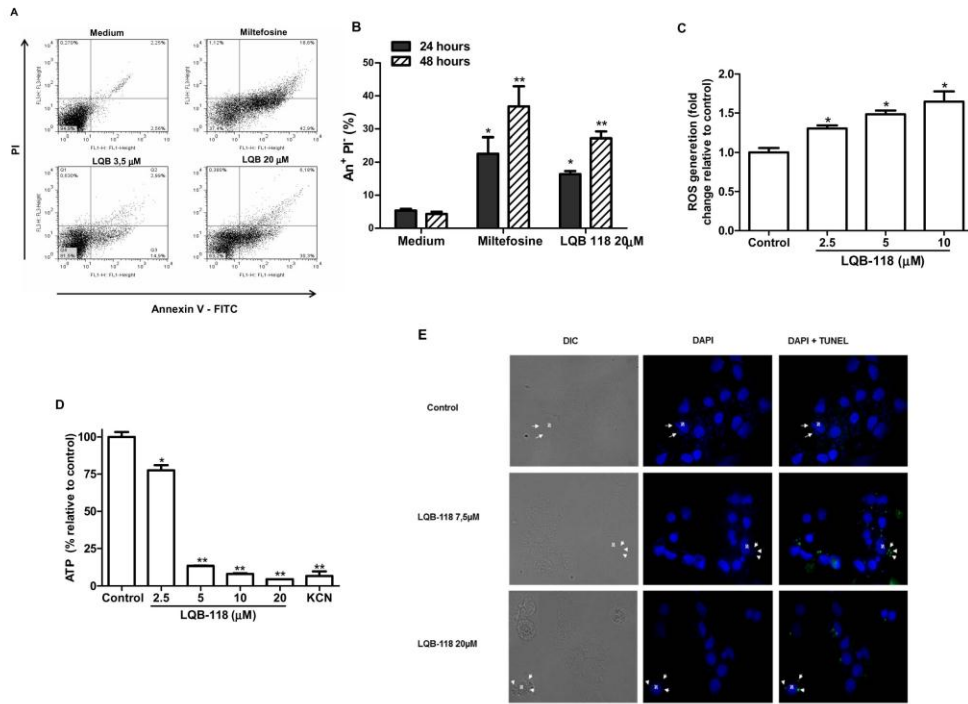


Figure 3. Evaluation of LQB118 inducing apoptosis on *L. braziliensis* – A) and B) Phosphatidylserine exposure on promastigotes. Promastigotes were incubated with 3,5 or 20 μM LQB118 to 24 or 48 h/28°C and then stained with Annexin V-FITC+propidium iodide and analyzed by flow cytometer. Controls were promastigotes incubated with 60 μM Miltefosine or the culture medium supplemented with 20% fetal bovine serum. In **A** only treatment at 48 h and in **B** quantitative evaluation of cells stained with annexin V-FITC at 24 and 48 h. (mean ± SD, n=3). * P<0.05 ** P<0.01. **C) ROS generation and D) impairment of ATP production in LQB-118-treated promastigotes.** Promastigotes of *L. braziliensis* were incubated for 48 h in the presence of LQB-118 in Schneider's insect medium plus 10% HIFCS. **A)** ROS generation was quantified using H₂DCFDA. **B)** Cellular ATP concentration was measured by bioluminescence assay. Results are presented as means ± standard error; n=3. *P<0.05; **P<0.01. **E) *In situ* DNA fragmentation of intracellular amastigote.** Infected monolayers of hamsters peritoneal macrophages were treated with the indicated concentrations of LQB118 for 48 h. Monolayers were labeled using TUNEL and observed using fluorescence microscopy. Highlight the cells in 400× magnification. Legend Arrows indicate intracellular amastigotes, N – Macrophage nucleus. doi:10.1371/journal.pone.0109672.g003

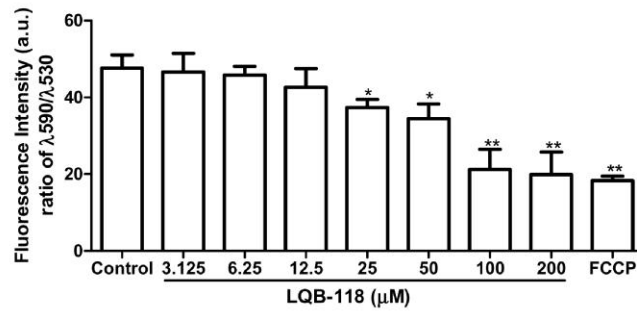


Figure 4. Changes in the ΔΨ_m of macrophage. Peritoneal hamster macrophages (2×10⁶ cells/mL) were cultured in the presence of LQB-118 for 48 h at 37°C/5%CO₂. The cells were incubated for 10 min with JC-1 and analysed fluorometrically. Results are presented as means ± standard error; n=3. *P<0.05; **P<0.01. doi:10.1371/journal.pone.0109672.g004

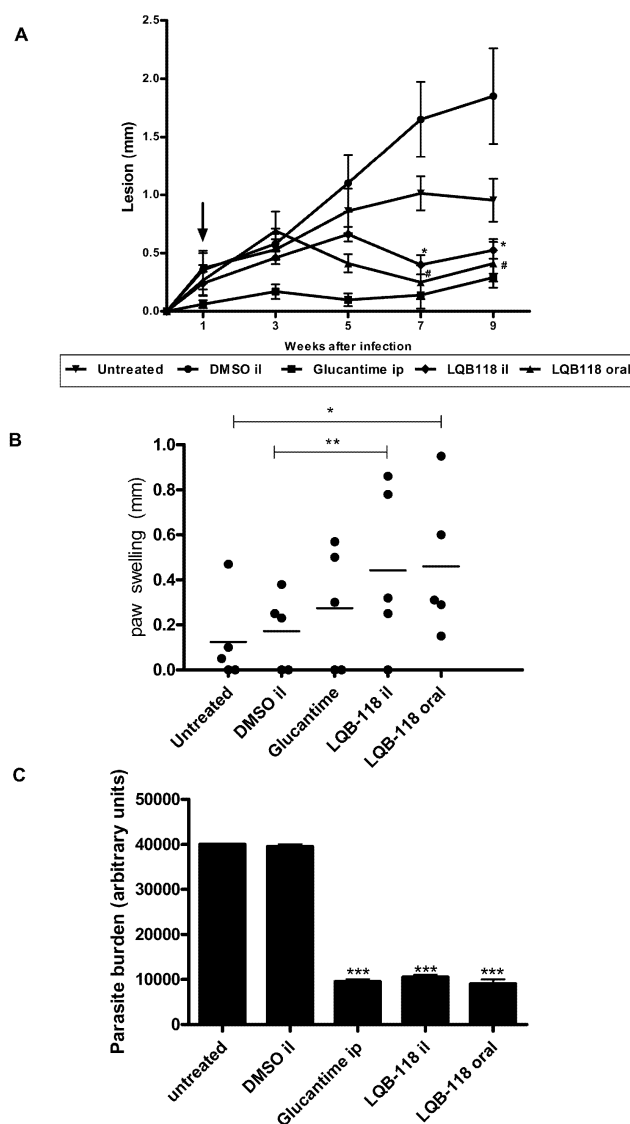


Figure 5. Activity of LQB-118 on golden hamsters infected with *L. braziliensis*. Golden hamsters (5/group) infected with *L. braziliensis* (10^7) were treated on the seventh day of infection with LQB-118 intraslesional (26 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) three times/week or orally (4.3 mg/kg/day) five times/week during eight weeks. Controls were untreated, treated with intraslesional DMSO three times/week or Glucantime five times/week by intraperitoneal route. **A**) Lesion thickness was measured for nine weeks. The arrow indicates the start of treatment. Mean \pm SD, # $P < 0.002$ (in relation to untreated group). * $p < 0.001$ (in relation to intraslesional DMSO group); **B**) Intradermal reaction at *L. braziliensis* antigen was evaluated on the contralateral foot pad on eight week of infection. The swelling was measured 48 h later in the antigen-injected footpads. * $p < 0.04$; ** $p < 0.01$. Each point represents one animal and the horizontal bar indicates the mean. **C**) Parasite burden was assessment by limiting dilution at the end of treatment. *** $p < 0.001$. il, intraslesional/subcutaneous; ip, intraperitoneal. doi:10.1371/journal.pone.0109672.g005

the oral or intralésional routes when compared with the control groups (untreated or DMSO treated, respectively). In the eighth week of the LQB-118 treatments, both the oral and the intralésional routes were significantly effective in controlling the lesion size (Figure 5A) and parasite load (Figure 5C). During this period, we observed no difference between Glucantime and LQB-118 regarding either the lesion size or parasite load (Figure 5A and 5C).

To investigate whether protection promoted by LQB-118 treatment was associated with cellular immune stimulation, the antigen intradermal reaction was assessed. In the eighth week of infection (seventh week of treatment), the animals were challenged with injection of *L. braziliensis* antigen in the contralateral footpad. The intradermal reaction was measured by footpad swelling at 48 h later. As shown in Figure 5B, the LQB-118 locally or orally administered was able to increase intradermal response to antigen.

Discussion

We previously demonstrated that the pterocarpanquinone LQB-118 presents antileishmanial activity against *L. (Leishmania) amazonensis* *in vitro* and *in vivo* using the mouse model [12]. In the present article, we used a hamster model to show that the antileishmanial effect of LQB-118 extends to another subgenus and includes *L. (Viannia) braziliensis*, the most important species causing ATL.

LQB-118 reduced the number of both the promastigote and amastigote intracellular forms of *L. braziliensis* *in vitro*, and this inhibitory effect on parasite growth was irreversible and occurred mainly with 10 and 20 μ M LQB-118. The antimastigote action of LQB-118 was independent of the production of nitric oxide by macrophages. These effects suggest that LQB-118 may be inducing cell death by apoptosis, as previously observed using myeloid leukemia cells, such as those from the multidrug-resistant, K562-Lucena cell line [11]. In the present work, we demonstrated that the LQB-118 treatment of the promastigotes of *L. braziliensis* induces annexin V labeling and intracellular amastigote DNA fragmentation without affecting macrophage DNA. Analysis of the mitochondrial function of LQB-118-treated macrophages showed $\Delta\Psi_m$ reduction occurred at doses much higher than the IC_{50} for intracellular amastigotes. Although annexin labeling is not exclusive to the externalized phosphatidylserine (PS) membrane phospholipids of *Leishmania* [21], we additionally observed promastigote DNA fragmentation (data not shown), ROS generation and ATP production impairment in promastigotes. The increase in ROS production and ATP stocks depletion suggest mitochondrion dysfunction, which could culminate with cell death by apoptosis, as demonstrated by PS exposure and DNA fragmentation. These effects of LQB-118 on *L. braziliensis* are consistent with our recent finding concerning the cell death mechanism of LQB-118 in *L. amazonensis*. LQB-118 kills the promastigote of *L. amazonensis* by apoptosis, which induces ROS production, oxidative stress, depolarization of mitochondrial membrane potential and reduction of ATP [22]. These results suggest LQB-118 induces mitochondrion-dependent apoptosis in *Leishmania* spp. On the other hand, LQB-118-induced apoptosis in tumor cells is believed to involve different routes, depending on the cell type: increasing ROS, intracellular calcium levels and the activity of caspase 9 or 12 [23].

The golden hamster is susceptible to *L. braziliensis* and reproduces the human infection, with progressive swelling and

ulceration at the inoculation site that is followed by dissemination of the parasites [15,16]. The treatment of infected golden hamsters with LQB-118 was administered intralésionally and orally for eight weeks and significantly diminished the lesion size and parasite burden when administered by either means. The LQB-118 treatment was able to promote increased intradermal reaction to *L. braziliensis* antigen suggesting protective immune response. Intradermal reaction skin test (delayed type hypersensitivity) with *Leishmania* antigen is a good marker of cellular immune response in leishmaniasis and predictive of protection [24,25].

The lesion sizes were highly significantly ($p < 0.001$) reduced by the intralésional treatment with LQB-118 in relation to the DMSO control group. DMSO was used to solubilize the LQB-118 doses administered by the intralésional route, but DMSO alone resulted in an increased paw size in relation to that of the untreated control group. Certain pharmacological activities are attributed to DMSO, and because of its anti-inflammatory activity, the use of DMSO has been suggested in several human diseases, including gastrointestinal and dermatologic disorders and brain edema [26]. In mice, intralésional DMSO treatment increased the paw edema induced by zimozan, whereas oral treatment had the opposite effect [27]. Because there was no significant parasitic load difference between the DMSO and untreated control groups, the DMSO most likely only induced paw swelling. Despite the increased paw swelling with the intralésional injection of DMSO, LQB-118 demonstrated a potent therapeutic action even when solubilized in this vehicle. Whether LQB-118 provides any additional anti-inflammatory effect is a question that requires further investigation. We observed no significant difference in effectiveness between the oral and intralésional routes of administration. Although the orally administered LQB-118 was partially solubilized in PBS, it was effective in the control of lesion size and parasite burden in relation to the untreated group ($p < 0.002$ in the seventh week postinfection), showing that pterocarpanquinone is also active by this important route. Likewise, LQB-118 was orally active in controlling lesions in *L. amazonensis*-infected BALB/c mice [12]. Although oral miltefosine has been a breakthrough for leishmaniasis therapy, the drug resistance and reduced sensitivity of the parasite observed in New World species are factors limiting its use against ATL [28]. The development of new antileishmanial molecules that are orally bioavailable is an important strategy in leishmaniasis control [10]. Together, the results of our study showed that the antileishmanial effect of LQB-118 extends to *L. braziliensis* in the hamster model and is related to the induction of apoptotic cell death in the parasites. These data are an important contribution to the preclinical studies of LQB-118, demonstrating the promising therapeutic action of this new molecule on leishmaniasis.

Acknowledgments

We are grateful to Dr. Chaquip Daher Netto at the Federal University of Rio de Janeiro for supporting the synthesis of molecule LQB-118.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LC SAGS. Performed the experiments: LC ROP PMLD SAGS RFS EFCJ. Analyzed the data: LC ROP PMLD ECTS AJMS PRRC SAGS EFCJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: ECTS AJMS PRRC RFS SAGS. Wrote the paper: LC SAGS.

References

- World Health Organization (2010) Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the control of Leishmaniases. Geneva: World Health Organization 949:949.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. WHO Leishmaniasis Control Team. PLoS One 7:e35671.
- Grimaldi G Jr, Tesh RB, McMahon-Pratt D (1989) A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. Am J Trop Med Hyg 41(6):687–725.
- Guerra JA, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI, Gama P, et al. (2011) Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLoS Negl Trop Dis 5: e980.
- Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AG (2008) Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. Acta Trop 105: 1–9.
- Croft SL, Seifert K, Yardley V (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res 123(3):399–410.
- Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, et al. (2006) Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 78(2):210–1.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. Lancet 366:1561–77.
- Ameen M (2010) Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. Clinical and Experimental Dermatology 35: 699–705.
- Pham TTH, Loiseau PM, Barratt G (2013) Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. Int J Pharm 454:539–552.
- Maiá RC, Vasconcelos FC, de Sá Bacelar T, Salustiano EJ, da Silva LF, et al. (2011) LQB-118, a pterocarpanquinone structurally related to lapachol [2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone]: a novel class of agent with high apoptotic effect in chronic myeloid leukemia cells. Invest New Drugs 29(6):1143–55.
- da Cunha-Júnior EF, Pacienza-Lima W, Ribeiro GA, Netto CD, do Canto-Cavaleiro MM, et al. (2011) Effectiveness of the local or oral delivery of the novel naphthopterocarpanquinone LQB-118 against cutaneous leishmaniasis. J Antimicrob Chemother 66:1555–9.
- DeKeyser GK, Lima HC, Tins RG. (1998) Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. Infect Immun 66:827–9.
- Rocha FJ, Schleicher U, Mattner J, Alber G, Bogdan C (2007) Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. Infect Immun 75:3823–3832.
- Sinagra A, Riarie A, Luna C, Campanini A, Segura EL (1997) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: biological behavior in golden hamsters of isolates from Argentine patients. Am J Trop Med Hyg 57(1):115–118.
- Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM (2013) Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. Parasitology 140:771–779.
- Netto CD, Santos ESJ, Castro CP, Silva AJM, Rumjanek VM, et al. (2009) 3(+/-)-3,4-Dihydroxy-8,9-methylenedioxypterocarpan and derivatives: cytotoxic effect on human leukemia cell lines. Eur J Med Chem 44:920–925.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, et al. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. Anal Biochem 126:131–138.
- Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavaleiro MM, Almeida-Amaral EE (2011) Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. PLoS One;6:e14666.
- Reers M, Smiley ST, Mottola-Hartshorn C, Chen A, Lin M, et al. (1995) Mitochondrial membrane potential monitored by JC-1 dye. Methods Enzymol 260:406–417.
- Weingärtner A, Kemmer G, Müller FD, Zampieri RA, Gonzaga dos Santos M, et al. (2012) *Leishmania* Promastigotes Lack Phosphatidylserine but Bind Annexin V upon Permeabilization or Miltefosine Treatment. PLoS One 7:e42070.
- Ribeiro GA, Cunha-Júnior EF, Pinheiro RO, da-Silva SA, Canto-Cavaleiro MM, et al. (2013) LQB-118, an orally active pterocarpanquinone, induces selective oxidative stress and apoptosis in *Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother 68:789–799.
- de Sá Bacelar T, da Silva AJ, Costa PR, Rumjanek VM (2013) The pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in tumor cells through the intrinsic pathway and the endoplasmic reticulum stress pathway. Anticancer Drugs 24:73–83.
- Joshi J, Malla N, Kaur S (2014) A comparative evaluation of efficacy of chemotherapy, immunotherapy and immunochemotherapy in visceral leishmaniasis—an experimental study. Parasitol Int 63: 612–620.
- O'Daly JA, Spinetti HM, Gleason J, Rodriguez MB (2013) Clinical and Immunological Analysis of Cutaneous Leishmaniasis before and after Different Treatments. J Parasitol Res 2013:1–12.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C (2003) Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. Biochem Pharmacol 65:1035–1041.
- Colucci M, Maione F, Bonito MC, Piscopo A, Di Gianuario A, et al. (2008) New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. Pharmacol Res 57: 419–425.
- Singh N, Kumar M, Singh RK (2012) Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med 5:485–497.