



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Rafaella de Miranda Villarim Meira

**Estudo do mecanismo de ação e atividade terapêutica
da naftoquinona LQB-166 na leishmaniose cutânea experimental**

Rio de Janeiro

2019

Rafaella de Miranda Villarim Meira

**Estudo do mecanismo de ação e atividade terapêutica
da naftoquinona LQB-166 na leishmaniose cutânea experimental**

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

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M514 Meira, Rafaella de Miranda Villarim.
Estudo do mecanismo de ação e atividade terapêutica da naftoquinona LQB-166 na leishmaniose cutânea experimental / Rafaella de Miranda Villarim Meira. – 2019.
93 f.

Orientadora: Silvia Amaral Gonçalves da Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Microbiologia.

1. Leishmaniose – Tratamento - Teses. 2. Naftoquinona – Uso terapêutico – Teses. 3. *Leishmania braziliensis* – Teses. 4. Hamsters como animais de laboratório – Teses. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.993.161

Bibliotecária: Kalina Silva CRB7/4377

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

Assinatura

Data

Rafaella de Miranda Villarim Meira

**Estudo do mecanismo de ação e atividade terapêutica
da naftoquinona LQB-166 na leishmaniose cutânea experimental**

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 05 de fevereiro de 2019.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Luciana Silva Rodrigues
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Alda Maria da Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2019

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo amor e apoio incondicional com a carreira que escolhi. Em especial a minha avó Marly, que confiou em mim quando eu mesma não o fazia. Sou grata por tudo que me proporciona.

A todos os meus amigos, que por diversas vezes me ouviram, consolaram, animaram e estimularam sempre a seguir em frente. Tudo é mais fácil quando não se está sozinho.

À minha psicóloga Edna, que me acompanhou nesses anos e me ajudou a enfrentar as dificuldades apresentadas.

Ao meu namorado Felipe, que chegou no final, mas me apoia muito e dá forças para recomeçar nessa nova fase. Obrigada por entender esse momento.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Dra. Silvia Amaral, pela compreensão e apoio em todos os momentos, por não desistir e por não me deixar desistir desse difícil processo de doutoramento. Tenho certeza que não conseguiria chegar até aqui sem sua orientação.

A todo o grupo do Laboratório de Imunofarmacologia Parasitária pela ajuda com os experimentos, companhia e amizade. A todos os professores e técnicos da Disciplina de Parasitologia, que contribuíram imensamente na minha formação.

Agradeço de coração às “Doutorandas Exemplares”, pela preocupação de sempre e por literalmente me buscarem em casa quando eu não conseguia ir ao laboratório. Essa tese não sairia sem vocês.

Ao Dr. Alcides da Silva pela síntese e fornecimento da LQB-166.

Ao Vinícius e equipe do Laboratório de Imunopatologia pela colaboração com os ensaios do kit CBA e citometria de fluxo.

Ao Laboratório de Helminologia Romero Lascasas Porto, em especial os técnicos Matheus e Lila Carolina, pelo processamento e cortes histológicos.

À Dra. Raquel Peralva Ribeiro e Me. Milla Paiva pela análise histopatológica.

À Me. Milla Paiva pelas fotografias das lâminas de histopatologia e edição.

Ao Dr. Elmo Amaral e Dr. Job Inácio pela colaboração nos experimentos de EROs.

Ao Dr. Valter Viana pela revisão do texto.

À Dra. Patrícia Dutra, pela participação na banca examinadora e pelo carinho e amizade que sempre me ofereceu.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Em cada etapa da vida, apostamos naquela realidade e investimos o melhor que podemos.

Soraya Rodrigues de Aragão

RESUMO

MEIRA, Rafaella de Miranda Villarim. *Estudo do mecanismo de ação e atividade terapêutica da naftoquinona LQB-166 na leishmaniose cutânea experimental*. 2019. 93 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

As leishmanioses são doenças negligenciadas que apresentam diversas formas clínicas e são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. No Brasil, a leishmaniose cutânea e mucosa tem como principal agente etiológico a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Os fármacos disponíveis para terapêutica dessas doenças são tóxicos, caros e a resistência do parasito é um problema crescente. Diante desse cenário torna-se necessário expandir as alternativas para tratamento das leishmanioses. Naftoquinonas são moléculas bioativas com atividades antitumorais e antiprotozoários. O objetivo deste trabalho foi avaliar o mecanismo de ação da naftoquinona LQB-166 (3-fenil-lausona) sobre *L. (V.) braziliensis in vitro* e em leishmaniose cutânea em hamsters. A LQB-166 apresentou atividade anti-*Leishmania in vitro* dose e tempo-dependente sobre promastigotas e também atividade sobre amastigotas intracelulares ($IC_{50} = 149 \pm 13 \mu M$), com baixa toxicidade para os macrófagos humanos de linhagem ($CC_{50} = 2194 \pm 74 \mu M$). O tratamento de macrófagos com LQB-166 não induziu o aumento de óxido nítrico, mas aumentou significativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, IFN), anti-inflamatória (IL-10) e também a capacidade fagocítica. *In vivo* a LQB-166 foi capaz de diminuir significativamente a carga parasitária ($p < 0,001$) em hamsters tratados localmente, tanto via subcutânea como via tatuagem. Também mostramos que o Glucantime, fármaco de referência para leishmaniose, é efetivo via tatuagem, indicando que essa via é possível para o tratamento de leishmaniose cutânea experimental. Esses dados mostram que a LQB-166 tem atividade contra *L. (V.) braziliensis in vitro* e *in vivo*, sendo uma molécula promissora para continuação dos estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: Leishmaniose. Tratamento local. Naftoquinona. *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

ABSTRACT

MEIRA, Rafaella de Miranda Villarim. *Study of the mechanism of action and therapeutic activity of naphthoquinone LQB-166 in experimental cutaneous leishmaniasis*. 2019. 93 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

Leishmaniasis are neglected diseases with different clinical outcomes and are caused by protozoa of the genus *Leishmania*. In Brazil, the main agent of cutaneous and mucosal leishmaniasis is *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The current therapeutic arsenals available for these diseases are toxic, expensive and parasite resistance is a growing problem. Given this scenario it is necessary to expand the alternatives for treatment of leishmaniasis. Naphthoquinones are bioactive molecules with antitumor and antiprotozoal activities. The aim of this study was to evaluate the effect of the naphthoquinone LQB-166 (3-phenyl-launone) on *L. (V.) braziliensis in vitro* and in experimental cutaneous leishmaniasis. LQB-166 showed a dose and time-dependent activity *in vitro* on promastigotes and intracellular amastigotes ($IC_{50} = 149 \pm 13 \mu M$) with low toxicity for human macrophages ($CC_{50} = 2194 \pm 74 \mu M$). The treatment of macrophages with LQB-166 did not induce the nitric oxide production, but significantly increased the production of pro-inflammatory cytokines (IL-6, IL-12, IFN), anti-inflammatory (IL-10) and increased its phagocytic capacity. *In vivo* LQB-166 was capable of significantly decrease the parasite load ($p < 0,001$) on golden hamsters treated by subcutaneous route or tattoo device. Moreover, Glucantime, a reference drug for leishmaniasis, was effectively administered by tattoo device. These data show that LQB-166 has activity against *L. (V.) braziliensis in vitro* and *in vivo*, therefore it is a promising molecule to continued preclinical studies.

Keywords: Leishmaniasis. Local treatment. Naphthoquinone. *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 – | Representação esquemática das formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp... | 16 |
| Figura 2 – | Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp..... | 17 |
| Figura 3 – | Classificação taxonômica da família <i>Trypanosomatidae</i> , incluindo os subgêneros e complexos do gênero <i>Leishmania</i> | 19 |
| Figura 4 – | Status da endemicidade de leishmaniose cutânea..... | 20 |
| Figura 5 – | Distribuição de espécies de <i>Leishmania</i> responsáveis pela transmissão da LTA no Brasil – 2005..... | 21 |
| Figura 6 – | Formas clínicas da leishmaniose tegumentar..... | 22 |
| Figura 7 – | Fármacos utilizados do tratamento da leishmaniose..... | 27 |
| Figura 8 – | Translocação de partículas de pigmentos tatuados da pele para linfonodos..... | 29 |
| Figura 9 – | Estrutura química básica de quinonas..... | 30 |
| Figura 10 – | Estrutura química das naftoquinonas lapachol e LQB-166..... | 34 |
| Figura 11 – | Fragmentação de DNA de promastigotas..... | 52 |
| Figura 12 – | Distribuição da tinta na pele..... | 69 |
| Figura 13 – | Imagem histológica da lesão de hamster infectado com <i>L. (V.) braziliensis</i> | 70 |
| Figura 14 – | Imagem histológica da lesão após tratamentos..... | 71 |
| Figura 15 – | Imagem histológica de tecido de animal tratado com Glucantime e não infectado..... | 72 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|--------------|--|----|
| Gráfico 1 – | Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre macrófagos murinos..... | 45 |
| Gráfico 2 – | Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre monócitos humanos.... | 46 |
| Gráfico 3 – | Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre macrófagos humanos.. | 46 |
| Gráfico 4 – | Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares - Índice de Infecção..... | 48 |
| Gráfico 5 – | Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares – Percentual de macrófagos infectados..... | 48 |
| Gráfico 6 – | Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares – número de amastigotas/macrófagos infectados..... | 49 |
| Gráfico 7 – | Avaliação do crescimento de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com a LQB-166 (1° dia)..... | 50 |
| Gráfico 8 – | Avaliação do crescimento de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com a LQB-166 (2° dia)..... | 50 |
| Gráfico 9 – | Avaliação do crescimento de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com a LQB-166 (3° dia)..... | 51 |
| Gráfico 10 – | Avaliação do crescimento de promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com a LQB-166 (4° dia)..... | 51 |
| Gráfico 11 – | Avaliação da produção de EROs em promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> tratadas com a LQB-166..... | 53 |
| Gráfico 12 – | Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166 - Monocamadas de macrófagos THP-1..... | 54 |
| Gráfico 13 – | Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166 - Monocamadas de macrófagos RAW 264.7..... | 55 |
| Gráfico 14 – | Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-6)... | 56 |
| Gráfico 15 – | Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-12). | 56 |
| Gráfico 16 – | Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IFN)... | 57 |
| Gráfico 17 – | Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-10). | 57 |
| Gráfico 18 – | Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166..... | 58 |

| | | |
|--------------|--|----|
| Gráfico 19 – | Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166..... | 59 |
| Gráfico 20 – | Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166..... | 59 |
| Gráfico 21 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 1) - curso da lesão antes e após o tratamento..... | 60 |
| Gráfico 22 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 1) - Carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata..... | 61 |
| Gráfico 23 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 2) - curso da lesão antes e após o tratamento..... | 62 |
| Gráfico 24 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 2) - carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata..... | 62 |
| Gráfico 25 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 2) - dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão..... | 63 |
| Gráfico 26 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - curso da lesão antes e após o tratamento..... | 64 |
| Gráfico 27 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata..... | 65 |
| Gráfico 28 – | QB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - dosagem de nitrito na lesão..... | 65 |
| Gráfico 29 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão..... | 66 |
| Gráfico 30 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - peso dos linfonodos drenantes | 66 |

| | | |
|--------------|---|----|
| Gráfico 31 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - correlação tamanho da lesão X produção de nitrito..... | 67 |
| Gráfico 32 – | Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> (Protocolo 3) - correlação peso dos linfonodos X produção de nitrito..... | 67 |
| Gráfico 33 – | Parâmetros relacionados a infecção analisados por histologia - presença de amastigotas..... | 73 |
| Gráfico 34 – | Escore de parâmetros relacionados a infecção analisados por histologia - infiltrado inflamatório..... | 74 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| CBA | <i>Cytokine Beads Array</i> |
| DMSO | <i>Dimethyl sulfoxide</i> |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| HBSS | <i>Hank's balanced salt solution</i> |
| IFN | Interferon-gama |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL- 4 | Interleucina 4 |
| IL- 6 | Interleucina 6 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-12 | Interleucina 12 |
| iNOS | <i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i> |
| IS | Índice de seletividade |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| LRV | <i>Leishmania</i> RNA vírus |
| LQB | Laboratório de Química Bioorgânica |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| RNA | <i>Ribonucleic Acid</i> |
| RPMI | <i>Meio Roswell Park Memorial Institute</i> |
| Th1 | <i>T helper 1</i> |
| Th2 | <i>T helper 2</i> |
| TGF | <i>Transforming growth fator</i> |
| TLR 3 | <i>Toll like receptor 3</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 15 |
| 1 | OBJETIVOS | 33 |
| 1.1 | Geral | 33 |
| 1.2 | Específicos | 33 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 2.1 | Naftoquinona LQB-166 (3-fenil-lausona) | 34 |
| 2.2 | Parasitas: Obtenção e manutenção | 34 |
| 2.3 | Avaliação da toxicidade da LQB-166 sobre células de mamíferos | 35 |
| 2.3.1 | <u>Toxicidade sobre monócitos humanos de linhagem</u> | 35 |
| 2.3.2 | <u>Toxicidade sobre macrófagos humanos de linhagem</u> | 35 |
| 2.3.3 | <u>Toxicidade sobre macrófagos murinos de linhagem</u> | 36 |
| 2.4 | Atividade da LQB-166 sobre formas amastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> | 36 |
| 2.5 | Atividade da LQB-166 sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> | 37 |
| 2.6 | Detecção <i>in situ</i> da fragmentação do DNA | 37 |
| 2.7 | Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por promastigotas | 38 |
| 2.8 | Avaliação da ação da LQB-166 sobre a ativação de macrófagos | 38 |
| 2.8.1 | <u>Dosagem de óxido nítrico</u> | 39 |
| 2.8.2 | <u>Dosagem de citocinas</u> | 39 |
| 2.8.3 | <u>Fagocitose de microesferas fluorescentes</u> | 40 |
| 2.9 | Atividade terapêutica da LQB-166 em hamsters infectados | 40 |
| 2.9.1 | <u>Considerações éticas</u> | 40 |
| 2.9.2 | <u>Infecção e tratamento de hamsters</u> | 40 |
| 2.9.3 | <u>Quantificação de parasitos por diluição limitante</u> | 42 |
| 2.9.4 | <u>Dosagem de nitrito nas lesões e linfonodos drenantes</u> | 43 |
| 2.9.5 | <u>Análise histopatológica das lesões</u> | 43 |
| 2.10 | Análise estatística | 43 |

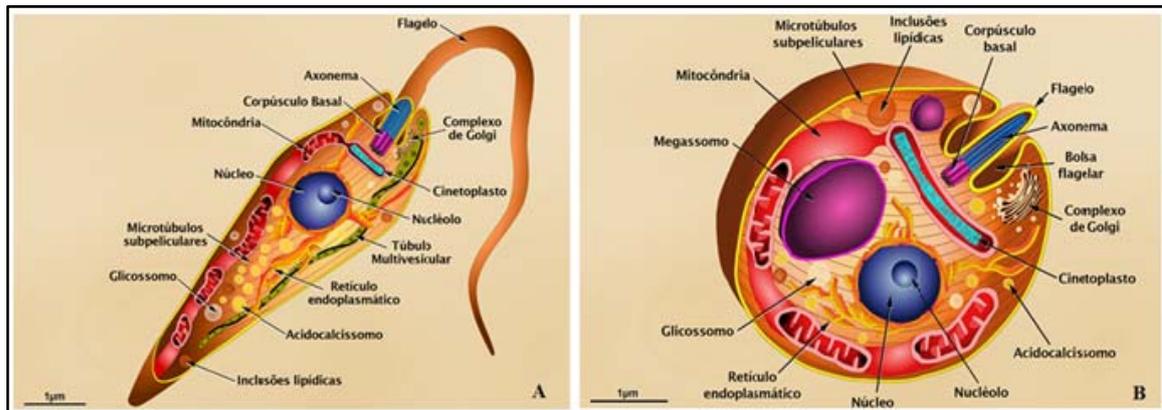
| | | |
|------|---|----|
| 3 | RESULTADOS | 45 |
| 3.1 | Citotoxicidade da LQB-166 sobre células de linhagem murina | 45 |
| 3.2 | Citotoxicidade da LQB-166 sobre células de linhagem humana | 46 |
| 3.3 | Atividade da LQB-166 sobre formas amastigotas intracelulares de <i>L. (V.) braziliensis</i> | 47 |
| 3.4 | Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre o crescimento das formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i> | 49 |
| 3.5 | Fragmentação de DNA de promastigotas tratadas com LQB-166 | 51 |
| 3.6 | Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por promastigotas tratadas com LQB-166 | 53 |
| 3.7 | Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166 | 54 |
| 3.8 | Ativação da produção citocinas por macrófagos tratados | 55 |
| 3.9 | Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos | 58 |
| 3.10 | Atividade terapêutica da LQB-166 em hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> usando vias de administração local | 60 |
| 3.11 | Comparação do padrão de distribuição da tinta de tatuagem usando as vias subcutânea e a tatuagem para administração | 68 |
| 3.12 | Análise histológica das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados localmente | 69 |
| 3.13 | Escore das alterações histológicas das lesões de hamsters infectados com <i>L. (V.) braziliensis</i> e tratados localmente com LQB-166 ou Glucantime | 70 |
| 4 | DISCUSSÃO | 75 |
| | CONCLUSÃO | 82 |
| | REFERÊNCIAS | 83 |

INTRODUÇÃO

Os protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) são pertencentes à família Trypanosomatidae e à ordem Kinetoplastida. Os tripanossomatídeos são protozoários exclusivamente parasitas, possuem um único flagelo e diferentes formas evolutivas ao longo de seu ciclo biológico. Membros da ordem Kinetoplastida tem como característica diferencial a presença de uma estrutura contendo material genético extra genômico, conhecida como cinetoplasto. Esta estrutura está inserida na única e grande mitocôndria da célula, ligada as cristas mitocondriais e é formada pelo DNA mitocondrial (kDNA) (MASLOV et al., 2013; STUART et al., 2008; SUNTER; GULL, 2017; TEIXEIRA et al., 2013;).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresenta duas formas evolutivas distintas: promastigotas e amastigotas. A promastigota caracteriza-se pela forma alongada de cerca de 6 a 8 μm de comprimento, com cinetoplasto anterior ao núcleo, flagelo aparente e livre e encontra-se no trato gastrointestinal do vetor infectado (Figura 1A). As promastigotas apresentam dois estágios morfológicos distintos: promastigota procíclica, com capacidade proliferativa presente no intestino do inseto e promastigota metacíclica, com alta capacidade infectiva e gerada a partir da metaciclogênese das promastigotas procíclicas. As formas metacíclicas são transmitidas ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo do vetor. A forma amastigota está presente no hospedeiro vertebrado, possui forma arredondada ou oval, é intracelular, seu flagelo é rudimentar e encontra-se dentro do corpo celular. Além do cinetoplasto, possui uma estrutura exclusiva, o megassomo, capaz de digerir moléculas ingeridas pelo parasito por endocitose (Figura 1B) (SUNTER; GULL, 2017; TEIXEIRA et al., 2013;).

Figura 1 – Representação esquemática das formas evolutivas da *Leishmania* spp



Legenda: Promastigota (A) e amastigota (B).

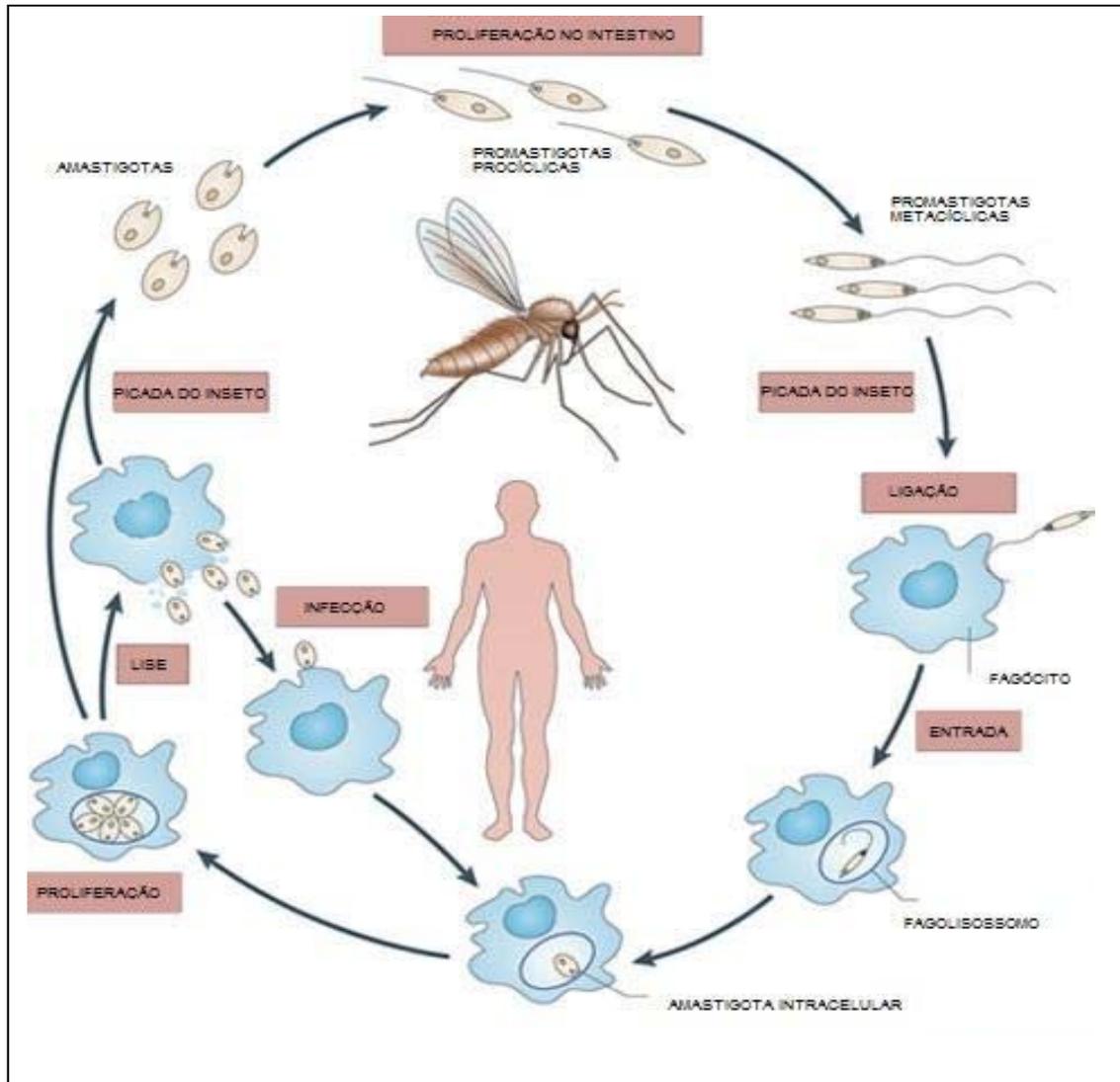
Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas infectadas. Esses insetos pertencem ao gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo – em localidades da Europa, Ásia e África; e ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo – Américas e Oceania. Os principais hospedeiros são animais, silvestres (gambá, lobo guará, preguiça) e domésticos (cão); e o homem (SCORZA et al., 2017; STOCKDALE; NEWTON, 2013).

O ciclo biológico da *Leishmania* (Figura 2) inicia-se quando macrófagos e outras células infectadas são ingeridas pela fêmea do vetor flebotomíneo durante seu repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. No intestino do vetor, as formas amastigotas são liberadas e sofrem alterações morfológicas e bioquímicas, diferenciando-se em promastigotas procíclicas (não-infectantes). Dependendo do subgênero, as promastigotas se aderem ao epitélio intestinal e colonizam o intestino após o piloro ou se aderem a região próxima ao piloro. Os parasitos então se multiplicam e migram para a válvula estomodeal, onde se diferenciam em metacíclicas infectantes, prontas para serem transmitidas. Durante um novo repasto sanguíneo, as promastigotas metacíclicas são regurgitadas no tecido do hospedeiro vertebrado, devido a um entupimento do aparelho bucal do inseto. As promastigotas na derme são internalizadas por fagócitos (células dendríticas, macrófagos e neutrófilos). Uma vez internalizadas, sobrevivem dentro do vacúolo parasitóforo, que funde com o lisossomo formando o fagolisossomo. Dependendo da espécie, o vacúolo parasitóforo exibe características distintas. Dentro do vacúolo as promastigotas se transformam em amastigotas e replicam, eventualmente rompendo a célula infectada devido ao grande número de parasitos. Amastigotas extracelulares são capazes de infectar novos fagócitos locais, levando a uma progressão da infecção. O ciclo de transmissão é completo quando fagócitos

infectados são ingeridos por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo (GEIGER et al., 2016; RITTIG; BOGDAN, 2000; WALKER et al., 2014).

Figura 2 – Ciclo biológico da *Leishmania* spp



Fonte: Adaptado de KAYE; SCOTT, 2011.

Os protozoários do gênero *Leishmania* foram divididos em dois subgêneros, *Leishmania* (SAF’JANOVA, 1982) e *Viannia* (LAISON; SHAW, 1987), classificados de acordo com a localização das promastigotas no intestino do inseto vetor (AKHOUNDI et al., 2016; CUPOLILLO et al., 2000; NEVES; 2005).

Além desses subgêneros, há ainda divisão por complexos (Figura 3), de acordo com as afinidades fenotípicas das espécies, incluindo diferenças morfológicas e bioquímicas, como a densidade de flutuação do DNA nuclear e do cinetoplasto e análise de antígenos em promastigotas. O complexo “*Leishmania braziliensis*” inclui espécies importantes como *L.*

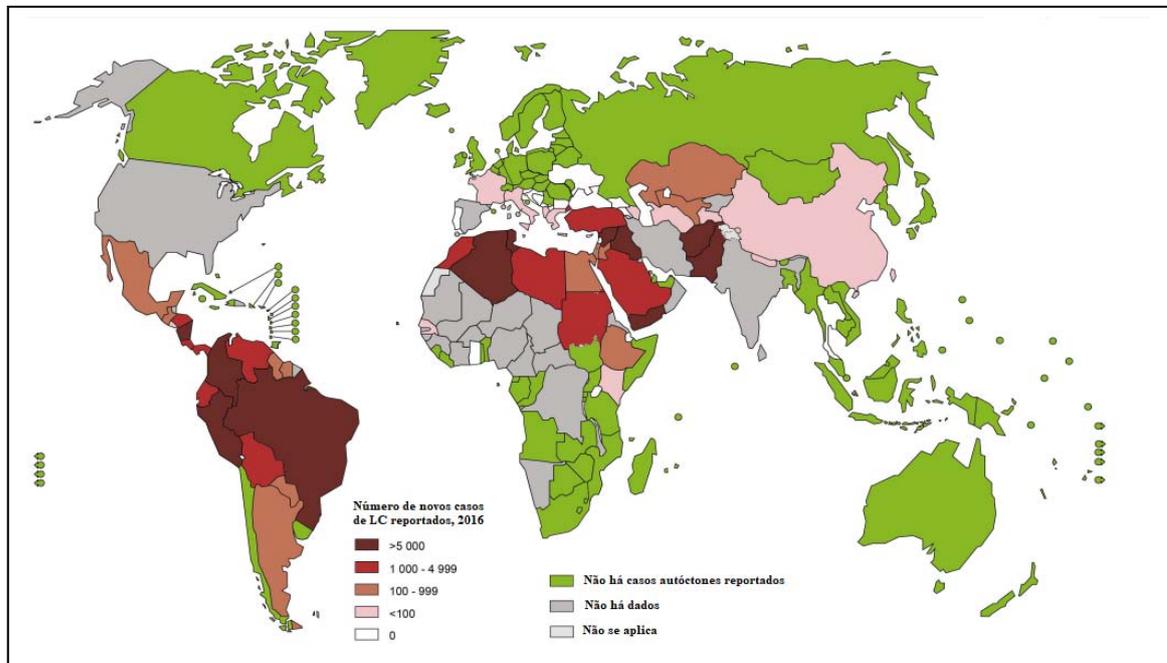
braziliensis, e é encontrado apenas nas Américas. A infecção por parasitos desse complexo é tegumentar e tende a ser disseminada, porém, os parasitos tem a capacidade de fazer metástase, algumas espécies causando formas mais graves da doença, com a degeneração de tecidos mucosos. O complexo “*Leishmania mexicana*” apresenta como espécie importante no Brasil a *L. amazonensis*, que gera lesões na pele e que não apresentam metástases nasofaringianas. Parasitos do complexo “*Leishmania donovani*” como *L. donovani* e *L. infantum* tem um tropismo visceral, principalmente pelo baço e fígado (BATES, 2007; FIOCRUZ, 1997; REY, 2010).

Mais recentemente, uma nova classificação para *Leishmania* foi proposta com base em dados moleculares, que dividem as espécies de *Leishmania* em duas linhagens filogenéticas principais, chamadas de Euleishmania e Paraleishmania. A seção Euleishmania compreende quatro subgêneros: *Leishmania* (*L. donovani*), *Viannia* (*L. braziliensis*), *Sauroleishmania* (*L. tarentolae*) e *L. enriettii* (*L. enriettii*). Já a seção Paraleishmania inclui *L. hertigi*, *L. deanei*, *L. herreri*, *L. equatorensis* e *L. colombiensis*, bem como o ex-gênero *Endotrypanum*. Deste último grupo, apenas *L. colombiensis* foi considerado patogênica para humanos (AKHOUNDI et al., 2016).

Leishmanioses

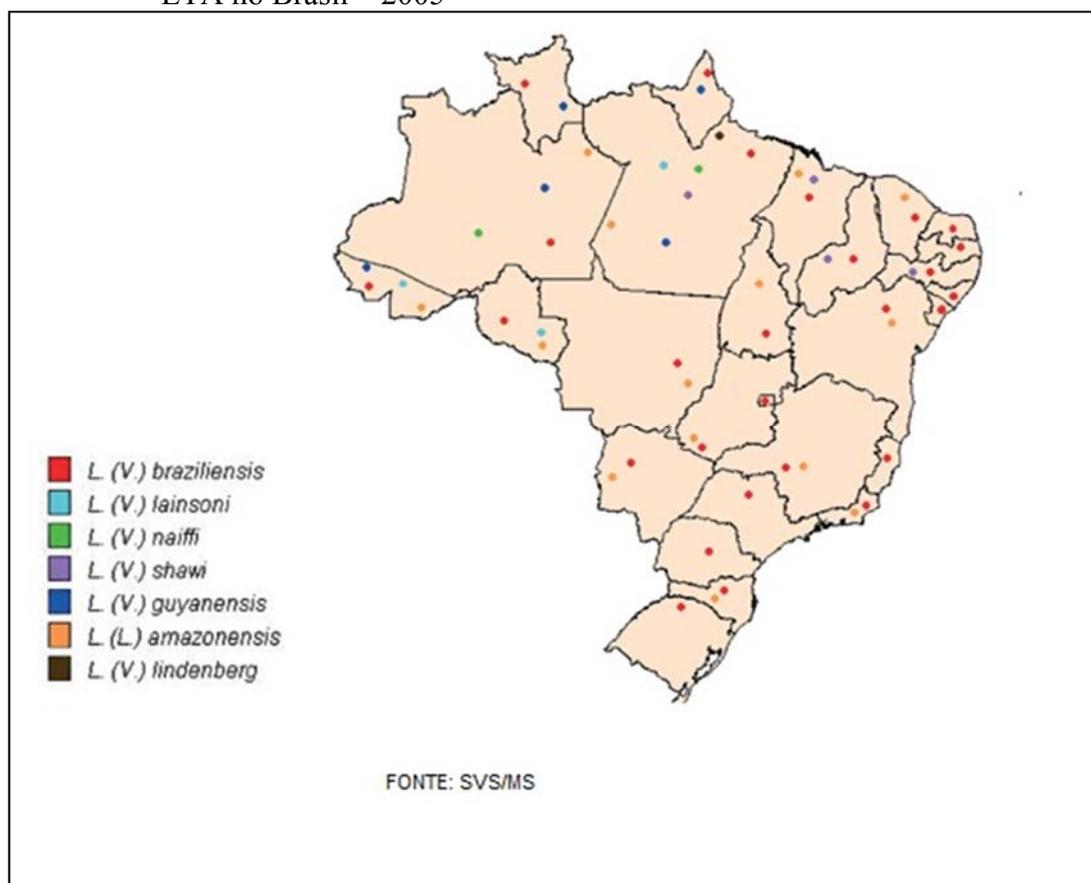
Leishmanioses são um conjunto de doenças tropicais negligenciadas amplamente espalhadas em regiões tropicais e subtropicais (HANDLER et al., 2015). A leishmaniose é endêmica em todos os continentes exceto Austrália e Antártica (Figura 4), e são estimados 200 a 400 mil novos casos de por ano. A maioria dos casos de leishmaniose tegumentar estão no Afeganistão, Colômbia, Brasil, Irã e Peru (ALVAR, 2012, HANDLER et al., 2015, WHO, 2017). No Brasil, a *L. (V.) braziliensis* é a espécie predominante causadora de leishmaniose tegumentar americana (Figura 5) (GOMES-SILVA et al., 2013; REVEIZ, 2013).

Figura 4 – Status da endemicidade de leishmaniose cutânea



Fonte: Adaptado de WHO, 2016.

Figura 5 – Distribuição de espécies de *Leishmania* responsáveis pela transmissão da LTA no Brasil – 2005



Fonte: BRASIL, 2007.

Das mais de 30 espécies do parasito conhecidas, pelo menos 21 delas são capazes de infectarem o homem (DE ARAÚJO et al., 2017). As leishmanioses apresentam múltiplas formas clínicas dependendo principalmente da espécie do parasito e da resposta imune do hospedeiro. As formas principais são a leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose tegumentar (LT), que apresenta diferentes apresentações clínicas (COSTA, 2011; LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006; SUNTER; GULL, 2017).

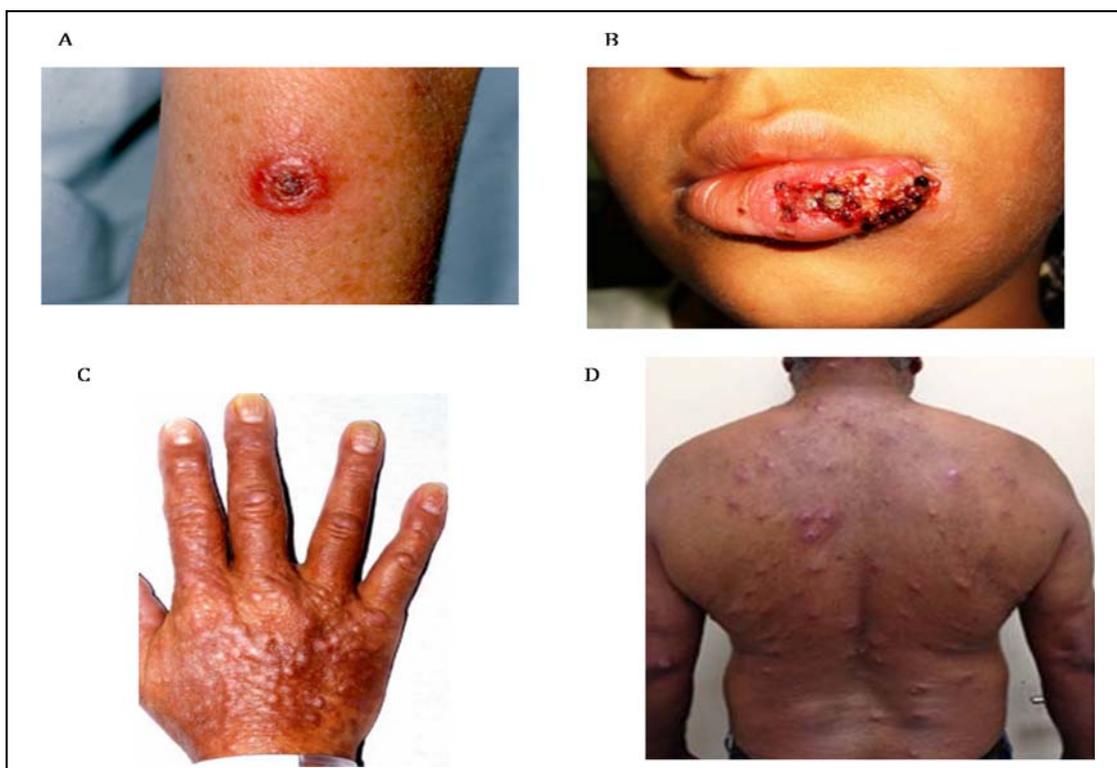
Na LV, também chamada de Calazar, os parasitos apresentam tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfoides, causando quadros de esplenomegalia e hepatomegalia. A LV representa a forma mais grave da doença, causa imunossupressão facilitando outras infecções e se não tratada leva o indivíduo ao óbito. Esta doença na América do Sul e países mediterrâneos acomete em sua maioria crianças, faixa etária na qual a doença é mais grave (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013; REY, 2010).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode se apresentar formas clínicas distintas, entre elas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose

cutâneo-difusa (LCD) e leishmaniose cutânea disseminada (LD) (COSTA, 2011; LIPOLDOVÁ; DEMANT, 2006).

A LC (Figura 6A) produz exclusivamente lesões cutâneas geralmente limitadas ao local da picada do flebotômíneo e que em alguns casos se cura espontaneamente; a LM (Figura 6B), também chamada mucocutânea, apresenta lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e laringe e pode ser precedida pela LC. Nesse caso o parasito faz metástase para a região oro-nasal. Uma das formas mais raras é a LCD (Figura 6C) que produz com múltiplas lesões não-ulcerosas distribuídas pelo tegumento. A LD (Figura 6D) é caracterizada por múltiplas lesões papulares de aparência acneiforme presentes em diversos segmentos corporais. As principais espécies causadoras da LTA são *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. pifanoi*, *L. naiffii* e *L. shaw* (BRASIL, 2007; COSTA, 2011; REY, 2010). A *L. braziliensis* é responsável pela maioria dos casos de LTA e tem uma grande distribuição nas Américas (HANDLER et al., 2015).

Figura 6 – Formas clínicas da leishmaniose tegumentar



Legenda: Leishmaniose cutânea (A), leishmaniose mucosa (B), leishmaniose cutâneo-difusa (C) e leishmaniose disseminada (D)

Fonte: VERNAL et al., 2015; HANDLER et al., 2015.

Imunopatogênese da infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A infecção por *L. (V.) braziliensis* está associada a formas clínicas diferentes, como a LC, LM e LD. Lesões cutâneas ocorrem no local de inoculação do parasito pela picada do inseto vetor, gerando uma reação inflamatória que posteriormente forma uma ulceração, podendo ser rasa ou profunda. A LM não apresenta cura espontânea e pode causar complicações crônicas graves, incluindo destruição ulcerativa do nariz, boca, faringe, laringe e até desfiguração facial com comprometimento das funções respiratórias (BACELLAR et al., 2011; REY, 2010)

A *L. (V.) braziliensis* nem sempre apresenta a mesma virulência; além de diferenças na ecologia das cepas do parasito, características genéticas e regulação imunológica do hospedeiro contribuem para a diversidade de quadros clínicos (BACELLAR et al., 2011).

Na infecção, os parasitos têm acesso ao hospedeiro vertebrado encontrando primeiramente células do sistema fagocítico mononuclear como neutrófilos, monócitos e macrófagos. Posteriormente, há replicação no interior da célula, o que leva à progressão da infecção e também ao desenvolvimento de uma resposta imune celular, envolvendo células T ativadas. Tanto macrófagos como células T podem produzir, pelo estímulo da infecção, diferentes padrões de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1, IL-12) e anti-inflamatórias (IL-10) (GOLLOB et al., 2014).

Citocinas são mediadores da sinalização celular que afetam diretamente a função e diferenciação celular, determinando subpopulações de macrófagos (M1/M2) e linfócitos (Th1/Th2). Um perfil de resposta Th1, induzido por citocinas pró-inflamatórias confere resistência a infecção enquanto um perfil Th2, com citocina como IL-4, IL10 e TGF-beta levam a uma maior susceptibilidade à *Leishmania* spp. (CECÍLIO et al., 2014).

Indivíduos infectados com *L. (V.) braziliensis* produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ e TNF- α , esse perfil de resposta tipo 1 é observada em todas as formas clínicas da infecção por essa espécie do parasito e, apesar de ajudar a controlar a multiplicação do parasito, contribui para o desenvolvimento da lesão (MACHADO et al., 2004).

Um dos fatores de virulência da *L. (V.) braziliensis* está associado a presença de um vírus de RNA inserido no seu genoma, o LRV-1, comum a espécies do subgênero *Viannia*. As espécies desse subgênero tendem a realizar metástase e gerar lesões graves na região oronasal dos indivíduos infectados (HANDLER et al., 2015; ZANGGER et al., 2013). Os vírus de

RNA estão relacionados a essa manifestação clínica mais grave pois estimulam a produção da citocina pró-inflamatória IFN beta, através da interação com o TLR 3 endossomal. Com isso, há uma polarização para resposta imune do tipo 1, levando a inflamação crônica e maior potencial de metastase (GRYBCHUK et al., 2018). Além disso, são importantes para completarem com sucesso seu ciclo biológico do parasito, já que há um aumento da sua disseminação e persistência na célula hospedeira, o que aumenta as chances de o parasito ser ingerido pelo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (MÁRQUEZ; ROOSSINCK, 2012).

Modelos experimentais para leishmaniose tegumentar causada por *L. (V.) braziliensis*

Na leishmaniose experimental, modelos murinos representam uma valiosa ferramenta no estudo de mecanismos relacionados com a patogênese e desenvolvimento da doença. Porém a maioria das linhagens incluindo C57BL/6 e BALB/c são resistentes a infecção por parasitos do subgênero *Viannia*, em especial a *L. (V.) braziliensis*. Esses animais desenvolvem lesões pequenas e não ulceradas que curam espontaneamente em semanas, o que dificulta estudos de longo prazo como os de novos quimioterápicos (DE ARAÚJO et al., 2014; DE KREY et al., 1998; GOMES-SILVA et al., 2013; PASSERO et al., 2011; SILVA-COUTO et al., 2015).

O hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) é amplamente usado como modelo para leishmaniose visceral e altamente susceptível a infecção por espécies de *Leishmania* dermatrópicas incluindo a *L. (V.) braziliensis*, desenvolvendo lesões cutâneas similares às úlceras da leishmaniose tegumentar humana. A resposta imune desses animais também se assemelha à humana, por isso o hamster é um modelo experimental apropriado para estudos sobre imunopatogênese, vacinas e quimioterapia de leishmanioses (GARG; DUBE, 2006; GOMES-SILVA et al., 2013; SILVA-COUTO et al., 2015). Além disso, hamsters possuem uma genética *outbreed*, por isso é esperado que características individuais de cada animal influenciem os diferentes resultados clínicos da doença, mimetizando assim a clínica e a resposta imune da infecção humana (GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014; SILVA-COUTO et al., 2015).

Opções terapêuticas para leishmaniose tegumentar americana (LTA)

Dependendo da gravidade da forma clínica, a LTA pode ser uma doença autolimitada, porém pacientes buscam tratamento devido à demora na cura espontânea e razões estéticas, como cicatrizes que desfiguram a face. As leishmanioses tegumentares, de maneira geral, não causam mortalidade porém alta morbidade (MASHTAQ et al., 2016).

O tratamento da LTA teve início em 1912, quando o brasileiro Gaspar Vianna propôs o uso de tártaro emético, um antimônio trivalente, para tratar a doença. Porém devido à sua alta toxicidade o tratamento foi substituído pelo uso de antimoniais pentavalentes, que são menos tóxicos que os trivalentes em células de mamíferos (ROBERTS et al., 1998). Os medicamentos de primeira escolha para tratar a leishmaniose no Novo Mundo são o antimoniato de metilglucamina (Glucantime) e o estibogluconato de sódio (Pentostam) (ALMEIDA; SANTOS 2011; SINGH; SUNDAR, 2014).

Os antimoniais pentavalentes apresentam alta toxicidade e longo período de administração parenteral, o que contribui para que os pacientes abandonem o tratamento (PHAM et al., 2013). Além disso, há relatos crescentes de resistência de diferentes espécies de *Leishmania* a esses compostos (MUKHERJEE et al., 2015; PIMENTEL et al., 2011; ROJAS et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2017). Quando não há resposta terapêutica aos antimoniais, são usados medicamentos de segunda escolha, que são principalmente as diferentes formulações de anfotericina B, a pentamidina e a miltefosina no Velho Mundo (Tabela 1).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que interferem no balanço iônico e causam a morte do parasito. É altamente tóxica nas doses terapêuticas e necessita internação hospitalar para sua administração. Mostra-se eficaz na LTA cutânea e mucosa (FREITAS-JÚNIOR, 2012; OURIVES-NEVES et al., 2011). Na Europa, os pacientes tratados com anfotericina B lipossomal apresentam um alto percentual de cura, diminuindo o tempo de internação hospitalar e compensando o alto custo do medicamento. Embora as formas lipossomais do antibiótico reduzam os efeitos adversos e o tempo de tratamento, seu custo é elevado. Portanto acaba sendo inviável seu uso em países em desenvolvimento, além de não ser estável em altas temperaturas (BALASEGARAM et al., 2012; MURRAY et al., 2005; TIUMAN et al., 2011).

A pentamidina é um derivado sintético da amidina, eficaz contra um grande número de protozoários patogênicos, incluindo espécies de *Leishmania* spp, por serem capazes de comprometer o metabolismo energético dos parasitos. As principais reações adversas relacionadas a esse medicamento são dor, náuseas, vômitos, tontura, cefaleia, hipotensão, hipoglicemia e hiperglicemia transitórias (OURIVES-NEVES et al., 2011). Pode ser usada como fármaco de segunda escolha em pacientes infectados com parasitos resistentes a antimoniais. A pentamidina permanece acumulada na mitocôndria, e sua interferência se dá sobre o DNA, provavelmente alterando a morfologia do cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial, levando o parasito à morte (FREITAS-JÚNIOR et al., 2012; SOTO et al., 2016).

A miltefosina está entre as mais novas opções de tratamento e é o único fármaco administrado por via oral. Foi usada primeiramente como um agente antitumoral e depois mostrou ter eficácia na leishmaniose e tem sido utilizada como medicamento de primeira escolha na Índia. Apresenta como efeitos secundários náuseas, vômito, diarreia e pode ser teratogênica (VELEZ et al., 2010; FDA, 2014). Atua sobre o metabolismo lipídico do parasito, causando morte por apoptose (WADHONE et al., 2009). No Brasil, a miltefosina foi aprovada pelo Ministério da Agricultura para uso na forma do medicamento Milteforan como tratamento de cães infectados com leishmaniose visceral (NOTA TÉCNICA Nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA).

A paramomicina é o único aminoglicosídeo com importância clínica contra leishmaniose, porém sua baixa absorção oral levou ao desenvolvimento de formulações tópicas para tratar a leishmaniose tegumentar (ANDREWS et al., 2014; TIUMAN et al., 2011). Este antibiótico interfere com o potencial da membrana da mitocôndria, inibe a síntese de proteínas e leva a disfunção respiratória, alterando a fluidez da membrana e o metabolismo de lipídeos do parasito (HENDRICKX et al., 2012; JHINGRAN et al., 2009).

Embora existam algumas opções, elas ainda são limitadas pela toxicidade, custo elevado e eficácia variável. Sendo assim, tratamentos alternativos têm sido explorados (ANDRADE-NETO et al., 2018; MASHTAQ et al., 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017).

A Figura 7 apresenta os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose.

Figura 7 – Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose

| FÁRMACOS | ALVO TERAPÊUTICO | VIA DE ADMINISTRAÇÃO | DOSAGEM | LIMITAÇÕES |
|---------------------------|---|---|--|---|
| Antimoniais pentavalentes | <ul style="list-style-type: none"> DNA do parasito Tripanotionia redutase | <ul style="list-style-type: none"> Intravenosa Intramuscular Intralesional | <ul style="list-style-type: none"> 20 mg/kg/dia 28 a 30 dias | <ul style="list-style-type: none"> Cardiotoxicidade Pancreatite Nefrotoxicidade Hepatotoxicidade Resistência |
| Anfotericina B | <ul style="list-style-type: none"> Ergosterol da membrana | <ul style="list-style-type: none"> Intravenosa | <ul style="list-style-type: none"> 0,75-1 mg/kg/dia 15-20 dias | <ul style="list-style-type: none"> Nefrotoxicidade Hipocalemia Febre alta |
| Anfotericina B lipossomal | <ul style="list-style-type: none"> Ergosterol da membrana | <ul style="list-style-type: none"> Intravenosa | <ul style="list-style-type: none"> 10-30 mg/kg (dose única) 5 mg/kg/dose (3 doses) | <ul style="list-style-type: none"> Nefrotoxicidade Alto custo |
| Miltefosina | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo lipídico Apoptose | <ul style="list-style-type: none"> Oral | <ul style="list-style-type: none"> 100-150 mg/dia 28 dias | <ul style="list-style-type: none"> Vômitos e diarreia Hepatotoxicidade Nefrotoxicidade Teratogenicidade |
| Pentamidina | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo energético Mitocôndria | <ul style="list-style-type: none"> Intramuscular | <ul style="list-style-type: none"> 3 mg/kg/dia 4 dias | <ul style="list-style-type: none"> Dano pancreático Hipotensão Taquicardia |
| Paramomicina | <ul style="list-style-type: none"> Metabolismo lipídico Fluidez da membrana | <ul style="list-style-type: none"> Intramuscular para LV Tópico para LC | <ul style="list-style-type: none"> 15 mg/dia (21 dias) 20 mg/kg (17 dias) | <ul style="list-style-type: none"> Neurotoxicidade Ototoxicidade Hepatotoxicidade |

Fonte: Adaptado de MENEZES et al., 2015.

Tratamentos por via intralesional

A introdução de princípios ativos na pele ainda é desafiadora, devido a proteção córnea da epiderme, e medicamentos de uso tópico têm penetração variável de acordo com sua formulação (ARBACHE; GODOY, 2013).

O uso de antimoniais por via intralesional oferece benefícios por reduzir a toxicidade em relação a administração sistêmica, além de apresentar menor custo e uma resposta mais rápida ao tratamento (HANDLER et al., 2015). Estudos realizados ao longo dos anos, mostram que a via intralesional para o tratamento da leishmaniose cutânea é uma alternativa eficaz. Faris et al. (1993) mostraram que mais de 70% dos pacientes com leishmaniose cutânea e tratados com 8 injeções (0,5 a 1 ml) de estibogluconato de sódio (Pentostam) na Arábia Saudita tiveram suas lesões cicatrizadas completamente em menos de um mês. Um estudo na Bolívia mostrou também que 70% dos pacientes tratados foram curados após três administrações intralesionais com Glucantime em dias alternados (SOTO et al., 2013). Um trabalho realizado no Brasil também mostrou as vantagens e a eficácia dessa via de administração. Em Belo Horizonte, Minas Gerais, pacientes com leishmaniose cutânea apresentaram a lesão completamente curada após em média três injeções de Glucantime ao longo de doze semanas (DA SILVA et al., 2016).

Além dos antimoniais, também já foi demonstrada a eficácia da via intralesional para outros fármacos. Dois trabalhos mostraram a eficácia do tratamento com anfotericina B por

via intralesional na Índia e no Irã. Na Índia, pacientes com leishmaniose cutânea foram tratados por 10 semanas consecutivas e resultou em diminuição da lesão e cicatrizando a ulcera (MASHTAQ et al., 2016). No Irã, um paciente com leishmaniose ocular também foi submetido a esse tipo de tratamento. As injeções (1x/semana) foram administradas por 6 semanas consecutivas e a lesão foi curada, com mínimos efeitos colaterais locais, tais como leve incômodo e queimação (NIKANDISH, 2016).

Em um estudo na Bolívia, comparou-se a pentamidina e o Glucantime administrados por via intralesional em pacientes infectados com *L. (V.) braziliensis* que apresentavam lesão única. O resultado mostrou maior percentual de cura nos indivíduos tratados com pentamidina do que no tratamento com antimonial (72% e 57%, respectivamente). Além disso, a pentamidina administrada localmente causou menos irritação e dor que o antimonial, mostrando-se uma nova alternativa de administração do fármaco para este tipo de lesão (SOTO et al., 2016).

Embora o tratamento intralesional seja um método eficaz, essa via de administração apresenta algumas limitações. Por exemplo, a distribuição do medicamento é irregular na derme e a aplicação em microdoses é difícil quando são tratadas áreas extensas. Uma outra dificuldade é uniformizar a quantidade e a profundidade da aplicação do princípio ativo e há dificuldade em infiltrar lesões muito superficiais (ARBACHE; GODOY, 2013).

Tatuagem como via de inoculação de substâncias

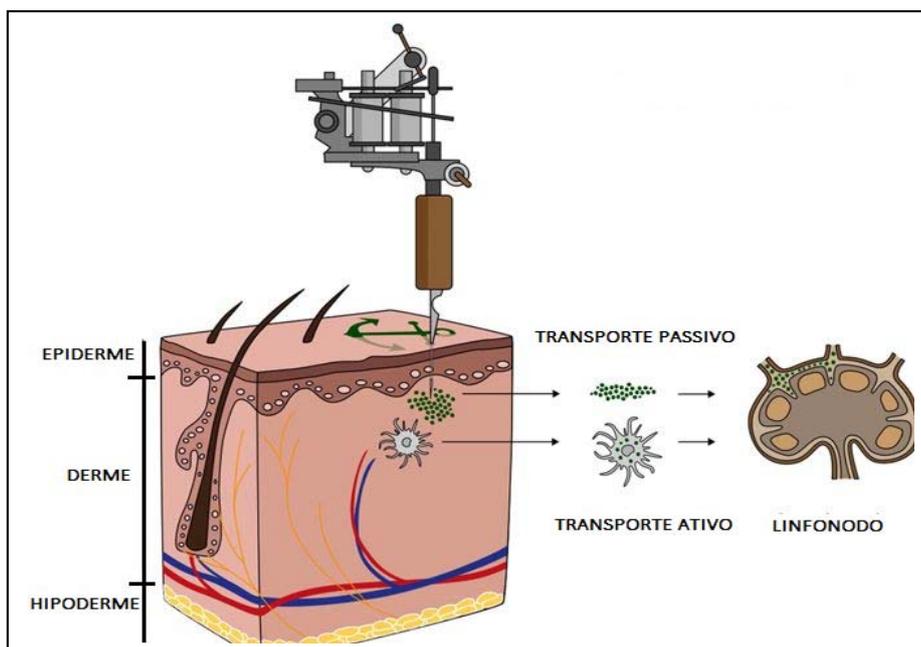
A tatuagem é um processo invasivo, que envolve vibração de uma agulha perfurando repetidamente a pele, lesionando tanto a epiderme quanto a derme. A cura dessa lesão é um processo altamente coordenado e iniciado instantaneamente por uma inflamação aguda envolvendo hemorragia, edema e necrose, seguido por restauração da integridade do tecido. A tatuagem resulta em um trauma observado após 12h do procedimento, na pele e linfonodos regionais, que é significativamente reduzido após 14 dias (GOPEE et al., 2005; SATO et al., 1999). Os riscos associados ao processo de tatuagem, tais como infecções bacterianas e virais e reações de hipersensibilidade, estão comumente relacionadas à composição do pigmento tatuado e não ao processo da tatuagem em si (GOPEE et al., 2005; SOWDEM et al., 1991).

Equipamentos de tatuagem adaptados têm sido usados na pesquisa médica para a inoculação de diversos materiais na pele para diferentes propósitos. Reuter et al. (2001)

testaram diferentes técnicas para induzir papilomas em coelhos, e a inoculação do vírus via tatuagem se mostrou mais efetiva do que via injeção intradérmica. Estudos com vacinas de DNA são cada vez mais comuns, e entre as técnicas de inoculação de plasmídeo está a tatuagem. Diversos estudos mostram que quando o plasmídeo é injetado via tatuagem, a imunização é mais bem sucedida em modelos animais (CHIU et al., 2012; KINNEAR et al., 2015; WAGEMAKERS et al., 2014; VAN DEN BERG et al., 2014).

Como a tatuagem abrange uma extensão muito maior de pele que a injeção intradérmica (POKORNA et al., 2008), oferece vantagem em potencialmente tratar uma maior área, apesar de ser administrado um menor volume. Além disso, há evidências de pigmento nos linfonodos pós tatuagem, o que estenderia o tratamento local (FRIEDMAN et al., 2003; PARIHAR et al., 2016; ZIRKIN et al., 2001). As partículas de pigmento podem ser transportadas via sangue e linfa ou fagocitadas por células do sistema imune e depositadas nos linfonodos drenantes (Figura 8) (SCHREIVER et al., 2017).

Figura 8 – Translocação de partículas de pigmentos tatuados da pele para linfonodos



Fonte: Adaptado de SCHREIVER et al., 2017.

Gopee et al. (2005) mostraram que o modelo murino pode ser usado para mimetizar o processo de tatuagem em humanos, devido ao trauma e recuperação tanto em camundongos como em humanos se dar por processos similares. Além disso, em ambos o pigmento permanece na pele e linfonodos drenantes.

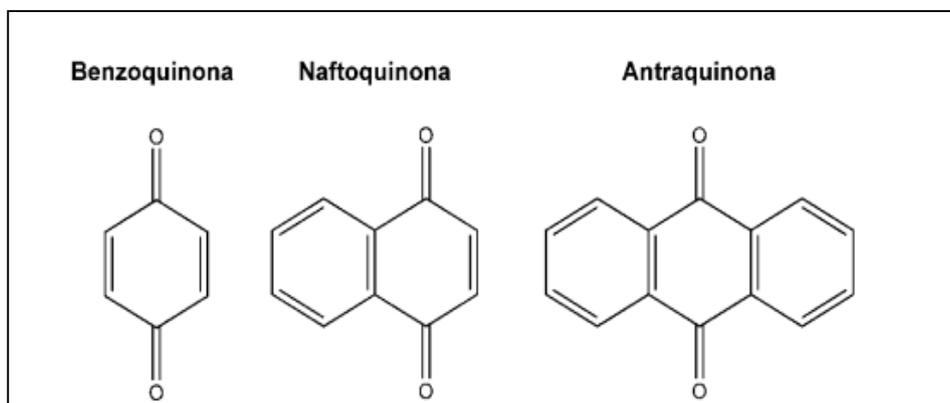
O processo de tatuagem já foi testado para tratar doenças dermatológicas. A administração de bleomicina para tratamento de cicatrizes hipertróficas e queloides via tatuagem foi mais eficaz que o tratamento recomendado (crioterapia e injeções de triancinolona), pois foi capaz de atingir áreas maiores e assim, reduzir o tamanho de grandes queloides e cicatrizes (NAIENI et al., 2006). Em 2013, Arbache e Godoy afirmam que a tatuagem é um procedimento que permeia princípios ativos da pele de forma eficaz, precisa e racional, a custo acessível.

A tatuagem como possível via de administração de fármacos para leishmaniose cutânea foi apresentada por Shio et al. (2014). Camundongos infectados com *L. major* foram tratados com o composto OIPC na forma lipossomal, após a lesão estabelecida, usando de um aparelho de tatuagem, que resultou na cicatrização da lesão cutânea 4 semanas após o tratamento de 10 dias (2 x 5 dias). Essa nova via de administração foi comparada às vias intraperitoneal e tópica, sendo a mais efetiva na cura da lesão, restabelecendo a integridade da pele do animal infectado.

Naftoquinonas como alternativa terapêutica para leishmaniose

As quinonas são dienonas cíclicas conjugadas, sendo classificadas de acordo com o tipo de sistema aromático em benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas (Figura 9) (SELVA, 2010).

Figura 9 – Estrutura química básica de quinonas



Fonte: SELVA, 2010.

Compostos que contêm uma quinona em sua estrutura comumente apresentam atividade biológica, pois são capazes de interferir com as enzimas topoisomerasas, essenciais

para a replicação do DNA celular. Além disso, seu ciclo redox está associado a toxicidade dessas moléculas (FERREIRA et al., 2010).

Durante seu ciclo redox, as quinonas são reduzidas a semiquinonas ou hidroxiquinonas, e o oxigênio na presença dessas substâncias é reduzido a superóxido, o que ativa uma cascata de reações para geração de peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, as EROs (Espécies reativas de oxigênio) (ENSAFI et al., 2016).

Naftoquinonas são moléculas encontradas em diferentes espécies de plantas, como do gênero *Tabebuia* sp. Apesar da sua origem natural, essas moléculas podem ser facilmente sintetizadas e aprimoradas, tendo sua estrutura alterada a fim de melhorar seu potencial farmacológico (DE ARAÚJO et al., 2017).

As naftoquinonas sintéticas atovaquona e burpavaquona apresentam atividade *in vitro* sobre formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (CAUCHETIER et al., 2000; CROFT et al., 1992; JERNINGAN et al., 1996). A formulação lipossomal da buparvaquona apresentou uma alta atividade anti-parasitária *in vivo* em hamsters infectados com *L. chagasi* (REIMÃO et al., 2012).

A naftoquinona diospirina, isolada de *Diospyros montana*, mostrou atividade contra *L. donovani* *in vitro* e *in vivo*, reduzindo em até 38% a carga parasitária do fígado de camundongos BALB/c infectados (HAZRA et al., 2013). Bis-lausonas análogas a bis-2-hidroxi-1,4-naftoquinona se mostraram eficazes contra *L. (V.) braziliensis* *in vitro* e *L. (L.) amazonensis* *in vitro* e *in vivo*, diminuindo o tamanho da lesão de camundongos BALB/c infectados na orelha (DE ARAÚJO et al., 2014).

O lapachol é uma naftoquinona natural que apresenta vários análogos sintéticos e semi-sintéticos descritos na literatura com várias atividades biológicas. Derivados do lapachol, isolapachol e acetato de isolapachol, se mostraram mais eficazes do que a molécula original sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, sendo o acetato de isolapachol ativo *in vivo*, diminuindo o tamanho da lesão em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* (LIMA et al., 2004). Outro derivado do lapachol, o β -lapachona, mostrou um efeito nos helmintos da espécie *Schistosoma mansoni*. Essa naftoquinona foi capaz de alterar a motilidade e causar danos na superfície da membrana do verme adulto (AIRES et al., 2014).

O estudo do lapachol e seus derivados sintéticos tem sido proposto como alvo potencial à pesquisa de novas terapias antiparasitárias (BARBOSA et al., 2014; LIMA et al., 2004; ROCHA et al., 2013). A LQB-166 (3-fenil-lausona) é uma naftoquinona análoga ao

lapachol, sintetizada através da reação de Suzuki-Miyaura, na qual foi adicionado um grupamento benzeno no lugar da unidade isoprenóide da molécula (GOMES et al., 2017).

Em trabalho anterior do grupo, também verificamos a atividade leishmanicida do lapachol e diferentes análogos sintéticos *in vitro* tanto sobre formas promastigotas como amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* (MEIRA, 2012). Em continuação a esse estudo, o análogo sintético do lapachol LQB-166 (3-fenil-lausona) apresentou atividade *in vivo* em camundongos BALB/c e hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* quando tratados via intralesional após o estabelecimento da lesão (MEIRA, 2014.) Mais recentemente, a LQB-166 foi testada também em *L. (L.) amazonensis in vitro*, apresentando atividade tanto em formas promastigotas como amastigotas intracelulares (GOMES et al., 2017).

A LQB-166 se mostra como um potencial candidato a fármaco contra leishmaniose, e por isso o presente estudo avalia sua atividade, utilizando vias locais de administração.

Sendo assim, este trabalho propôs aprofundar os estudos sobre a atividade da LQB-166 sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis*, investigar o seu mecanismo de ação tanto sobre o parasito como sobre a célula hospedeira, bem como testar seu potencial terapêutico em hamsters infectados usando duas vias de administração local.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivos Gerais

Investigar o mecanismo de ação *in vitro* da LQB-166 e avaliar sua ação terapêutica em hamsters infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

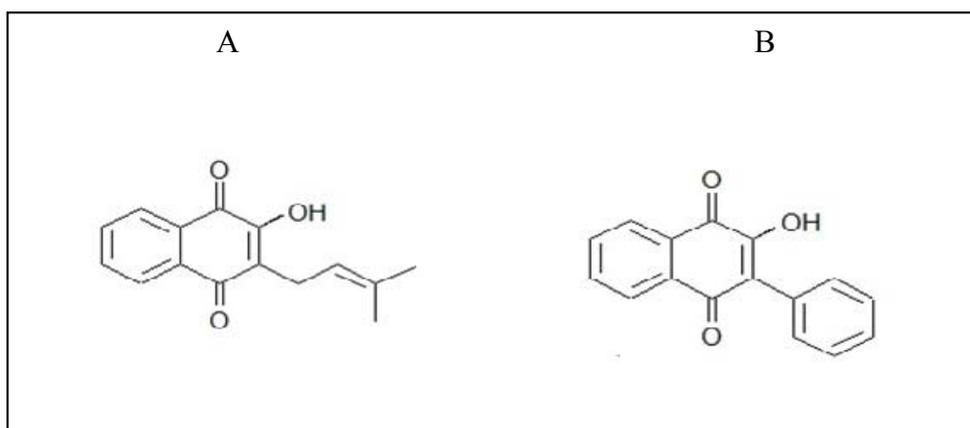
- a) investigar o mecanismo de ação da LQB-166 sobre as formas promastigotas;
- b) analisar o efeito imunomodulador em macrófagos;
- c) determinar a atividade terapêutica em hamsters infectados, usando vias locais de administração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Naftoquinona LQB-166 (3-fenil-lausona)

Análoga ao lapachol (Figura 10A), a naftoquinona sintética LQB-166 (3-fenil-lausona) (Figura 10B), foi objeto de estudo deste trabalho. A síntese foi realizada pela adição de um grupamento benzeno no lugar da unidade isoprenóide na molécula do lapachol, através de reação de Suzuki-Miyaura (GOMES et al., 2017) pelos grupos do Dr. Alcides José Monteiro da Silva no Laboratório de Catálise Orgânica e Dr. Paulo Roberto Ribeiro Costa no Laboratório de Química Bioorgânica, do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais, na UFRJ.

Figura 10 – Estrutura química das naftoquinonas lapachol e LQB-166



Legenda: Lapachol (A) e LQB-166 (B)
Fonte: A autora, 2019.

I

A substância seca em rotavapor foi solubilizada em DMSO (Sigma) para preparo da solução estoque e armazenada a -20°C até o uso. A concentração final de DMSO nas culturas de células não ultrapassou 0,8%.

2.2 Parasitos: Obtenção e manutenção

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Cepa cão Thor MCAN/BR/98/R619) foi isolada pela Dra. Maria de Fátima Madeira do IPEC e fornecidas pela Dra. Lea Cysne da Fundação

Oswaldo Cruz. Os parasitos foram mantidos e reisolados de lesão/linfonodo drenante de hamsters infectados. As formas promastigotas foram mantidas em cultura usando meio Schneider's com 20% de soro fetal bovino a 28°C, com repiques semanais até a 5ª passagem, quando novos parasitos eram reisolados dos animais infectados.

2.3 Avaliação da toxicidade da LQB-166 sobre células de mamíferos

2.3.1 Toxicidade sobre monócitos humanos de linhagem

A toxicidade da LQB-166 foi testada em monócitos humanos da linhagem THP-1 através do ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-metil-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). As células foram cultivadas por 72h a 37°C/5% CO₂ em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina. As células em suspensão foram então ajustadas para a concentração de 4x10⁶/ml e plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços. O tratamento com a LQB-166 (0-1600 µM) foi feito por 12h e a viabilidade celular mensurada com a adição de 25µl/poço de MTT (5mg/ml) por 3h a 37°C/5% CO₂ em câmara escura. Após esse período foi usado DMSO para dissolver os cristais de formazan e a leitura foi feita a 550 nm em espectrofotômetro. Os controles usados foram células cultivadas em meio de cultura, DMSO ou Triton 1%.

2.3.2 Toxicidade sobre macrófagos humanos de linhagem

Os monócitos humanos da linhagem THP-1 foram cultivadas por 72h a 37°C/5% CO₂ em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina, ajustados para a concentração de 1x10⁵/ml, incubados com 30 nM de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) para promover a diferenciação celular e plaqueados em triplicatas em placas de 96 poços por 72h. Após esse período, o meio foi trocado por RPMI suplementado apenas com 10% de soro fetal bovino por 72h, para a formação da monocamada de macrófagos nos poços.

As monocamadas foram então tratadas com a LQB-166 (0-1600 μ M) por 24h. Ao final do tratamento, foram adicionados 25 μ l/poço de MTT (5mg/ml) por 3h a 37°C/5% CO₂ em câmara escura. Após esse período foi usado DMSO para dissolver os cristais de formazan e a leitura foi feita a 550 nm em espectrofotômetro. Os controles usados foram células cultivadas em meio de cultura, DMSO ou Triton 1%.

2.3.3 Toxicidade sobre macrófagos murinos de linhagem

Macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 foram plaqueados em placa de 96 poços (4x10⁶/ml) e aderidos por 18h em 37°C/5% CO₂. As monocamadas foram então tratadas com a LQB-166 (0-3200 μ M) por 24h. Ao final do tratamento, foram adicionados 25 μ l/poço de MTT (5mg/ml) por 3h a 37°C/5% CO₂ em câmara escura. Após esse período foi usado DMSO para dissolver os cristais de formazan e a leitura foi feita a 550 nm em espectrofotômetro. Os controles usados foram células cultivadas em meio de cultura, DMSO ou Triton 1%.

2.4 **Atividade da LQB-166 sobre formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Os monócitos humanos da linhagem THP-1 foram cultivadas por 72 horas a 37°C/ 5% CO₂ em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina, ajustados para a concentração de 1x10⁵/ml, incubados com 30nM de PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate) para promover a diferenciação celular e plaqueados em triplicatas em placas de 24 poços com lamínulas de vidro no fundo por 72h. Após esse período, o meio foi trocado por RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino por mais 72h, quando então os macrófagos estavam aderidos às lamínulas.

A infecção dos macrófagos foi realizada usando promastigotas na fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* na proporção de 5 parasitos por macrófago (meio RPMI com 10% de soro fetal bovino) por 3h a 37°C/ 5% CO₂. Os poços foram lavados 3x com PBS a 37°C a fim de remover os parasitos não internalizados, e foram reincubados com meio RPMI e 10% de soro

fetal bovino por mais 24h para garantir a diferenciação e amastigotas intracelulares. Após esse tempo os macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações da LQB-166 (0-800 μM) por 48h. As lamínulas foram coradas com Panótico e os macrófagos e amastigotas intracelulares contados usando microscópio óptico. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF = % de macrófagos infectados X nº de amastigotas/nº de macrófagos totais).

2. 5 Atividade da LQB-166 sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* na concentração de $5 \times 10^5/\text{ml}$ foram distribuídas em triplicatas em placas de 24 poços e incubadas por 96h a 28°C com a LQB-166 (25-800 μM) diluída em meio Schneider's suplementado com 20% de soro fetal bovino. Os controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura e soro, e na presença DMSO na concentração máxima da substância teste (0,2%). O número de promastigotas viáveis em cada poço foi contado diariamente em microscópio óptico utilizando a câmara de Neubauer.

2.6 Detecção *in situ* da fragmentação do DNA

A fragmentação do DNA nas formas promastigotas foi analisada usando o método TUNEL (TdT-mediated dUTP-X nick end labeling) com kit de detecção de morte celular *in situ* (*In Situ Cell Death Detection Kit*, Roche) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, promastigotas na fase estacionária ($1 \times 10^7/\text{ml}$) de *L. (V.) braziliensis* foram tratadas com a LQB-166 (IC_{50}) por 72h, centrifugadas 2 vezes para lavagem e fixadas em paraformaldeído (4%) + glutaraldeído 0, 1% em lâminas de câmara Lab-Tek®. As células foram lavadas em PBS, incubadas numa solução de peróxido de hidrogênio a 3% e metanol durante 10 min e depois lavadas novamente com PBS. Os parasitos foram permeabilizados com uma solução de 0,1% de Triton x-100 e 0,1% de citrato de sódio e depois foram marcados com a solução TUNEL por 1h a 37°C . Finalmente, os parasitos foram lavados com

PBS e analisados por microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse-80i). Os controles usados foram promastigotas tratadas com DMSO ou DNase.

2.7 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por promastigotas

A avaliação da produção de EROs foi realizada em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas por 72h com a LQB-166 (IC₅₀). Os controles usados foram parasitos incubados com meio de cultura ou DMSO a 0,025%. As promastigotas após o tratamento foram lavadas duas vezes em tampão HBSS, ajustadas para a concentração de 2×10^6 /ml e incubadas em placa de 96 poços escura por 20 minutos com 20 μ M da sonda H₂DCFDA (2'7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína), que na presença de EROs sofre desacetilação sendo convertida a DCFDA (2'7'-diclorofluoresceína), que acumulada dentro da célula é captado por fluorescência. A leitura foi feita em fluorímetro (Spectra Max M2 – Molecular Devices, Silicon Valley, USA) com comprimentos de onda de 485 nm de excitação e 530 nm de emissão. Como controle positivo foi usado H₂O₂ a 2 mM. Os resultados foram expressos em unidades relativas de fluorescência.

2.8 Avaliação da ação da LQB-166 sobre a ativação de macrófagos

Para a análise da possível ação imunomoduladora da LQB-166, macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Após três dias de cultura, as células foram descoladas do fundo da garrafa com um raspador, ajustadas para 4×10^6 /ml e plaqueadas em placas de 24 poços sendo mantidas na estufa por 18h para aderência. Então foi feito o tratamento com a LQB-166 (0-1000 μ M). Usamos como controles negativos células tratadas apenas com meio de cultura ou DMSO e como controle positivo de ativação da resposta celular, 3 μ g/ml de LPS. Após 24h de tratamento, o sobrenadante foi colhido e armazenado a -80°C para posteriores análises (nitrito e citocinas) ou foi realizada a interação com microesferas fluorescentes para avaliar a capacidade fagocítica dos macrófagos. Para a dosagem de nitrito, testamos também macrófagos da linhagem THP-1, cultivados como descrito no item 2.7.2.

2.8.1 Dosagem de óxido nítrico

O NO é uma molécula altamente instável, então sua produção foi avaliada pela concentração de NO_2^- (nitrito) que é um produto de oxidação mais estável e facilmente dosado pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Uma curva de 0 a 500 μM de nitrito de sódio (NaNO_2) assim como os sobrenadantes de culturas de macrófagos RAW 264.7 foram plaqueados em placas de 96 poços. Foi adicionado aos poços o reagente de Griess (1:1 de 0,1 % de diidrocloreto de naftiletenodiamino e 1% de sulfonamida do paraminobenzeno em 5% de ácido fosfórico) por 20 minutos e a leitura foi feita no leitor de microplacas a 550 nm. Os valores da absorvância dos sobrenadantes foram comparados com os da curva padrão de NaNO_2 usando a equação da reta. Os resultados foram expressos em μM de nitrito.

2.8.2 Dosagem de citocinas

A avaliação da produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e IFN por macrófagos RAW 264.7 foi realizada pelo método *Cytometric Bead Array* (CBA) utilizando-se o kit *Mouse Inflammation* (BD Bioscience), seguindo as recomendações do fabricante.

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos tratados ou não com LQB-166 e o padrão de cada uma das citocinas avaliadas foram incubados com microesferas de captura (de tamanho e padrões de fluorescência conhecidos) recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas, e com os anticorpos de detecção conjugados com ficoeritrina (PE) por 3h à temperatura ambiente, protegido da luz. Após este período de incubação, as amostras foram lavadas por centrifugação a 200 x g por 5 minutos com tampão fornecido pelo kit. O sobrenadante foi desprezado e as amostras ressuspensas em 300 μL de tampão de lavagem para posterior aquisição de 2.000 eventos/microesferas em citômetro de fluxo FACSCanto II (Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience). Os resultados foram gerados a partir de análises realizadas utilizando-se o programa *FCAP Array* versão 3.0 (BD Bioscience) para calcular a concentração de cada citocina, expressa em pg.

2.8.3 Fagocitose de microesferas fluorescentes

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram plaqueados a 2×10^6 /ml em câmara Lab-Tek™ (Thermo Scientific) e mantidos na estufa de 37°C com 5% de CO₂ por 2h para aderência. As monocamadas foram tratadas com LQB-166 (200 µM ou 400 µM) ou estimuladas com LPS (3µg/ml) por 24h e nos controles foram mantidas apenas com DMSO 0.025%. Após o período de 24h o sobrenadante foi desprezado e as microesferas de látex marcadas com FIT-C (Polysciences, Inc.) foram adicionadas na proporção de 3:1 por 3h. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as microesferas não internalizadas foram removidas por 3 lavagens com PBS a 37°C. Em seguida, as lâminas foram montadas usando de 1-2 gotas de N-propril Galato (Sigma-Aldrich), analisadas e fotografadas em microscópio óptico de fluorescência (Nikon Eclipse E600) para posterior contagem das microesferas internalizadas. Os resultados foram expressos como Índice de Fagocitose (IF). Sendo IF = número de microesferas internalizadas X % de macrófagos com microesferas/número de macrófagos totais.

2.9 **Atividade terapêutica da LQB-166 em hamsters infectados**

2.9.1 Considerações éticas

Os experimentos *in vivo* realizados com hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) foram aprovados pela Comissão de Ética para Cuidado e Uso de Animais Experimentais Protocolos nº CEUA/027/2013 e CEUA/051/2017– IBRAG-UERJ.

2.9.2 Infecção e tratamento de hamsters

Hamsters (4-5/grupo) com idades entre 8 a 10 semanas foram infectados no dorso da pata direita com 10^6 promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (em 50 µl) na fase estacionária. Para

o tratamento utilizamos duas vias de administração local e três protocolos terapêuticos. A LQB-166 para os experimentos *in vivo* foi solubilizada em 0,05% de DMSO.

Em relação via de administração local:

- a) Via subcutânea: foi realizada três vezes por semana com 50 µl da substância injetada diretamente na lesão (dorso da pata) usando microseringa com uma agulha 12,7x0,33 mm;
- b) Via tatuagem: foi realizada duas vezes por semana usando uma máquina para tatuagem (White Head). Cada sessão de tatuagem consistiu em doze administrações de dois segundos com agulha de cinco cabeças oscilando a 60 Hz (60 perfurações por segundo), com um total de 7200 perfurações (5x12x2x60) distribuídas pelo local da lesão (dorso da pata), inoculando de 1,2 a 3 µl de substância por sessão. Para realizar o procedimento de tatuagem, os animais foram anestesiados com 80 mg/kg de cetamina associado a 10 mg/kg de xilazina por via intraperitoneal dez minutos antes do tratamento.

Em relação aos protocolos de tratamento:

- a) Protocolo I - Após sete dias de infecção, o tratamento foi iniciado e durou três semanas. Os grupos controles foram constituídos por animais não tratados e tratados com 0,05% de DMSO (via subcutânea ou via tatuagem). O grupo tratado pela via subcutânea recebeu 25 µg/kg/dia de LQB-166 e o grupo tratado via tatuagem recebeu 2,5 µg/kg/dia de LQB-166. Após as três semanas de tratamento, os animais permaneceram em observação por mais três semanas, quando foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a carga parasitária da lesão e do linfonodo drenante foi determinada por diluição limitante;
- b) Protocolo II - Após o estabelecimento da lesão (5 semanas de infecção), o tratamento foi iniciado e durou duas semanas. O grupo controle foi constituído por animais tratados com 0,05% de DMSO via tatuagem e o grupo experimental foi tratado com 2,5 µg/kg/dia de LQB-166 também via tatuagem. Após as duas semanas de tratamento, os animais permaneceram em observação por mais duas semanas, quando foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a carga parasitária da pata e do linfonodo drenante da lesão foi estimada por diluição limitante. Neste experimento também foi

dosada a produção de óxido nítrico (Método de Griess) no sítio da lesão e linfonodos drenantes;

- c) Protocolo III - Após sete dias de infecção, o tratamento foi iniciado e durou duas semanas. Os grupos controles foram constituídos por animais não tratados e tratados com 0,05% de DMSO via subcutânea ou via tatuagem. O grupo tratado pela via subcutânea recebeu 25 µg/kg/dia de LQB-166 e o grupo tratado via tatuagem recebeu 2,5 µg/kg/dia de LQB-166. Neste protocolo foram incluídos grupos tratados com o fármaco de referência Glucantime, onde um grupo foi tratado com 1 mg/kg/dia via subcutânea (3x/semana) e o outro grupo recebeu 0,1 mg/kg/dia via tatuagem (2x/semana) Após as duas semanas de tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a carga parasitária da pata e do linfonodo drenante da lesão foi estimada por diluição limitante. Neste experimento também foi dosada a produção de óxido nítrico na lesão e linfonodos drenantes e avaliamos a histopatologia das lesões.

2.9.3 Quantificação de parasitos por diluição limitante

Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e a área da lesão nas patas foi assepticamente retirada assim como os linfonodos poplíteos drenantes para análise da carga parasitária pelo método de diluições limitantes (LDA). Os tecidos do *pool* de animais de cada grupo foram macerados em 5 ml de meio Schneider's contendo 20% de soro feta bovino. As suspensões de células foram diluídas em série em múltiplos de 10, em sextuplicatas em placa de 96 poços (volume final de 180 µl/poço). As culturas foram mantidas a 28°C e acompanhadas diariamente em microscópio óptico invertido para observação da presença de formas promastigotas. Os resultados foram obtidos com a última diluição que continha promastigotas no sétimo dia de cultura e expressos como unidades arbitrárias.

2.9.4 Dosagem de nitrito nas lesões e linfonodos drenantes

O nitrito do macerado das lesões das patas e linfonodos drenantes foi dosado a fresco. As amostras foram centrifugadas e o nitrito dosado por Método de Griess, como explicado no item 2.8.1.

2.9.5 Análise histopatológica das lesões

Inicialmente fizemos um teste injetando tinta de tatuagem (Master's Ink - preto) pelas vias subcutânea (50 µl) ou tatuagem (1,2 a 3 µl) para simular a distribuição da droga pelo tecido. Esses animais também tiveram o fragmento da pata analisado histologicamente.

Um fragmento do tecido da lesão da pata infectada de cada animal de cada grupo foi fixado em formol para posterior processamento. Os fragmentos fixados foram desidratados em uma série de soluções alcoólicas, clarificados com xilol e inclusos em blocos de parafina.

Após o emblocamento, cortes de 3 mm foram corados com hematoxilina-eosina (HE). As imagens foram capturadas em microscópio com câmera acoplada (Nikon Eclipse E600) e editadas usando Microsoft PowerPoint.

Os resultados foram expressos usando critério de escore segundo Yang (2013), baseado em uma análise semiquantitativa de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico. O valor do escore foi determinado da seguinte forma: não observado (escore=0), pouco observado (escore=1), moderadamente observado (escore=2) e muito observado (escore=3). Resultados finais foram dados pela soma dos escores de cada grupo. Os parâmetros histológicos analisados foram presença de amastigotas e o infiltrado inflamatório.

2.10 **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software *Graphpad Prism 5* pelos seguintes testes: One-Way ANOVA com pós-teste de Tukey ou Teste T paramétrico. Valores

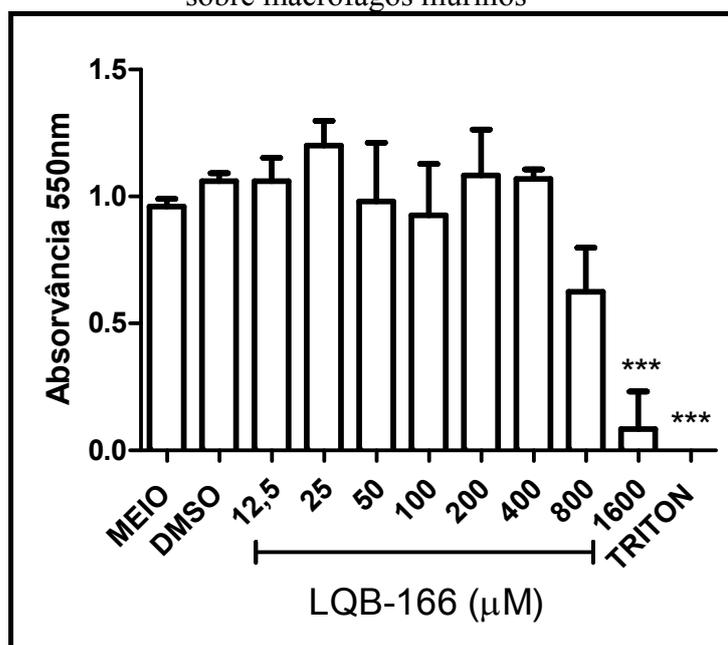
de p iguais ou menores que 0,05 foram considerados significativos. Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram calculados por regressão não linear.

3 RESULTADOS

3.1 Citotoxicidade da LQB-166 sobre células de linhagem murina

Testamos a citotoxicidade da LQB-166 sobre células de linhagem, antes dos experimentos com amastigotas intracelulares. Macrófagos murinos da linhagem RAW 264.7 foram tratados ou não com LQB-166 por 24h, quando então a viabilidade foi aferida pelo método de redução do MTT. Observamos que houve toxicidade significativa somente a partir de 800 μM (Gráfico 1), e a concentração citotóxica para 50% (CC_{50}) foi estimada em $825 \pm 64 \mu\text{M}$.

Gráfico 1 – Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre macrófagos murinos



Fonte: A autora, 2019.

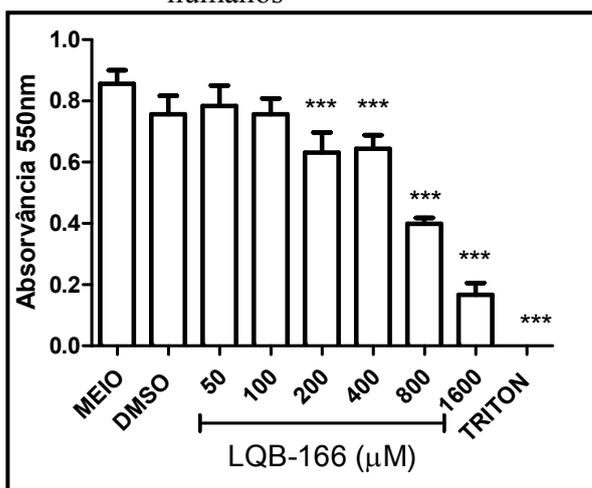
Macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em triplicatas na presença ou ausência da LQB-166 a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5%. Após a incubação foram adicionados 25 μl de MTT (5mg/ml). A placa foi incubada por mais 3h a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5% no escuro. Os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura foi realizada a 550 nm. Controles foram células cultivadas com o meio RPMI, DMSO ou Triton

0,5%. Foram descontados os valores do branco (diferentes diluições da LQB-166 em meio RPMI). Teste ANOVA pós teste Tukey ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ (Gráficos representativos de 3 experimentos independentes).

3.2 Citotoxicidade da LQB-166 sobre células de linhagem humana

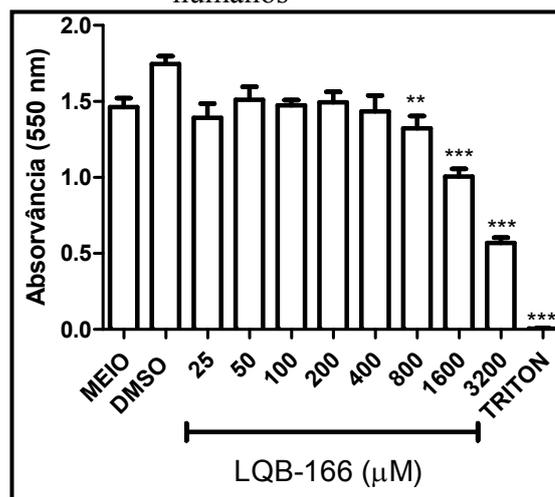
Testamos também a toxicidade da molécula sobre células humanas utilizando a linhagem THP-1. As células, monócitos em suspensão ou monocamadas de macrófagos, foram tratadas com a molécula (monócitos: 0-1600 μM por 12h ou macrófagos: 0-3200 μM por 24h e a sua viabilidade aferida usando ensaio de redução do MTT. Os resultados mostraram que a naftoquinona apresenta toxicidade em faixas de concentração um pouco diferentes dependendo do estágio de diferenciação da célula. Houve toxicidade significativa a partir de 200 μM (Gráfico 2) para monócitos em suspensão, sendo a concentração citotóxica para 50% (CC_{50}) estimada em $767 \pm 76 \mu\text{M}$. Já as monocamadas de macrófagos apresentaram redução da viabilidade a partir de 800 μM e CC_{50} estimada em $2194 \pm 74 \mu\text{M}$ (Gráfico 3).

Gráfico 2 – Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre monócitos humanos



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 3 – Avaliação da citotoxicidade da LQB-166 sobre macrófagos humanos



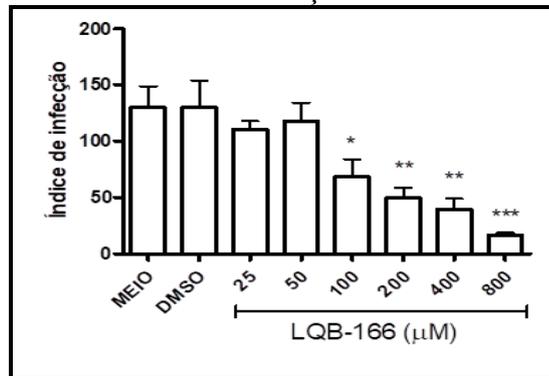
Fonte: A autora, 2019.

Monócitos (Gráfico 2) ou macrófagos (Gráfico 3) da linhagem THP-1 foram cultivados em triplicatas na presença ou ausência da LQB-166 a 37°C/CO₂ a 5%. Após a incubação foram adicionados 25µl de MTT (5mg/ml). A placa foi incubada por mais 3h a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5% no escuro. Os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura foi realizada a 550 nm. Controles foram células cultivadas com o meio RPMI, DMSO ou Triton 0,5%. Teste ANOVA pós teste Tukey ** p<0,01 *** p<0,001 (Gráficos representativos de 4 experimentos independentes).

3.3 Atividade da LQB-166 sobre formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*

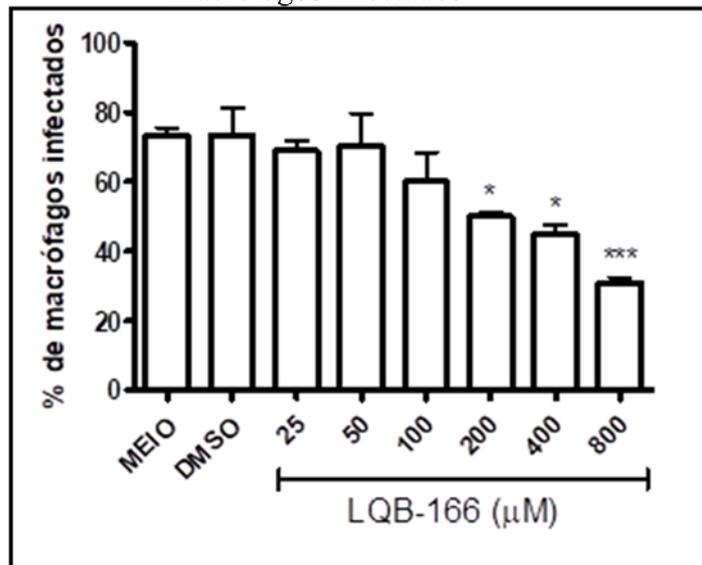
As amastigotas intracelulares são as formas do parasito encontradas no hospedeiro vertebrado, como os humanos, e por isso de extrema importância e interesse para o desenvolvimento de novos fármacos. Para este ensaio, monócitos da linhagem humana THP-1 foram diferenciados em macrófagos com a adição de PMA e infectados com *L. (V.) braziliensis* na proporção de 5 parasitos/macrófago, incubados com meio de cultura por 24h e submetidos ao tratamento com as concentrações de 0 a 800 µM da LQB-166 durante 48h a 37°C/5%CO₂. Após esse período a monocamada de macrófagos infectada foi corada com Panótico e o percentual de macrófagos infectados e número de amastigotas intracelulares contados por microscopia óptica. Os resultados mostraram uma atividade dose-dependente, com redução significativa do índice de infecção em relação aos controles (RPMI ou DMSO) a partir de 100 µM, inibindo 47% e chegando a inibir 70% e 87% do índice de infecção a 400 e 800 µM. A IC₅₀ foi estimada em 149 ± 13 µM (Gráfico 4). Analisando a infecção, observamos uma redução do percentual de macrófagos infectados quando tratados com a LQB-166 a partir de 200 µM (Gráfico 5) e uma redução no número de amastigotas por macrófagos a partir de 400 µM (Gráfico 6).

Gráfico 4 –Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares – Índice de infecção



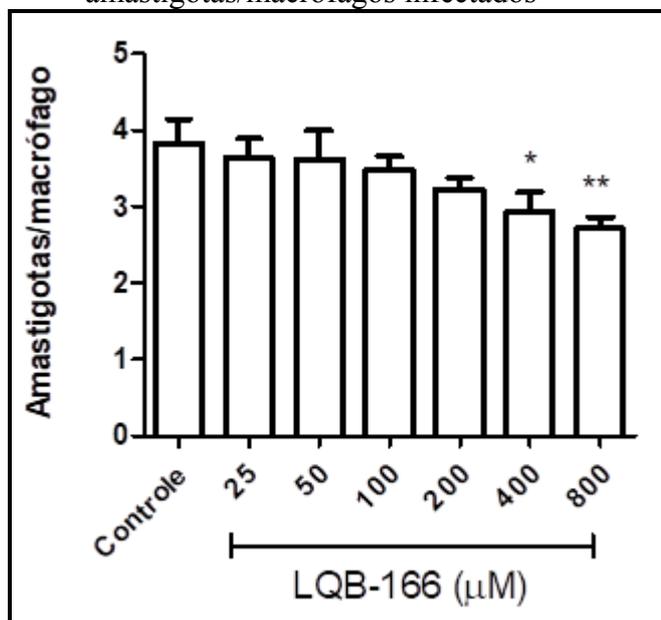
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 5 – Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares – Percentual de macrófagos infectados



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 6 – Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre amastigotas intracelulares – número de amastigotas/macrófagos infectados



Fonte: A autora, 2019.

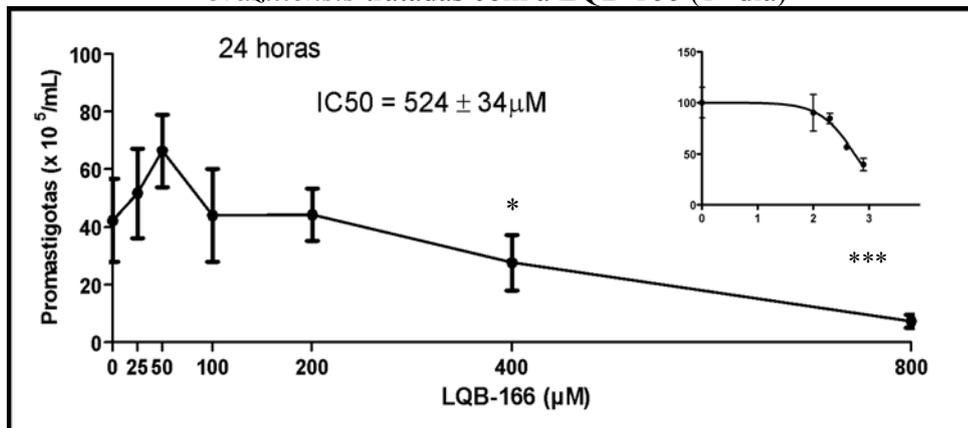
Monócitos da linhagem THP-1 foram diferenciados em macrófagos e infectados com *L. (V.) braziliensis* na proporção de 5 parasitos/macrófago, incubados com meio de cultura e soro fetal bovino por 24h e submetidos ao tratamento com as concentrações de 0 a 800 μM da LQB-166 durante 48h a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após esse período a monocamada de macrófagos infectada foi corada com Panótico e o percentual de macrófagos infectados e número de amastigotas intracelulares contados por microscopia (mínimo de 100 macrófagos/lamínula. Índice de infecção (Gráfico 4), Percentual de macrófagos infectados (Gráfico 5) e número de amastigotas/macrófagos infectados (Gráfico 6). Teste ANOVA pós teste Tukey *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Gráficos representativos de 2 experimentos independentes.

3.4 Atividade dose-resposta da LQB-166 sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*

Iniciando a investigação do mecanismo de ação da LQB-166, avaliamos sua atividade sobre o crescimento das formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. O número de

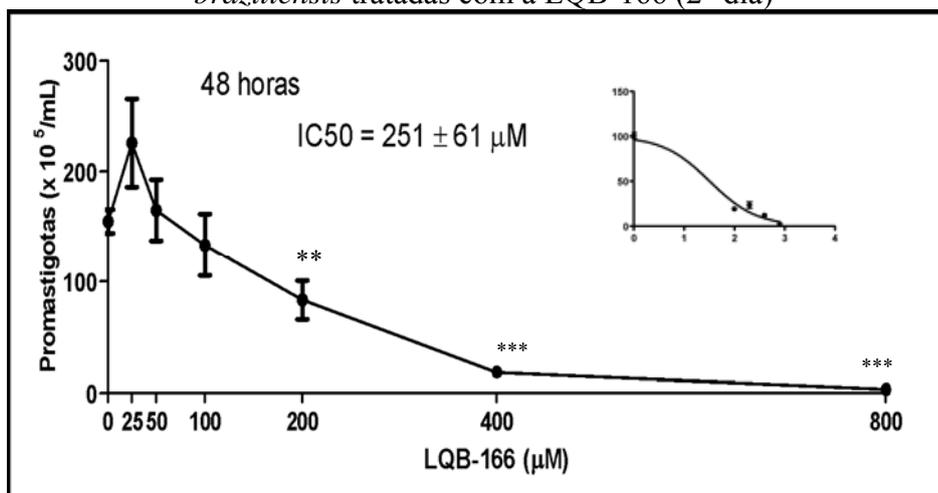
promastigotas foi contado diariamente em microscópio durante 4 dias de cultivo, com diferentes concentrações da molécula LQB-166 (0-800 μM). Os resultados (Gráficos 7, 8, 9 e 10) mostraram uma atividade dose e tempo-dependentes da LQB-166. Não houve diferença significativa do número de parasitos viáveis entre os controles com meio de cultura ou com o diluente DMSO. A concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC_{50}) foi calculada em $524 \pm 34 \mu\text{M}$ em 24h, $251 \pm 61 \mu\text{M}$ em 48h, $116 \pm 23 \mu\text{M}$ em 72h e $101 \pm 34 \mu\text{M}$ em 96h.

Gráfico 7 – Avaliação do crescimento de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com a LQB-166 (1º dia)



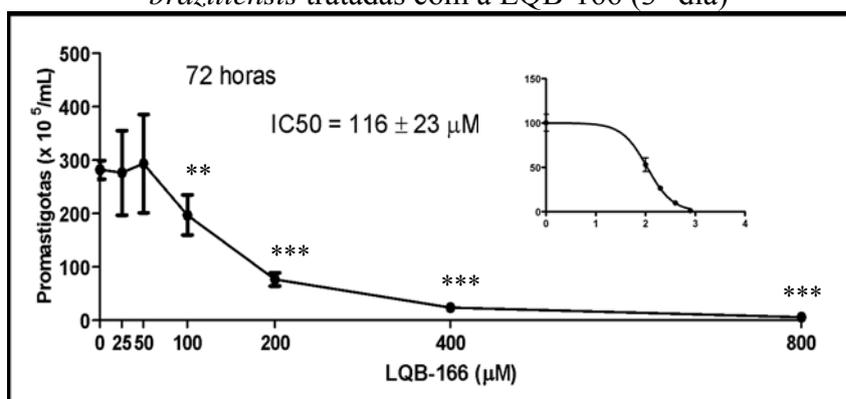
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 8 – Avaliação do crescimento de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com a LQB-166 (2º dia)



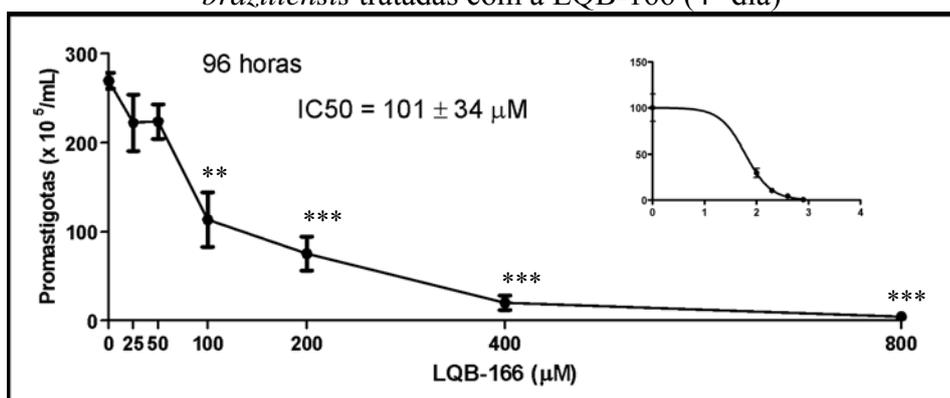
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 9 – Avaliação do crescimento de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com a LQB-166 (3º dia)



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 10 – Avaliação do crescimento de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com a LQB-166 (4º dia)



Fonte: A autora, 2019.

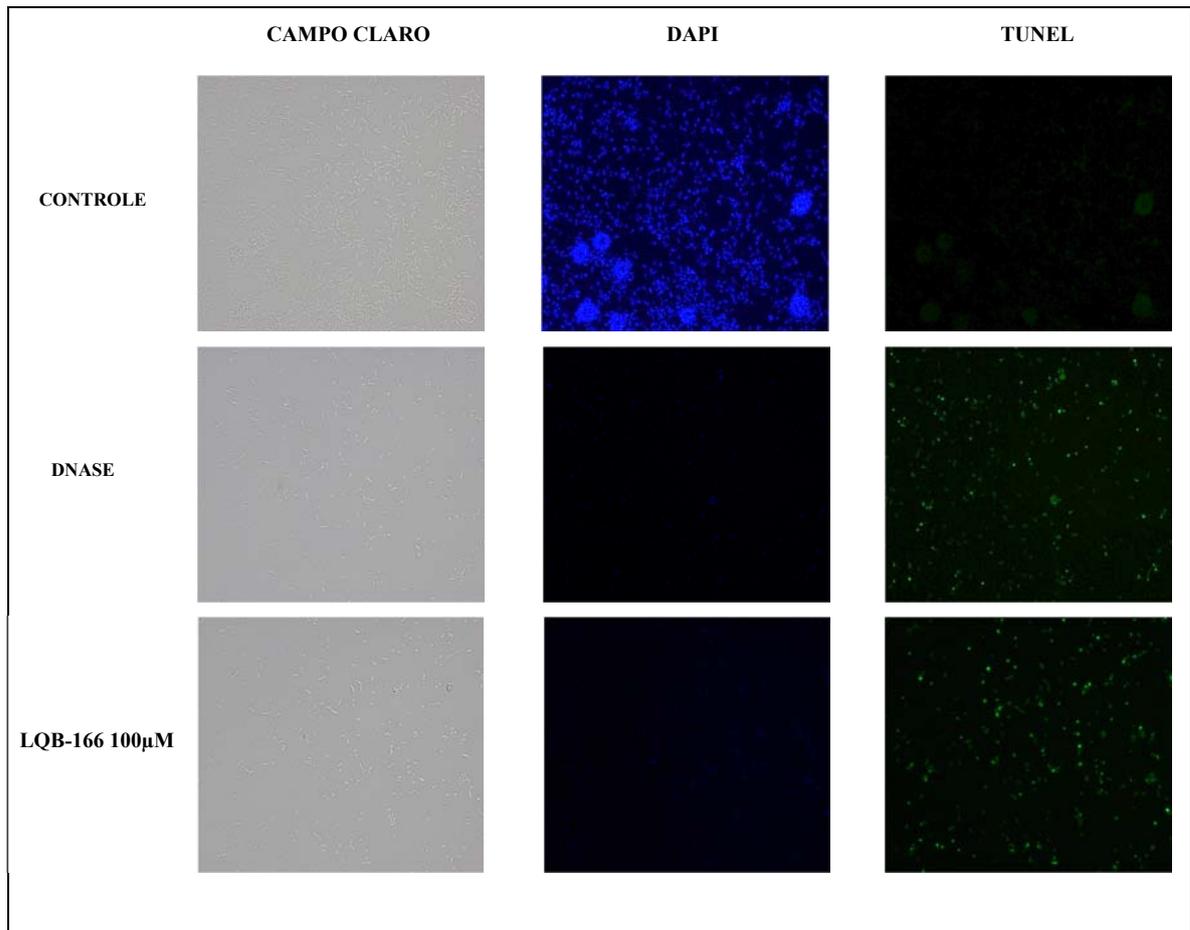
Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivadas em triplicatas na presença ou ausência da LQB-166 (0-800 µM) durante 4 dias a 28°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer. Controles foram parasitos cultivados na presença ou ausência de DMSO a 0,2%. Teste ANOVA pós teste Tukey * p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001 *inset*: regressão não linear para cálculo da IC₅₀ (Gráficos representativos de 3 experimentos independentes).

3.5 Fragmentação de DNA de promastigotas tratadas com LQB-166

Para analisar se um dos mecanismos de ação da LQB-166 sobre os parasitos envolveria morte por indução de apoptose, avaliamos a marcação *in situ* da fragmentação de

DNA através do kit TUNEL. Os parasitos na fase estacionária foram tratados por 72h com a LQB-166 (IC_{50}). Na Figura 11, observamos que as promastigotas tratadas foram marcadas com o TUNEL, indicando a fragmentação do DNA. A marcação foi semelhante à dos parasitos tratados com a DNase, controle positivo. A marcação com DAPI, demonstrou que a maior parte das células tratadas com LQB-166 estavam inviáveis, enquanto no controle com DMSO estavam íntegras.

Figura 11 – Fragmentação de DNA de promastigotas



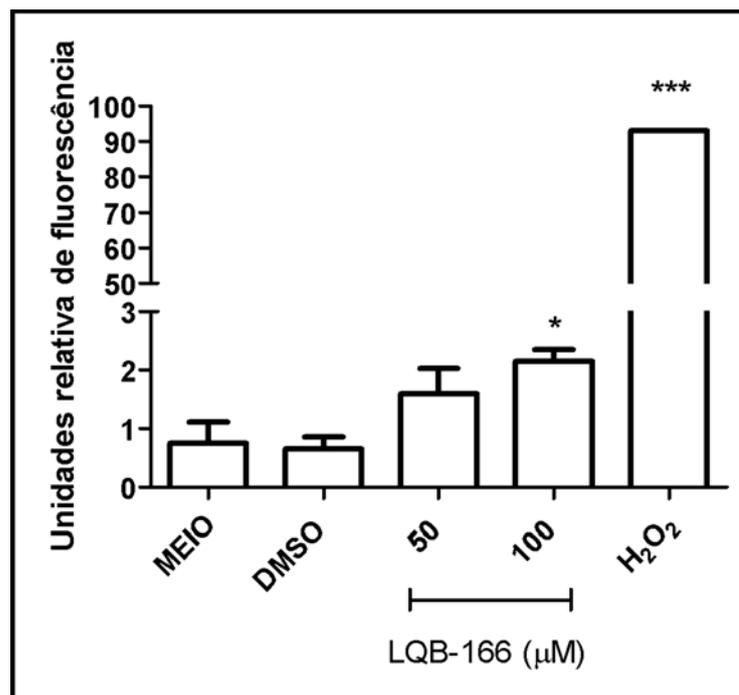
Fonte: A autora, 2019.

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivadas em lâminas LabTek em duplicatas na presença ou ausência da LQB-166 por 72h. Os parasitos foram lavados, preparados e marcados com TUNEL. Controles foram parasitos cultivados na presença de DMSO a 0,05% ou DNase.

3.6 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por promastigotas tratadas com LQB-166

Dando continuidade à análise dos mecanismos de ação da LQB-166 sobre os parasitos, avaliamos a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em promastigotas. As células na fase estacionária foram tratadas por 72h com 50 μM ou 100 μM de LQB-166 (concentrações equivalentes a metade da IC_{50} e IC_{50} , respectivamente). No Gráfico 11, observamos que as promastigotas tratadas na concentração de 100 μM , equivalente a IC_{50} , tiveram um aumento significativo na produção de EROs, em relação aos controles com meio e DMSO.

Gráfico 11 – Avaliação da produção de EROs em promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas com a LQB-166



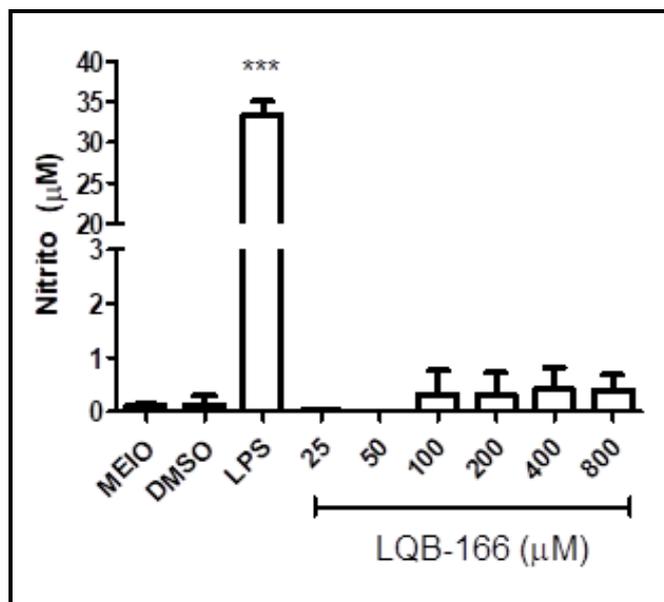
Fonte: A autora, 2019.

Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivadas na presença ou ausência da LQB-166 (50 ou 100 μM) durante 72h a 28°C. Os parasitos foram lavados e incubados com a sonda H₂CFDA, e a leitura feita em fluorímetro (485 nm de excitação/530 nm de emissão). Controles foram parasitos cultivados na presença ou ausência de DMSO a 0,2%, e como controle positivo foi usado H₂O₂ a 2 mM. Teste T paramétrico * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$. Gráfico representativo da média de 2 experimentos independentes.

3.7 Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166

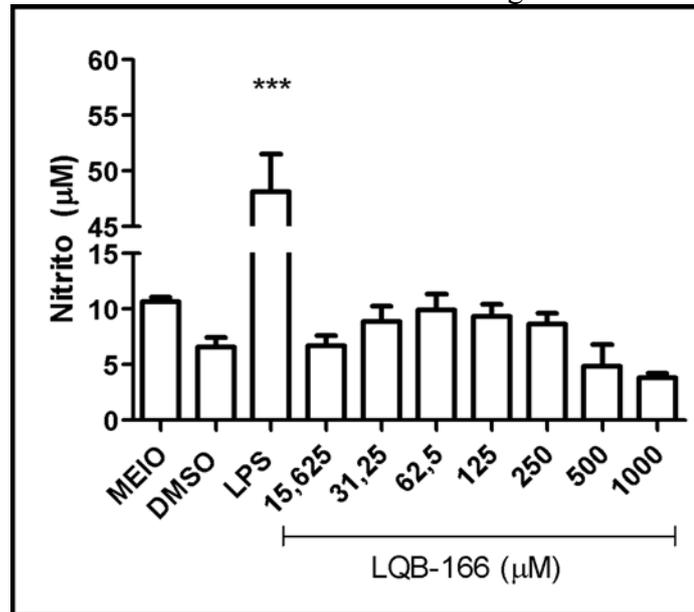
Com o objetivo de investigar se a LQB-166 poderia atuar sobre a célula hospedeira, ativando seus mecanismos microbidas via produção de radicais tóxicos, avaliamos a produção de NO (óxido nítrico) através da dosagem de nitrito. Para isso, tratamos com a LQB-166 os macrófagos das linhagens THP-1 (0-800 μM) ou RAW 264.7 (0-1000 μM) em estufa de 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. O nitrito foi mensurado nos sobrenadante das culturas por meio da dosagem de nitrito. Observamos nos Gráficos 12 e 13 que a LQB-166 não alterou significativamente a produção de óxido nítrico pelos macrófagos.

Gráfico 12 - Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166 - Monocamadas de macrófagos THP-1



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 13 - Produção de nitrito por macrófagos tratados com LQB-166 - Monocamadas de macrófagos RAW 264.7



Fonte: A autora, 2019.

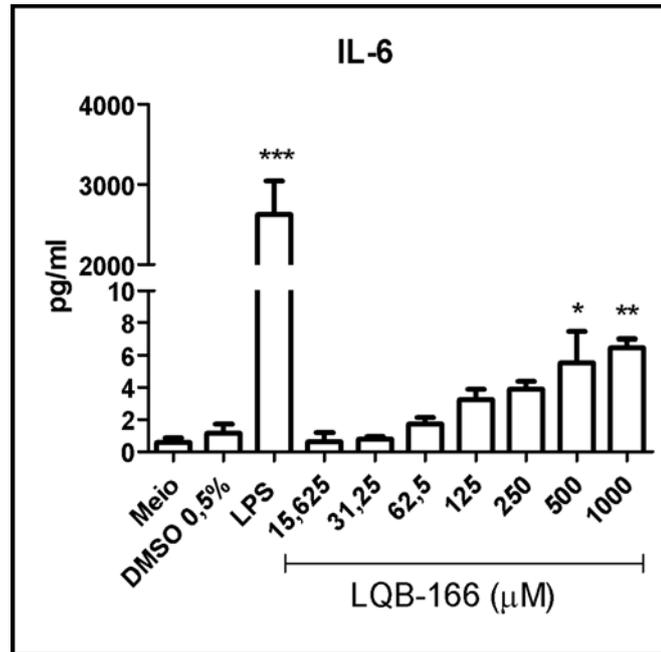
Monocamadas de macrófagos (Gráfico 12) THP-1 ou (Gráfico 13) RAW 264.7 foram cultivados por 24 horas em triplicatas na presença ou ausência da LQB-166 a 37°C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após a incubação o sobrenadante foi colhido e congelado para dosagem de nitrito. Teste ANOVA pós teste Tukey *** p<0,001 (Gráficos representativos de 3 experimentos independentes).

3.8 Ativação da produção citocinas por macrófagos tratados

A avaliação da produção das citocinas IL-6, IL-10, IL-12 e IFN por macrófagos de linhagem de camundongos (RAW 264.7) foi realizada pelo método Cytometric Bead Array (CBA) utilizando-se o kit Mouse Inflammation (BD Bioscience), seguindo as recomendações do fabricante.

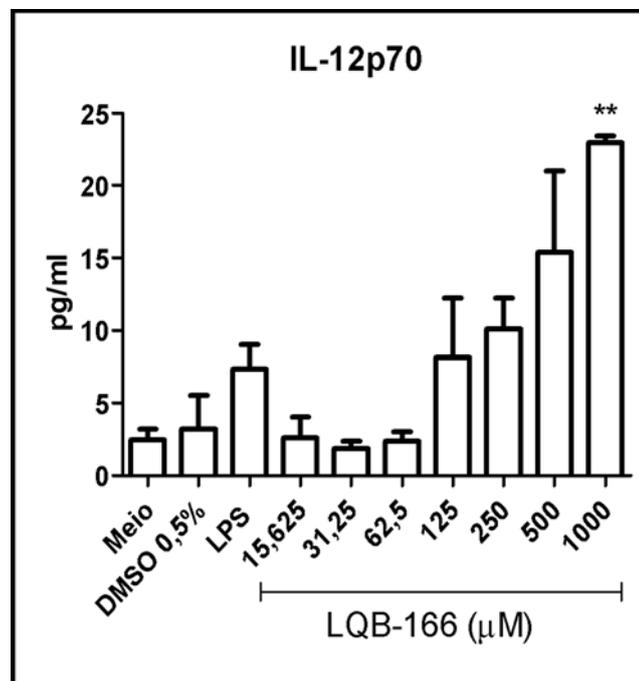
Observamos um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12, IFN e da antiinflamatória IL-10 nos macrófagos tratados com altas concentrações de LQB-166 (Gráficos 14, 15, 16 e 17). Nossos resultados indicam modulação da produção de citocinas mediada pela LQB-166.

Gráfico 14 - Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-6)



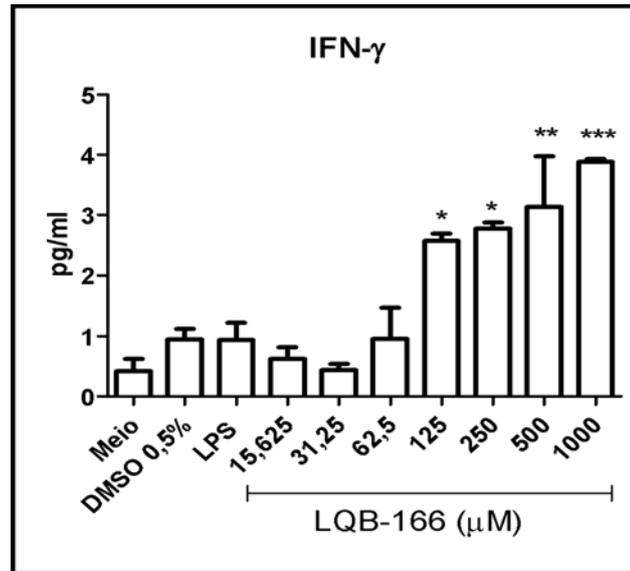
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 15 - Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-12)



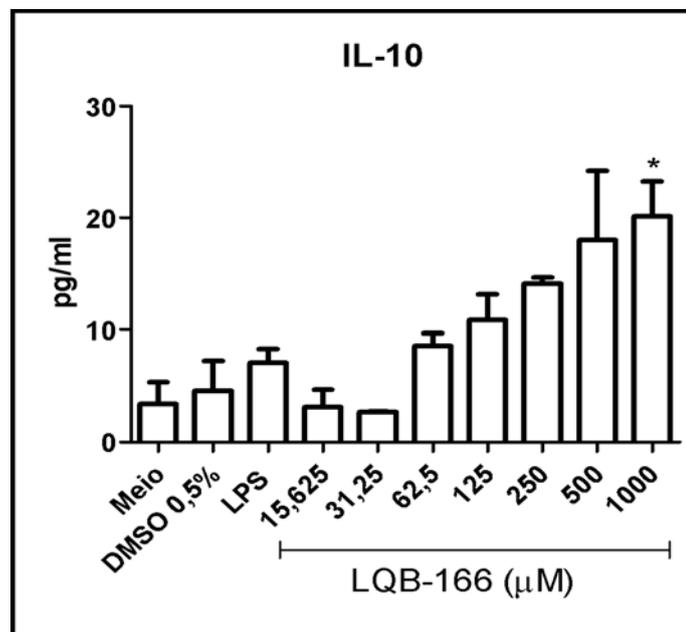
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 16 - Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IFN)



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 17 - Produção de citocinas por macrófagos tratados com LQB-166 (IL-10)



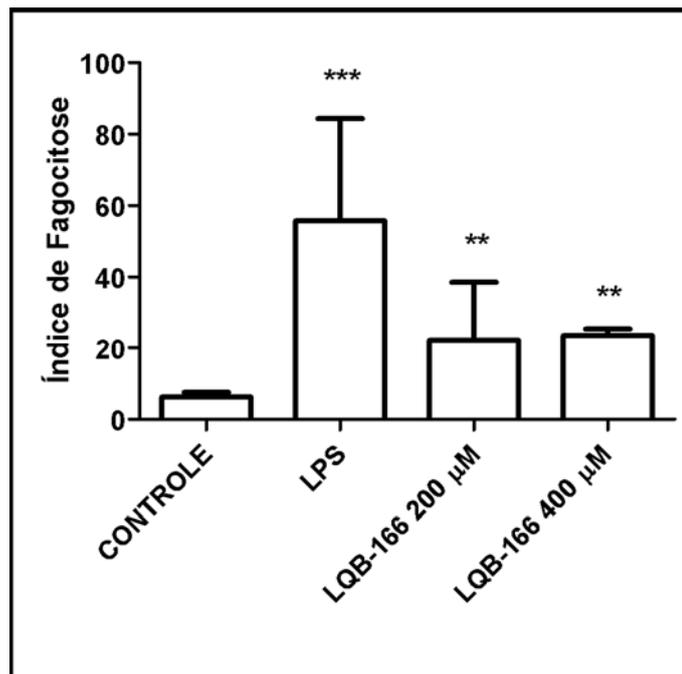
Fonte: A autora, 2019.

Células RAW 264.7 foram tratadas com a LQB-166 (0-1000 μ M) durante 24h a 37°C/CO₂ a 5%. A dosagem de citocinas no sobrenadante foi realizada pelo kit CBA e análise por citometria de fluxo Teste ANOVA pós teste Tukey * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Gráficos representativos de 2 experimentos independentes.

3.9 Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos

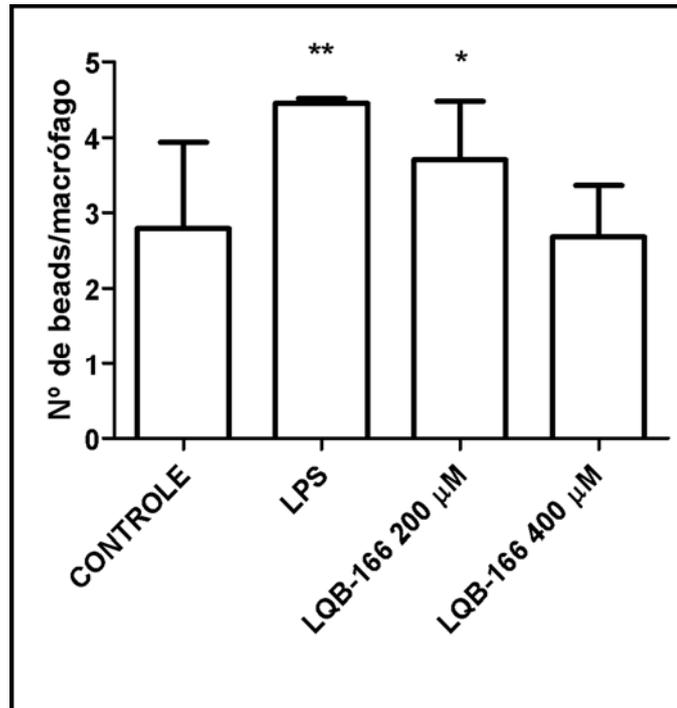
Ainda para investigar a ação da LQB-166 sobre funcionalidade da célula hospedeira, avaliamos se os macrófagos da linhagem murina RAW 264.7 tratados com a naftoquinona teria sua capacidade fagocítica alterada. Para isso, após o tratamento de 24h adicionamos microesferas fluorescentes para serem fagocitadas pelos macrófagos. Nossos resultados (Gráficos 18, 19 e 20) mostram que o tratamento com a LQB-166 nas concentrações 200 μM e 400 μM aumentou significativamente o índice de fagocitose das células e o percentual de macrófagos que fagocitaram as beads, em relação ao controle não tratado. Em relação ao número de beads fagocitadas, observamos um aumento apenas na concentração de 200 μM .

Gráfico 18 – Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166



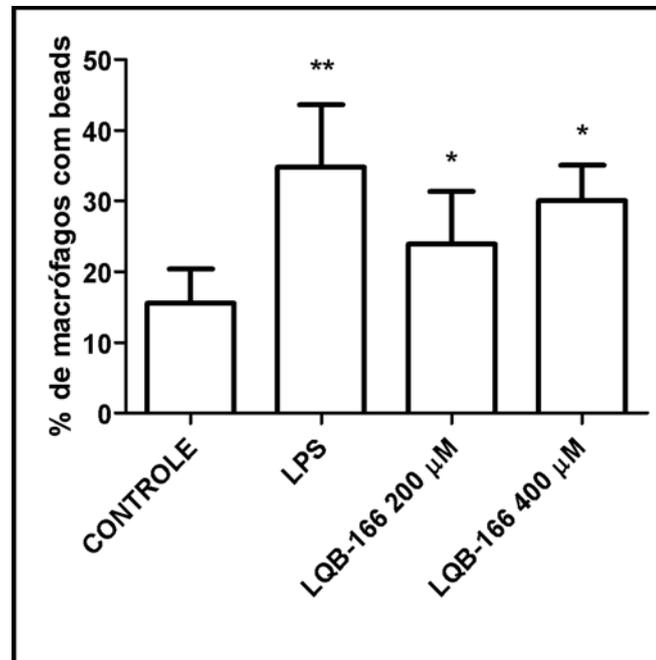
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 19 – Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 20 – Avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos tratados com LQB-166



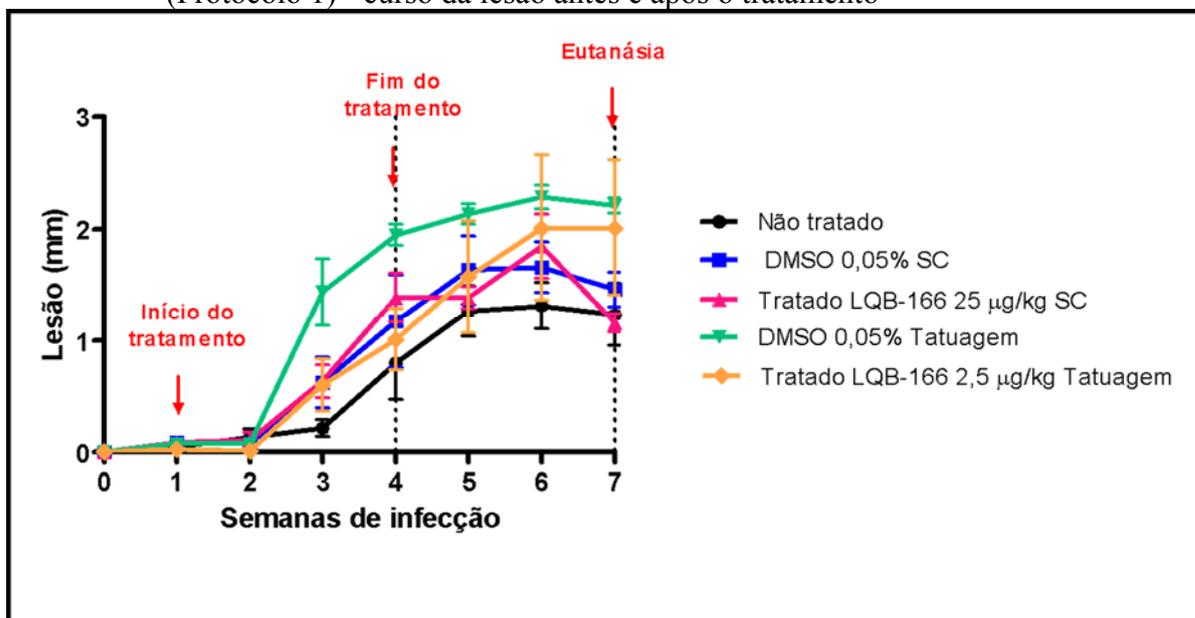
Fonte: A autora, 2019.

3.10 Atividade terapêutica da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* usando vias de administração local

A fim de avaliar o efeito terapêutico da LQB-166, foi realizado o tratamento de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, por vias de administração local (subcutânea – SC ou tatuagem). Usamos 3 protocolos de tratamento, como explicado no item 3.9.2. Foram avaliados os seguintes parâmetros: curso da lesão (protocolos 1, 2 e 3) carga parasitária por diluição limitante (protocolos 1, 2 e 3); dosagem de nitrito (protocolos 2 e 3); tamanho dos linfonodos (protocolo 3) e histopatologia das patas (protocolo 3)

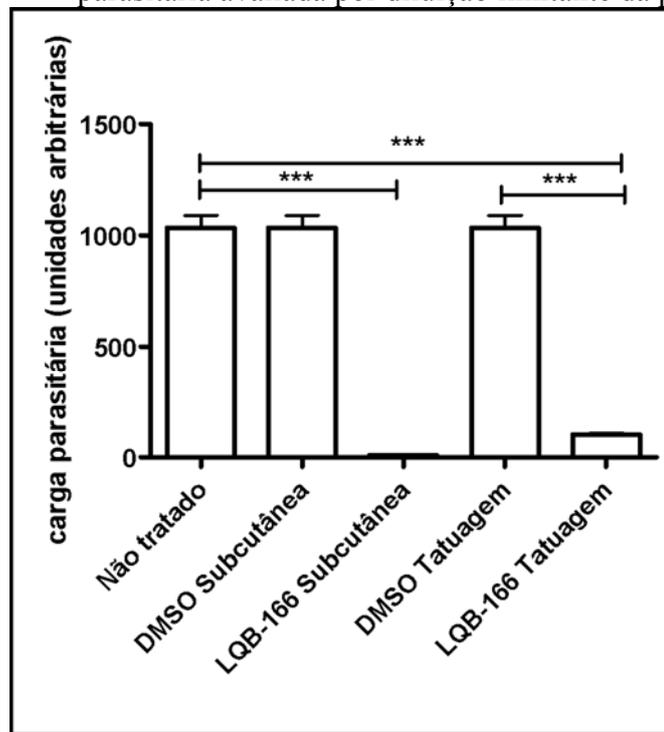
Observamos no protocolo 1 que o tratamento com a LQB-166 tanto por via subcutânea como por tatuagem, uma semana após a infecção, apesar de não alterar o tamanho da lesão (Gráfico 21), foi capaz de reduzir significativamente a carga parasitária dos animais tratados (Gráfico 22). Não vimos diferenças entre as cargas parasitárias dos grupos tratados pelas diferentes vias de administração.

Gráfico 21 – Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 1) - curso da lesão antes e após o tratamento



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 22 – Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 1) - Carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata

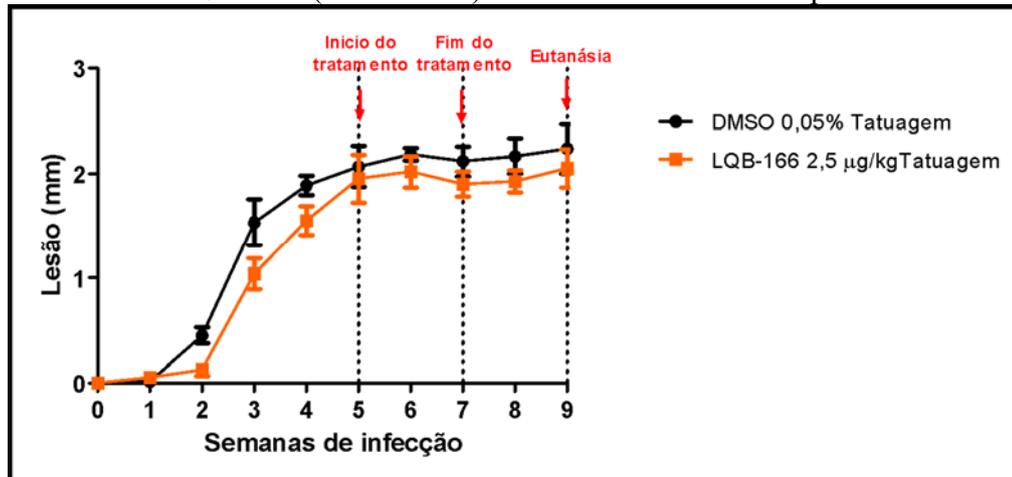


Fonte: A autora, 2019.

Hamsters (3-4/grupo) foram infectados com *L. (V.) braziliensis* na pata traseira e tratados a partir de uma semana após a infecção, com LQB-166 por via subcutânea (25 µg/kg) três vezes por semana ou por tatuagem (2,5 µg/kg) duas vezes por semana por três semanas. Controles foram animais não tratados ou tratados com DMSO subcutânea e tatuagem. Curso da lesão antes e após o tratamento (Gráfico 21). Carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata (Gráfico 22). Teste ANOVA pós teste Tukey *** $p < 0,001$

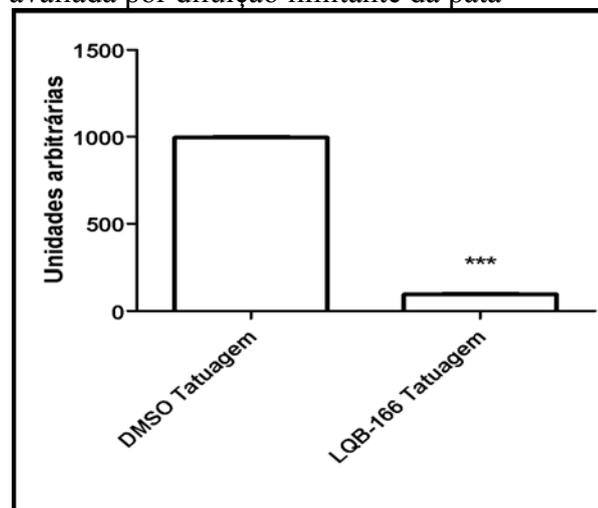
No protocolo 2, avaliamos se o tratamento com a LQB-166 utilizando a administração via tatuagem seria capaz de reduzir a carga parasitária após o estabelecimento da lesão. Mais uma vez, não vimos alteração do tamanho da lesão nas patas dos animais tratados (Gráfico 22), no entanto a carga parasitária e a produção de nitrito pelos linfonodos drenantes foi significativamente reduzida (Gráfico 23 e Gráfico 24, respectivamente).

Gráfico 23 – Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 2) - curso da lesão antes e após o tratamento



Fonte: A autora, 2019.

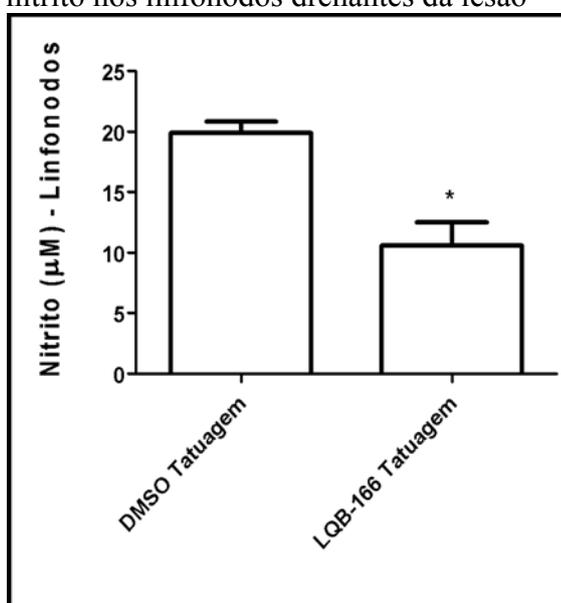
Gráfico 24 – Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 2) - carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata



Fonte: A autora, 2019.

Hamsters (3-4/grupo) foram infectados com *L. (V.) braziliensis* na pata traseira e tratados a partir do estabelecimento da lesão (cinco semanas após a infecção), com LQB-166 (2,5 µg/kg) por tatuagem duas vezes por semana por duas semanas. Controles foram animais tratados com DMSO por tatuagem. Curso da lesão antes e após o tratamento (Gráfico 23). Carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata (Gráfico 24). Dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão (Gráfico 25). Teste ANOVA pós teste Tukey * $p < 0,05$ *** $p < 0,001$.

Gráfico 25 – Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 2) - dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão



Fonte: A autora, 2019.

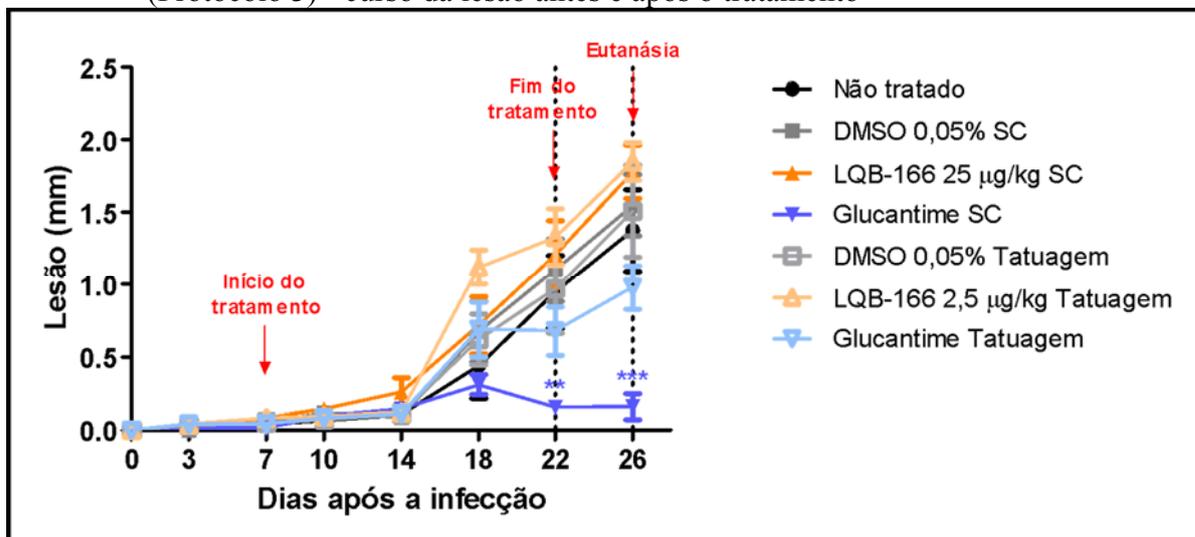
A fim de comparar a atividade *in vivo* da LQB-166 com um fármaco de referência, realizamos o protocolo 3 no qual incluímos também o Glucantime como tratamento, nas duas vias de administração testadas. Observamos que apenas o grupo tratado com Glucantime pela via subcutânea reduziu significativamente o tamanho da lesão dos animais, embora o Glucantime via tatuagem tenha apresentado uma lesão também um pouco menor do que os outros grupos (Gráfico 26).

Mais uma vez, os grupos tratados com a LQB-166 pelas duas vias testadas (SC e tatuagem) reduziram a carga parasitária, corroborando sua atividade local (Gráfico 27). Os grupos tratados com Glucantime também tiveram a carga parasitária reduzida. Não observamos diferenças estatísticas entre as cargas parasitárias de nenhum grupo tratado,

indicando que a atividade local da LQB-166 *in vivo* pode ser semelhante a do Glucantime (Gráfico 27).

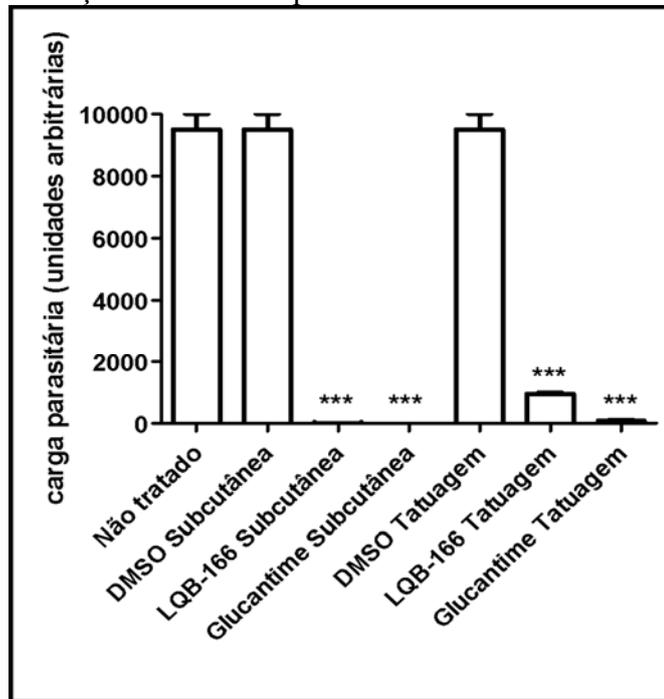
Nos Gráficos 28 e 29 indicamos a dosagem de nitrito realizada nas patas e linfonodos drenantes da lesão, respectivamente. Observamos um padrão similar nas duas análises, onde os grupos tratados via SC com DMSO (controle) e LQB-166 tiveram uma maior produção de nitrito, enquanto o grupo tratado com Glucantime SC apresentou menor produção. O mesmo padrão se repete quando observamos o peso dos linfonodos (Gráfico 30), o que sugere uma correlação entre o tamanho maior de lesão/linfonodo e maior produção de nitrito (Gráficos 31 e 32).

Gráfico 26 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - curso da lesão antes e após o tratamento



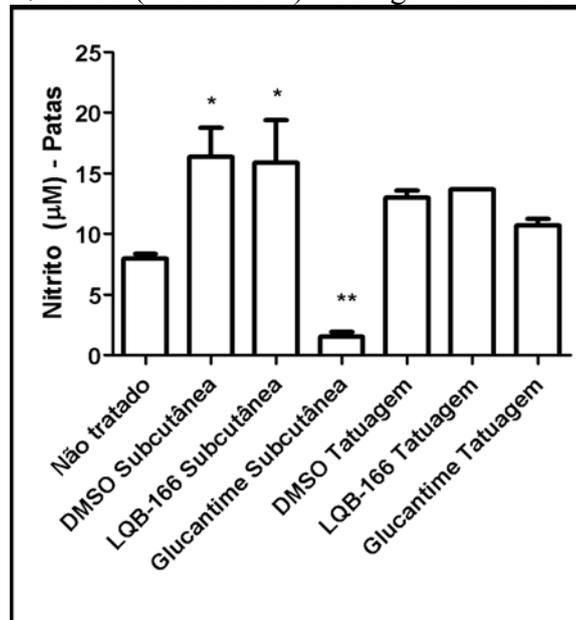
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 27 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata



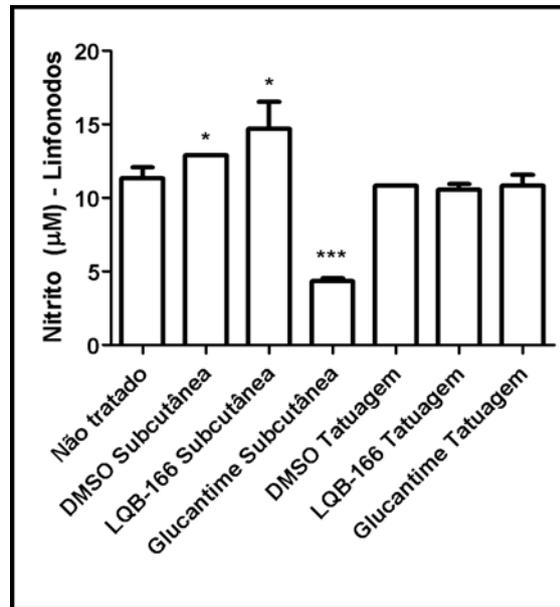
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 28 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - dosagem de nitrito na lesão



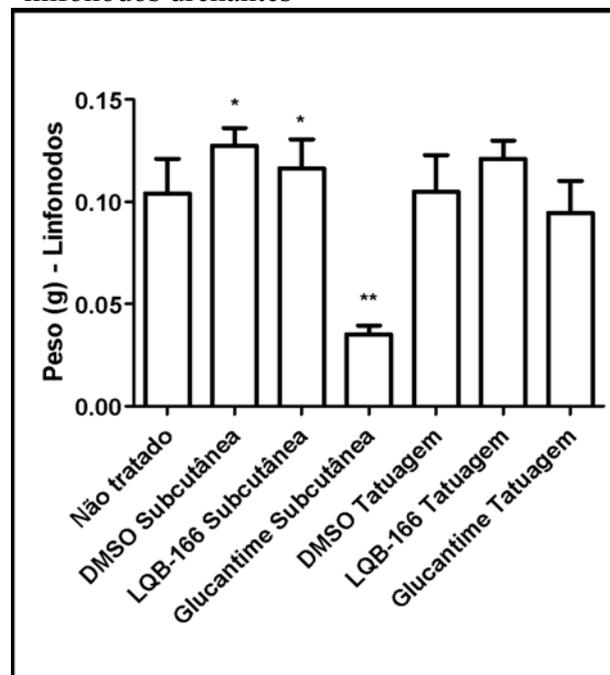
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 29 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão



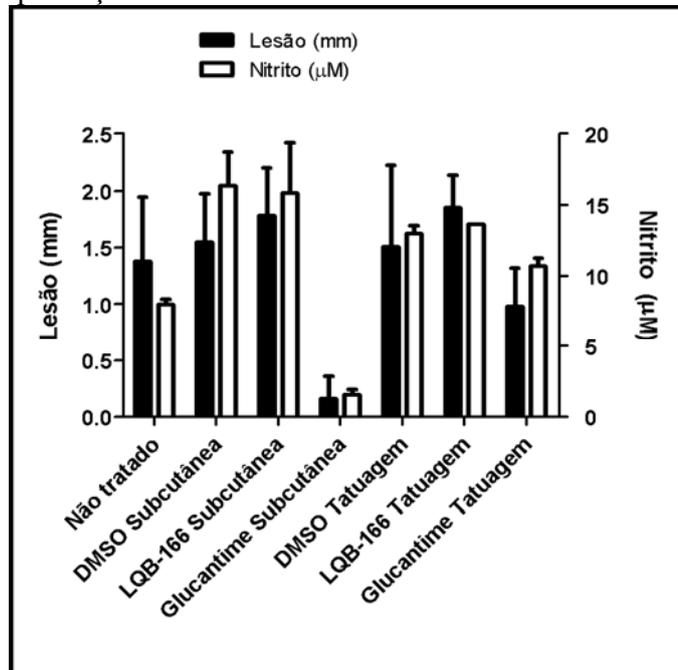
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 30 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - peso dos linfonodos drenantes



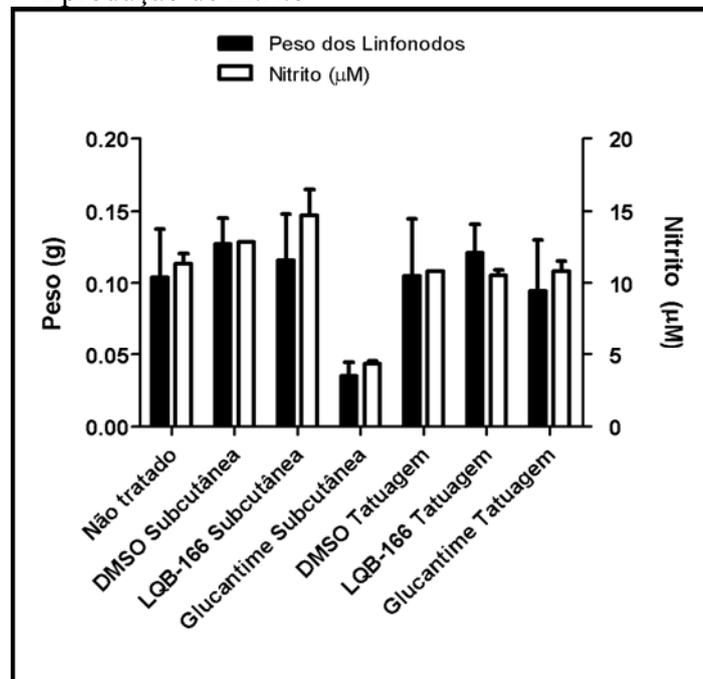
Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 31 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - correlação tamanho da lesão X produção de nitrito



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 32 - Atividade da LQB-166 em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* (Protocolo 3) - correlação peso dos linfonodos X produção de nitrito



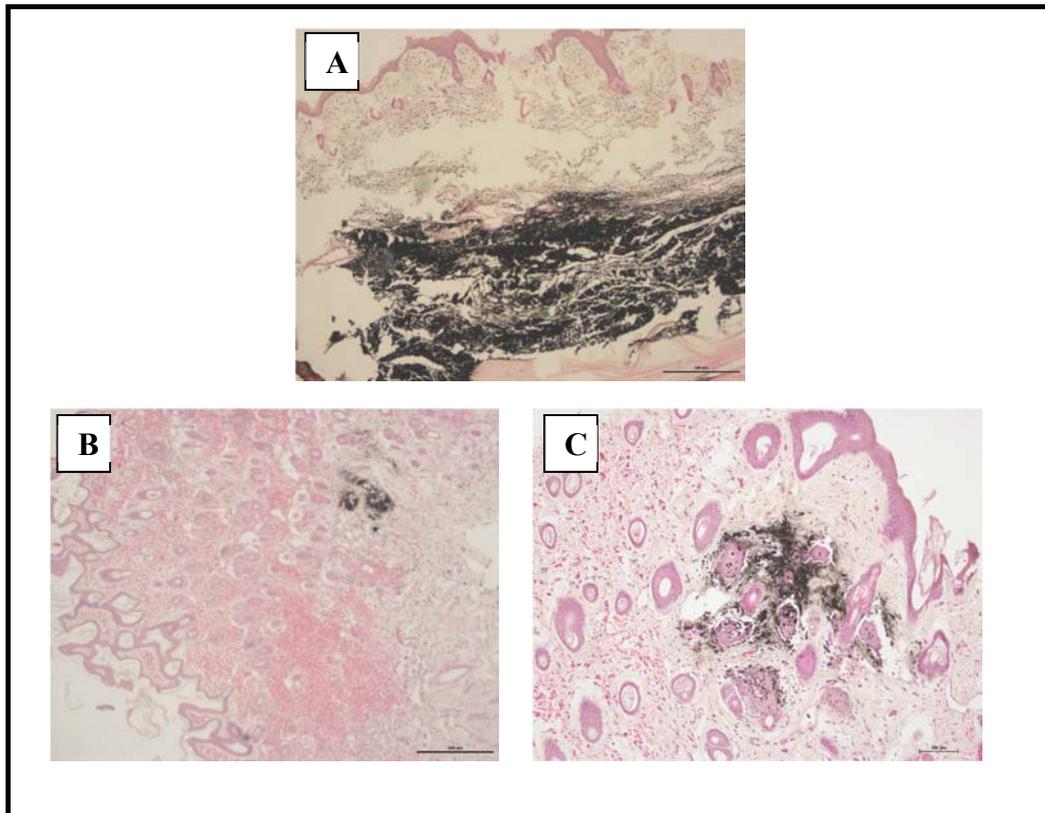
Fonte: A autora, 2019.

Hamsters dourados (3-4/grupo) foram infectados com *L. (V.) braziliensis* na pata traseira e tratados após uma semana de infecção com LQB-166 por via subcutânea (25 µg/kg) três vezes por semana ou por tatuagem (2,5 µg/kg) duas vezes por semana por três semanas. Controles foram animais não tratados ou tratados com DMSO subcutânea e tatuagem. (Gráfico 26) Curso da lesão antes e após o tratamento (Gráfico 27) Carga parasitária avaliada por diluição limitante da pata (Gráfico 28) Dosagem de nitrito na lesão. (Gráfico 29) Dosagem de nitrito nos linfonodos drenantes da lesão. (Gráfico 30) Peso dos linfonodos drenantes (Gráfico 31) Correlação tamanho da lesão X produção de nitrito (Gráfico 32) Correlação peso dos linfonodos X produção de nitrito. Teste ANOVA pós teste Tukey *p<0,05 **p<0,005 ***p<0,001

3.11 Comparação do padrão de distribuição da tinta de tatuagem usando as vias subcutânea e a tatuagem para administração

A fim de simular como se comportaria a droga em relação a distribuição pela pele de acordo com as vias de administração usadas (via subcutânea e tatuagem), fizemos um experimento injetando tinta de tatuagem. Observamos que a tinta injetada via subcutânea se espalha por todo o tecido, derme profunda e tecido subcutâneo (Figura 12A), enquanto a tinta injetada via tatuagem se concentra a derme, em menor quantidade (Figura 12B). Aumentando o tamanho, conseguimos observar a tinta internalizada por células teciduais (Figura 12C).

Figura 12 – Distribuição da tinta na pele



Legenda: Via subcutânea em objetiva de 4x (A), Via tatuagem em aumento de 4x (B), Via tatuagem em objetiva de 10x (C).

Fonte: A autora, 2019.

A tinta de tatuagem preta foi injetada ou tatuada na pata de hamsters e dois dias depois o tecido foi retirado, fixado e corado em HE para realização de análise histológica.

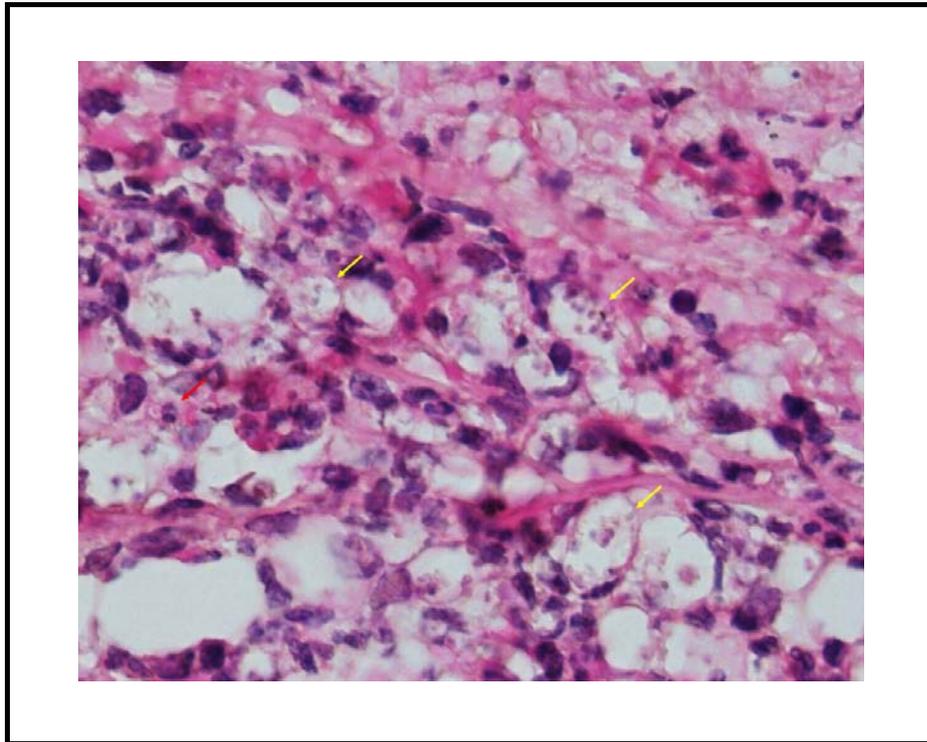
3.12 Análise histológica das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados localmente

A avaliação histológica foi realizada nos tecidos das patas (lesões) dos animais infectados e tratados, a fim de identificar possíveis alterações devido ao tratamento ou via de administração.

Na Figura 13, imagem histológica da lesão de animal infectado e não tratado, observamos infiltrado inflamatório composto predominantemente por macrófagos ativados, com grandes vacúolos intracitoplasmáticos repletos de amastigotas de *Leishmania* (seta amarela) e presença de raros neutrófilos (seta vermelha).

As lesões de animais infectados e tratados com DMSO via subcutânea (Figura 14A) apresentam o mesmo perfil histopatológico que o não tratado. Já no DMSO via tatuagem, observamos, além disso, um maior número de neutrófilos (Figura 14B). No tratamento com a LQB-166 (Figuras 14C e 14D) observamos infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, além de raros neutrófilos. Não foram observadas amastigotas intracelulares. Na LQB-166 administrada via subcutânea (Figura 14C) o infiltrado inflamatório é mais discreto e mais localizado do que na via tatuagem, também sem a presença de amastigotas (Figura 14D). A histologia das lesões dos animais tratados com Glucantime via subcutânea (Figura 14E) apresenta tecido com epiderme, derme e porção de tecido muscular de aspecto usual, semelhante a histologia do tecido da pata de animal não infectado (Figura 15). O tratamento com Glucantime via tatuagem (Figura 14F) apresenta tecido com infiltrado inflamatório misto (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos) e ausência de amastigotas.

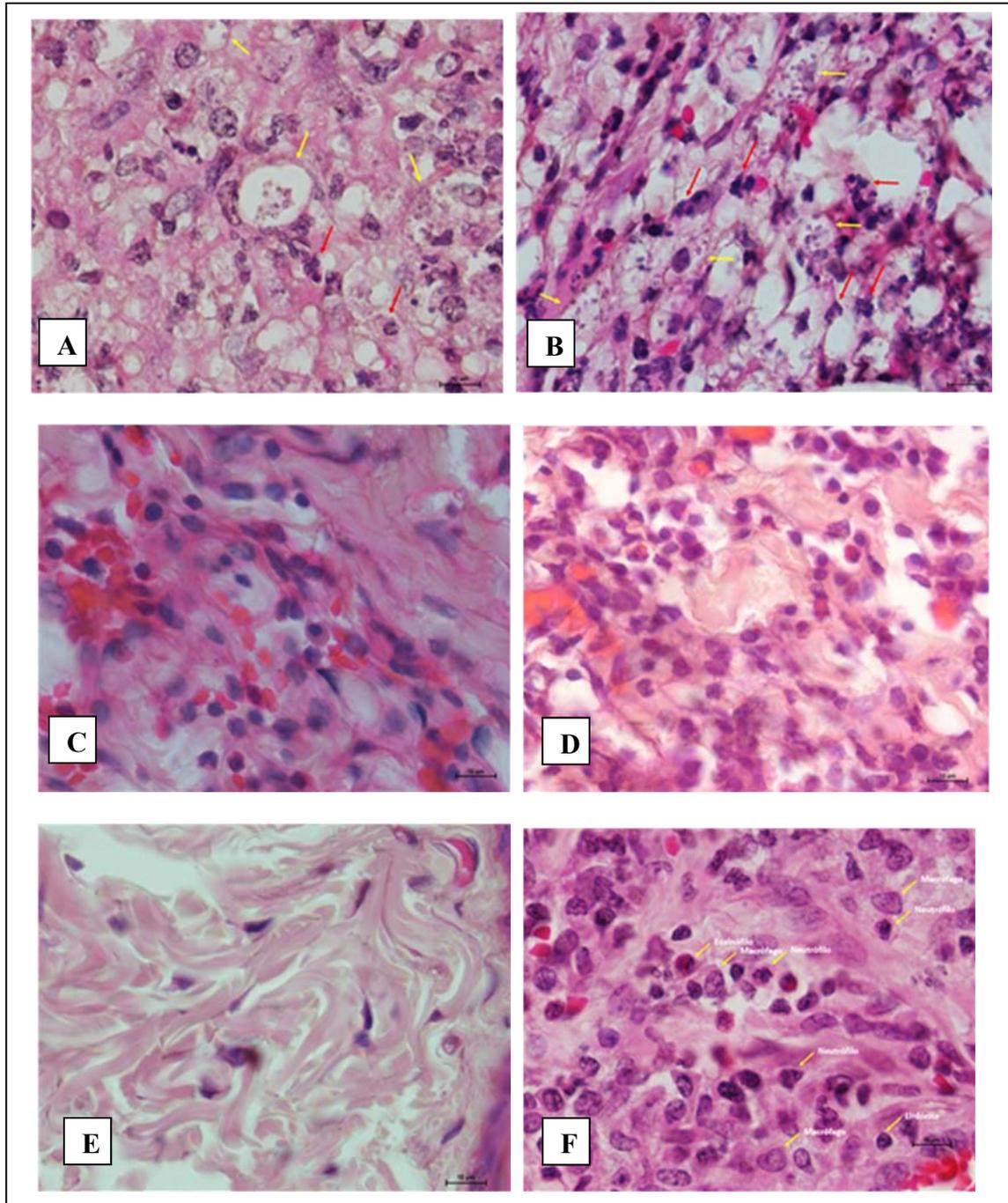
Figura 13 – Imagem histológica da lesão de hamster infectado com *L. (V.) braziliensis*



Fonte: A autora, 2019.

Um fragmento da pele da pata após 26 dias de infecção foi fixado, processado e corado com HE. Observação realizada em um microscópio com aumento de 100x.

Figura 14 – Imagem histológica da lesão após tratamentos



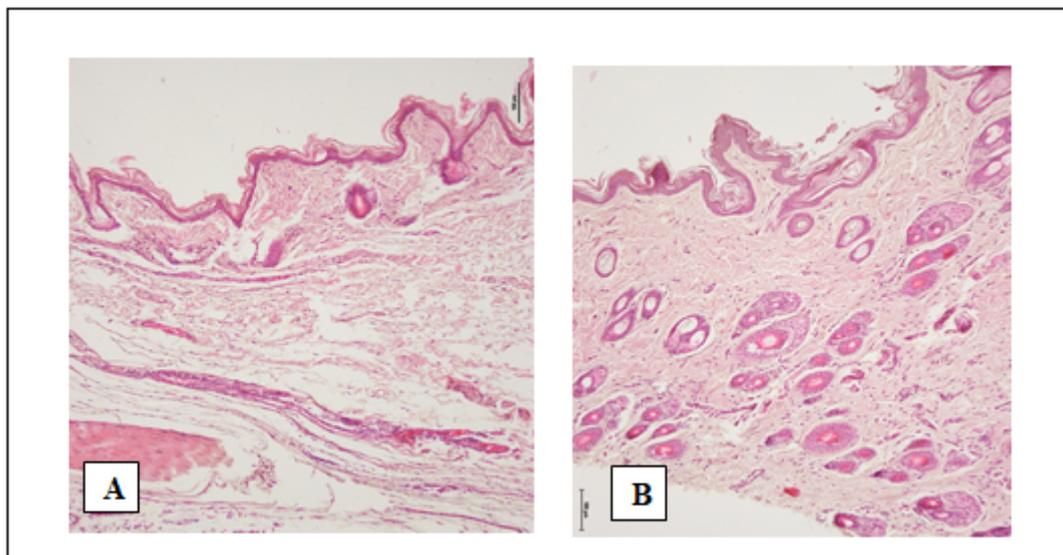
Legenda: DMSO SC (Figura 14A), DMSO tatuagem (Figura 14B), LQB-166 SC (Figura 14C), LQB-166 tatuagem (Figura 14D), Glucantime SC (Figura 14E) e Glucantime tatuagem (Figura 14F).

Nota: Nas Figuras 14A e 14B: Seta amarela: amastigotas intracelulares. Seta vermelha: neutrófilos.

Fonte: A autora, 2019.

Um fragmento do tecido da lesão da pata infectada de cada animal de cada grupo após duas semanas de tratamento foi fixado, processado e corado com HE. Observação em um microscópio com aumento de 100x.

Figura 15 – Imagem histológica de tecido de animal tratado com Glucantime e não infectado



Legenda: Glucantime via subcutânea (Figura 15A) e Tecido de animal não infectado (Figura 15B).
Fonte: A autora, 2019.

Um fragmento da pele da pata infectada de cada animal de cada grupo após duas semanas de tratamento foi fixado, processado e corado com HE. Observação em um microscópio com objetiva de 40x.

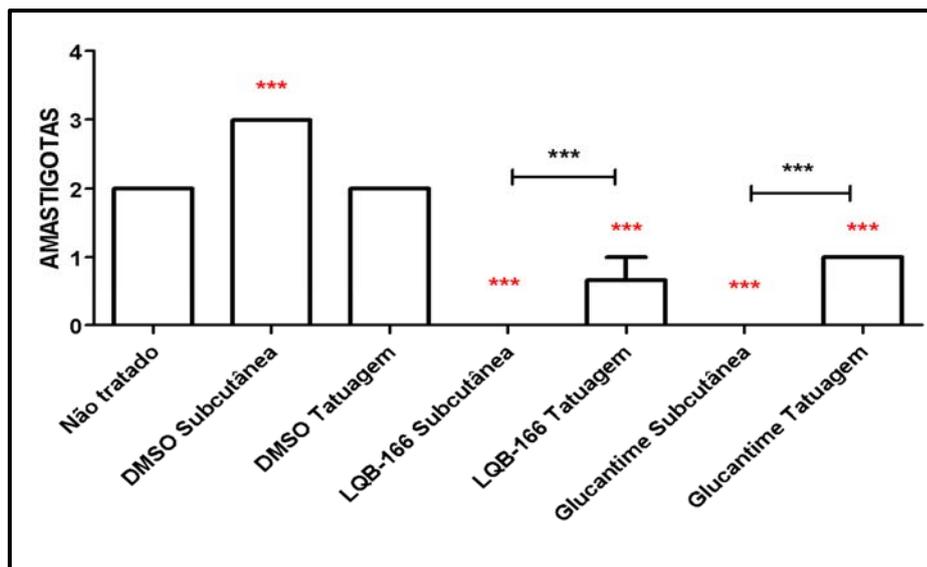
3.13 **Escore das alterações histológicas das lesões de hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis* e tratados localmente com LQB-166 ou Glucantime**

Para quantificar as análises da histopatologia, os resultados das alterações observadas foram expressos em escore para cada parâmetro analisado. Observamos que em relação a presença de amastigotas, o grupo tratado com DMSO via subcutânea apresentou maior escore do que o grupo não tratado enquanto todos os grupos tratados com a LQB-166 e Glucantime apresentaram um menor escore, indicando uma redução da carga parasitária (Gráficos 33 e 34) e corroborando com os dados da diluição limitante (Gráfico 27). Além disso, observamos

que os grupos tratados por via subcutânea têm um menor escore de amastigotas do que tratados por via tatuagem (Gráfico 33).

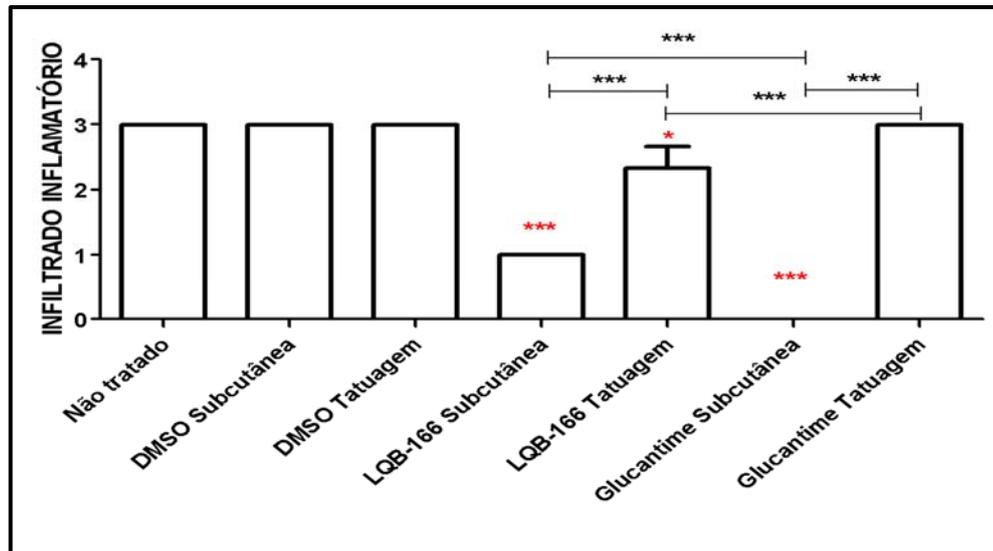
Em relação ao infiltrado inflamatório, observamos que os grupos tratados por via subcutânea apresentaram menor escore em relação aos grupos controles e também em relação aos tratados por via tatuagem. Comparando as vias de administração, vemos que o grupo tratado via subcutânea com LQB-166 apresentou maior escore em relação ao grupo tratado via subcutânea com Glucantime. Ao contrário, o grupo tratado via tatuagem com com LQB-166 apresentou menor escore em relação ao grupo tratado via tatuagem com Glucantime (Gráfico 34).

Gráfico 33 – Escore de parâmetros relacionados a infecção analisados por histologia - presença de amastigotas



Fonte: A autora, 2019.

Gráfico 34 – Escore de parâmetros relacionados a infecção analisados por histologia - infiltrado inflamatório



Fonte: A autora, 2019.

Um fragmento da pele da pata infectada de cada animal de cada grupo foi fixado em formol, processado, emblocado e corado (HE) para análise em microscópio. Os resultados foram expressos em critério de escore de acordo com a intensidade da ocorrência de cada parâmetro histopatológico, variando de não observado (escore=0), pouco observado (escore=1), moderadamente observado (escore=2) ou muito observado (escore=3). Os parâmetros histológicos analisados foram presença de amastigotas (Gráfico 33) e infiltrado inflamatório (Gráfico 34). Teste ANOVA pós teste Tukey *** $p < 0,001$ em relação ao controle não tratado, *** $p < 0,001$ em relação marcada no gráfico.

4 DISCUSSÃO

Antimoniais pentavalentes representam o tratamento clássico para todas as formas clínicas de leishmaniose e ainda hoje são fármacos de primeira escolha para tratar esta doença no Brasil. Em casos de falha terapêutica, recomenda-se a anfotericina B ou a pentamidina como segunda linha de tratamento (ALIANÇA et al., 2014; PIMENTEL et al., 2011; TIWARI et al., 2018). No entanto, esses fármacos são muito tóxicos e administrados por via parenteral, o que contribui para aumento do custo operacional e também para a falha terapêutica em função da baixa adesão do paciente ao tratamento. Além disso, a resistência do parasito tem aumentado a esses fármacos, o que torna a busca por produtos menos tóxicos, mais eficazes e de menor custo ainda mais urgente (ANDRADE-NETO et al., 2018; MENDONÇA et al., 2017).

A LQB-166 (3-fenil-lausona) é uma naftoquinona sintética análoga ao lapachol, que demonstrou previamente atividade sobre células tumorais, e também sobre promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Dentre as diversas moléculas testadas, a LQB-166 se destacou entre as três mais ativas e menos tóxicas (GOMES et al., 2017).

No presente estudo, demonstramos que a LQB-166 apresenta atividade *in vitro* contra ambas formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*: promastigotas e amastigotas intracelulares, e baixa toxicidade em diferentes células de mamíferos. Esse resultado não somente corrobora com os resultados de Gomes et al. (2017), mas também indica que a atividade anti-*Leishmania* da LQB-166 se estende ao complexo *Viannia*, associada a forma mucosa da leishmaniose tegumentar americana e de difícil tratamento.

Neste trabalho, testamos a toxicidade da LQB-166 em três tipos células de mamíferos de linhagem: macrófagos murinos (RAW 264.7), monócitos e macrófagos humanos (THP-1). Na Figura 10 observamos que a LQB-166 apresentou $CC_{50} = 825 \pm 64 \mu\text{M}$ para macrófagos murinos. Gomes et al. (2017) determinaram a CC_{50} da mesma molécula em $115,2 \mu\text{M}$, um número bem inferior ao encontrado em nosso trabalho. Entretanto, mesmo que tenha sido usada a mesma metodologia para avaliar a toxicidade (ensaio com MTT) e um tempo maior de exposição à molécula, os autores usaram macrófagos peritoneais de camundongos. É possível que a diferença encontrada seja esta relacionada ao tipo celular utilizado. Processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares podem ser diferentes em células imortalizadas, o que pode influenciar em resultados de ensaios de citotoxicidade (HOU et al., 2013; MESTIERI et al., 2017).

Em relação as células humanas de linhagem, os monócitos foram tratados com a LQB-166 por 12 horas, enquanto os macrófagos de THP-1 por 24 horas. Essa diferença se deve ao fato de os monócitos se multiplicarem rapidamente (CHANPUT et al., 2014), e queríamos ter certeza que a concentração inicial usada não seria significativamente afetada. Observamos uma diferença na toxicidade dessas células (Gráficos 2 e 3). Enquanto os monócitos apresentaram $CC_{50} = 767 \pm 76 \mu\text{M}$ (Gráfico 2), os macrófagos tiveram $CC_{50} = 2194 \pm 74 \mu\text{M}$ (Gráfico 3), cerca de três vezes mais alta. Macrófagos são células diferenciadas e mais especializadas, e isso pode conferir maior resistência a danos, uma vez que são altamente plásticos e adaptáveis em relação aos monócitos (HOEKSEMA; WINTHER, 2016).

Nos ensaios com amastigotas intracelulares, os macrófagos da linhagem humana THP-1, foram infectados e incubados com meio de cultura por 24 h antes do tratamento com a LQB-166. Este protocolo é importante porque garante a diferenciação das promastigotas internalizadas em amastigotas (KRAM et al., 2008; SIQUEIRA-NETO et al., 2012), tornando mais clara a ação anti-amastigota da molécula. Em trabalho anterior do nosso grupo também observamos que a ação de naftoquinonas análogas do lapachol pode ser melhor avaliada usando esse protocolo (MEIRA, 2012). A IC_{50} para amastigotas foi estimada $149 \pm 13 \mu\text{M}$, e observamos uma redução tanto no índice de infecção quanto no percentual de macrófagos infectados (Gráfico 4). Previamente havíamos determinado a IC_{50} dessa molécula em $193 \pm 19 \mu\text{M}$ (MEIRA, 2014), no entanto usamos macrófagos primários de camundongos como célula hospedeiras, e as concentrações da IC_{50} são relativamente próximas. O lapachol, molécula precursora da LQB-166, apresenta atividade anti-amastigota em *L. (V.) braziliensis* na mesma faixa de concentração, sendo em $300 \mu\text{M}$ tóxico para 80% das células (MEIRA, 2012; TEIXEIRA et al., 2001).

Dessa maneira, calculamos o índice de seletividade da molécula ($IS=CC_{50}/IC_{50}$) em 15, indicando que a LQB-166 é uma molécula seletivamente tóxica para o parasito, e, portanto, candidata a ensaios pré-clínicos em modelos animais.

Naftoquinonas tem entre suas atividades biológicas descritas, ação imunomoduladora além de antiparasitária (COSTA-SILVA et al., 2017; KAYSER et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2010; SANTOS et al., 2000; SCHUCK et al., 2013). Uma vez que nossos dados mostraram atividade anti-amastigota da naftoquinona LQB-166 sobre a *L. braziliensis*, iniciamos a investigação do seu modo de ação direto sobre o parasito, usando a forma promastigota, e a possível ação da molécula sobre as células hospedeiras (macrófagos), avaliando sua funcionalidade.

A LQB-166 induziu a fragmentação do DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (Figura 11), sugerindo indução de morte por apoptose do parasito (CROWLEY et al., 2016; MAJTNEROVÁ; ROUŠAR, 2018). Diferentes naftoquinonas induzem morte por apoptose tanto de células tumorais como de protozoários (CORREA et al., 2009; DOS ANJOS et al., 2016; LIU et al., 2018; XIAOLI et al., 2017). A fragmentação do DNA em *Leishmania* induzida por quinonas e naftoquinonas também já foi descrita (AWASTHI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2013). A pterocarpanquinona LQB-118, uma molécula construída pela união do lapachol e de um pterocarpano, induziu morte por apoptose em amastigotas e promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (COSTA et al 2014) e *L. (L.) amazonensis* (RIBEIRO et al. 2013).

A sobrevivência da *Leishmania* dentro da célula hospedeira depende do metabolismo tiol-redox que neutraliza os radicais tóxicos (SINGH et al., 2014). Cada vez mais, têm-se estudado moléculas que tem efeitos citotóxicos mediado por EROs, o que leva os parasitos a enfrentarem um estresse oxidativo ainda maior (MOREIRA et al., 2011). Compostos que contém uma quinona em sua estrutura geram estresse oxidativo promovido pelo ciclo redox destas moléculas, e os microrganismos são mais sensíveis a esse estresse do que as células hospedeiras (DA SILVA et al., 2003; GUO et al., 2012). Naftoquinonas podem ter mecanismos bioativos oxidantes ou antioxidantes, a depender do tipo de molécula, concentração e tempo de tratamento (QIU et al., 2017).

Nossos dados mostraram que a LQB-166 foi capaz de promover o aumento da produção de EROs nas promastigotas (Gráfico 11), o que pode ter contribuído para a toxicidade dessa molécula para o parasito e a fragmentação do seu DNA, levando-o a morte. Derivados do lapachol já mostraram efeito semelhante em tripanossomatídeos, tanto em *Trypanosoma cruzi* (BOMBAÇA et al., 2018) como em *Leishmania* (COSTA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2013), promovendo aumento de EROs e indução de morte celular por apoptose.

Dentre os principais mecanismos microbicidas do macrófago está a produção de radicais tóxicos de nitrogênio, como o óxido nítrico (LEE et al., 2017). Já foi demonstrado que naftoquinonas inibem a produção de óxido nítrico (CHENG et al., 2008; PINHO et al., 2011). Neste trabalho, corroboramos essa informação, uma vez que os macrófagos tratados com a LQB-166 não foram capazes de produzir óxido nítrico (Gráficos 12 e 13). Essa inibição da produção de óxido nítrico pelas naftoquinonas se deve a uma desregulação da via do NFkB, que bloqueia a transcrição da enzima iNOS (CHENG et al., 2008).

No âmbito de doenças inflamatórias, como é o caso da leishmaniose mucosa, que pode ser causada pela *L. (V.) braziliensis*, o controle da produção de óxido nítrico promovida por fármacos pode ser favorável (CHENG et al., 2008). Soares-Bezerra et al. (2004) destacam moléculas inibidoras da produção de óxido nítrico como potenciais fármacos anti-*Leishmania*, uma vez que já foi mostrado que *L. amazonensis* pode produzir óxido nítrico, e essa inibição pode evitar que o parasito se proteja do ambiente inóspito do macrófago.

Outro indício de ativação de macrófagos é a produção de citocinas pró-inflamatórias, que são importantes mediadores na resposta contra *Leishmania* (DUQUE; DESCOTEAUX, 2014; SOULAT; BAGDAN, 2017). Houve um significativo aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12 e IFN) pelos macrófagos tratados *in vitro* com a LQB-166 (Gráficos 14, 15 e 16).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória, capaz de inibir a produção de óxido nítrico (HORTA et al., 2012), e observamos níveis aumentados dessa citocina nos macrófagos tratados *in vitro* com a LQB-166 (Gráfico 16), o que pode também ter contribuído para a inibição da produção de óxido nítrico pela molécula. Além disso, a IL-10 pode reduzir o dano tecidual causado pela leishmaniose cutânea e mucosa (ABDOLI et al., 2017), o que seria uma vantagem do tratamento com a LQB-166 nas lesões leishmanióticas.

De maneira geral, há uma modulação de citocinas quando os macrófagos foram submetidos ao tratamento com a LQB-166, indicando que essa molécula tem também um efeito imunomodulador. Observamos que o tratamento com a LQB-166 nas concentrações 200 μM e 400 μM aumentou significativamente o índice de fagocitose de macrófagos murinos de linhagem, em relação ao controle não tratado (Gráficos 14, 15, 16 e 17). Esses resultados corroboram com o aumento de citocinas pró-inflamatórias observados nos macrófagos tratados.

De modo semelhante, foi demonstrado que a miltefosina apresenta efeito modulador de macrófagos. Esse fármaco é capaz de aumentar a fagocitose de macrófagos e neutrófilos, e reduzir a produção de óxido nítrico em macrófagos murinos não-infectados (PONTE et al., 2012).

Para testar *in vivo* o potencial terapêutico da LQB-166 por vias locais de administração, usamos o hamster como modelo de infecção para *L. (V.) braziliensis*, uma vez que se trata de animais susceptíveis, no qual a lesão se assemelha a lesão humana (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2016). O tratamento local demanda menos quantidade da molécula e conseqüentemente reduz a absorção sistêmica e a toxicidade. O tratamento com liberação de medicações diretamente em lesões cutâneas tem se mostrado importante na terapia

dermatológica (ARBACHE; GODOY, 2017; KANEMARU et al., 2018). Injeções intralesionais são efetivas por várias razões, entre elas a fácil administração e a boa segurança. A pele serve também como um reservatório, permitindo que a medicação fique depositada na derme por mais tempo, resultando numa terapia prolongada, ao mesmo tempo que minimiza ou evita efeitos adversos de uma administração sistêmica (MATHES; ALGUIRE, 2017).

O tratamento com a LQB-166, tanto pela via subcutânea como por tatuagem, reduziu significativamente a carga parasitária na lesão dos animais, mas não diminuiu seu tamanho (Gráficos 21 a 32). É possível que o tratamento local tenha contribuído para a manutenção da inflamação, uma vez que foi demonstrado que existe uma resposta inflamatória e um recrutamento de neutrófilos causado pela lesão tecidual produzida pela própria perfuração da agulha (MACDANIEL et al., 2014; RIBEIRO-GOMES et al., 2012).

Interessantemente, também observamos que o tratamento com o Glucantime via tatuagem se mostrou eficaz. Até o momento, não existem dados na literatura sugerindo esse tipo de via de administração com esse fármaco. Por via subcutânea, no entanto, já foi demonstrado que o Glucantime é efetivo, tanto em hamsters como em humanos (CORPAS-LOPEZ et al., 2016; RAMALHO et al., 2018).

Em relação a produção de nitrito no sobrenadante do macerado das lesões, observamos que os grupos tratados com DMSO e LQB-166 apresentaram aumento na produção (Gráficos 28 e 29), o contrário do que observamos tanto *in vitro* (Gráficos 12 e 13) como no protocolo anterior (Gráfico 25). Isso pode ser devido à ação pró- inflamatória promovida pelo DMSO, quando injetado via intralesional (COLUCCI et al., 2008). Além disso, provavelmente esse aumento de NO está relacionado à inflamação causada pela perfuração da agulha, já que esse processo inflamatório permanece por cerca de 14 dias (GOPEE et al., 2005), e a dosagem foi feita 4 dias após o último tratamento. Nos grupos tratados com Glucantime uma diminuição do NO (Gráficos 28 e 29). Uma vez que o Glucantime não foi solubilizado em DMSO e observamos ausência de lesão e inflamação nos grupos tratados, logo se explica os níveis de NO mais baixos. Já foi visto que em pacientes tratados com Glucantime via intramuscular, há um decréscimo na resposta inflamatória e expressão de citocinas inflamatórias como IFN e IL-12 (VIANA et al., 2013).

O grupo tratado com Glucantime via tatuagem apresentou uma maior produção de NO que o grupo tratado por via subcutânea (Gráfico 28), e isso pode ser explicado pelo processo inflamatório que a tatuagem em si promove (GOPEE et al., 2005; SATO et al., 1999).

Para melhor entender a eficácia do tratamento e o processo inflamatório, avaliamos aspectos histopatológicos das lesões dos animais. Observamos que o número de amastigotas

no tecido foi compatível com os resultados obtidos da diluição limitante (Gráfico 27), indicando que os grupos tratados com a LQB-166 e Glucantime tanto via subcutânea como via tatuagem tiveram sua carga parasitária significativamente reduzida em relação ao controle (Figuras 14C a 14F).

Em relação ao processo inflamatório, observamos que os grupos controles infectados não-tratados (Figura 13) e tratados com DMSO (Figuras 14A e 14B) apresentam aspecto similar, com presença de macrófagos ativados e raros neutrófilos. Esse perfil é compatível com o estudo de Ribeiro-Romão et al. (2014) acerca da infecção por *L. (V.) braziliensis* em hamsters.

Nos animais tratados com a LQB-166, observamos que o tratamento pela via subcutânea apresentou inflamação mais discreta (Figura 14C) quando comparada com a via tatuagem (Figura 14D), há também significativamente menos células inflamatórias em relação aos controles, o que parece derivar da menor carga parasitária observada no tecido.

No grupo tratado com Glucantime pela via subcutânea, não observamos presença de células inflamatórias (Figura 14E), dado comparável à pele de animal normal (Figura 15B). Em estudo com pacientes de leishmaniose tegumentar americana tratados com Glucantime via intramuscular, foi observado também que após o tratamento, o tecido da lesão é histologicamente semelhante ao de uma pele normal (VIANA et al., 2013). No grupo tratado por tatuagem (Figura 14F) observamos um perfil inflamatório misto (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos). Esses resultados também corroboram com a baixa produção de NO observada na lesão dos animais tratados com Glucantime subcutâneo (Gráfico 28).

Podemos observar uma diferença entre as vias de administração na ação antiparasitária, sendo a via subcutânea capaz de reduzir mais o número de amastigotas e consequentemente o processo inflamatório. É importante observar que, na administração pela via tatuagem foi injetado mais de 10x menos molécula e, ainda assim, houve redução da carga parasitária na lesão. Isso demonstra que a tatuagem é uma via promissora para o tratamento de leishmaniose cutânea experimental.

No único trabalho já publicado utilizando tatuagem como via de administração de droga para leishmaniose cutânea experimental (SHIO et al., 2014), a molécula anti-*Leishmania* em questão foi injetada em uma formulação lipossomal. Os lipossomas são carreadores de moléculas que apresentam como vantagens a alta biocompatibilidade, maior meia-vida da droga, menor toxicidade e maior eficiência (LI et al., 2019). No presente trabalho, a LQB-166 solubilizada em DMSO foi administrada diluída em PBS, o que destaca sua ação e o seu potencial terapêutico.

Em resumo esses resultados demonstram que a naftoquinona sintética LQB-166 tem ação sobre a *L. (V). braziliensis* e apresenta-se como uma molécula promissora para o tratamento da leishmaniose cutânea por vias locais de administração.

CONCLUSÃO

A naftoquinona LQB-166 tem ação tempo e dose-dependente *in vitro* sobre formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, com indícios de indução a morte celular programada e aumento da produção de EROs nos parasitos. Ainda *in vitro*, tem ação anti-amastigota com $IC_{50} = 149 \pm 13 \mu M$, e relativa baixa citotoxicidade sobre células de mamíferos (CC_{50} em macrófagos humanos de linhagem calculada em $2194 \pm 74 \mu M$), apresentando índice de seletividade $IS = 15$.

A LQB-166 foi capaz ainda de aumentar a capacidade fagocítica de macrófagos e modular a sua produção de citocinas pró-inflamatórias, aumentando IL-6, IL-12 e IFN, porém não alterou a produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*.

A atividade terapêutica da LQB-166 administrada pelas vias subcutânea e por tatuagem em hamsters infectados com *L. (V.) braziliensis*, não diminuiu o tamanho da lesão, mas reduziu significativamente a carga parasitária. Esse dado foi corroborado com a análise histopatológica das lesões, com uma clara redução das amastigotas nos animais tratados. Foi observado também que o tratamento por via local com Glucantime é eficaz, sobretudo pela via subcutânea, onde a pele apresentou aspecto normal, similar ao não infectado.

Esses resultados demonstram que a LQB-166 apresenta-se como uma molécula promissora para o tratamento local da leishmaniose cutânea. E que além da via subcutânea, a tatuagem é também uma via possível de administração de moléculas para tratar a leishmaniose cutânea experimental.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. L. et al. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Exp. Parasitol.* v. 142, p. 83-90, 2014.
- ABDOLI, A. et al. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* v. 51, p.15-26, 2017.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 10, n. 3, 2016.
- ALIANÇA, A.S.S. et al. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. *Molecules*, v.19, p. 14052-14065, 2014.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 3, p.497-506, 2011.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One*, v.7, n. 5, 2012.
- ANDRADE-NETO, V.V. et al (2018) Leishmaniasis treatment: update of possibilities for drug repurposing. *Front Biosci (Landmark Ed)*. v. 23, p. 967-996, 2018.
- ANDREWS, K.T., FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T.S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, p. 95–111, 2014.
- ARBACHE, S.; GODOY, C. E. Microinfusão de medicamentos na pele através de máquina de tatuagem. *Surgical Cosmetic Dermatology*, v.5, n. 1, p.70-74, 2013.
- AWASTHI, B.P. et al. Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. *Apoptosis*, v. 8, p.941-953, 2016.
- BACELLAR, O.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. Resposta Imune na Leishmaniose Tegumentar Humana. In: BARRAL, A. ; COSTA, J. M. L. (Org.). *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. 8 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011. 235 p.
- BALASEGARAM, M. et al. Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis. *Expert Opinion Emerging Drugs*, v. 17, n. 4, p.493-510, 2012.
- BARBOSA, M. I. F. Antiparasitic activities of novel ruthenium/lapachol complexes. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v.136, p. 33–39, 2014.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 1097–1106, 2007.

- BOMBAÇA, A.C.S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-Trypanosoma cruzi activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. *Free Radic Biol Med.*, v. 130, p.408-418, 2018.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Nota Técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA*. 2016. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/wp-content/uploads/2016/09/nota-tecnica.pdf>. Acesso em: 16 jun. 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 ed. Brasília, DF: Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.
- CAUCHETIER, E. et al. Therapeutic evaluation of free and liposome-encapsulated atovaquone in the treatment of murine leishmaniasis. *International Journal for Parasitology* v. 30, p. 777-783, 2000.
- CECILIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of leishmania, a successful parasite. *Frontiers in Immunology*, v.5, n. 480, 2014.
- CHANPUT, W.; MES, J. J.; WICHERS, H. J. THP-1 cell line: An in vitro cell model for immune modulation approach. *International Immunopharmacology*, v. 23, n. 1, p. 37–45, 2014.
- CHENG, Y.W. et al. Shikonin derivatives inhibited LPS-induced NOS in RAW 264.7 cells via downregulation of MAPK/NF-kappaB signaling. *Journal Ethnopharmacology*, v. 120, n. 2, p. 264-267, 2008.
- CHIU, Y.N. Skin tattooing as a novel approach for DNA vaccine delivery. *Journal of visualized experiments*, v. 18, n. 68, 2012.
- COLUCCI, M. et al. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacological Research*, v. 57, n. 6, p.419-425, 2008.
- CORPAS-LOPEZ, V. et al. Topical Treatment of Leishmania tropica Infection Using (–)- α Bisabolol Ointment in a Hamster Model: Effectiveness and Safety Assessment. *Journal of Natural Products*, v.79, n. 9, p. 2403–2407, 2016
- CORREA, G. et al. Cell death induction in Giardia lamblia: effect of beta-lapachone and starvation. *Parasitology Intertational*, v. 58, p. 424-437, 2009.
- COSTA, J. M. L. Modalidades Clínicas da Leishmaniose Tegumentar. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. (Orgs.). *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. 8 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011. 235 p.
- COSTA, L. et al. Pterocarpanquinone LQB-118 induces apoptosis in Leishmania (Viannia) braziliensis and controls lesions in infected hamsters. *PLoS One* , v.9, n. 10, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0109672.

COSTA-SILVA, T.A. et al. Nanoliposomal Buparvaquone Immunomodulates Leishmania infantum-Infected Macrophages and Is Highly Effective in a Murine Model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 61, n. 4, 2017. DOI: 10.1128 / AAC.02297-16

CROFT, S.L. et al. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.30, n. 6, p. 827-832, 1992.

CROWLEY, L.C. et al. Detection of DNA Fragmentation in Apoptotic Cells by TUNEL. *Cold Spring Harbor Protocols*, v.10, 2016. DOI: 10.1101 / pdb.prot087221

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. *Química. Nova*, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003.

DA SILVA, R. E. et al. Intralesional meglumine antimonate for the treatment of localised cutaneous leishmaniasis: a retrospective review of a Brazilian referral centre. *Memories of Instituto Oswaldo Cruz*, v. 111, n. 8, p. 512-516, 2016.

DE ARAÚJO, C. F. et al. *Leishmania braziliensis* and *Leishmania amazonensis* amastigote extracts differ in their enhancement effect on *Leishmania* infection when injected intradermally. *BMC Research Notes*, v.7, n. 70, 2014. DOI: 10.1186 / 1756-0500-7-70

DE ARAÚJO, M.V. et al. Evaluation on the leishmanicidal activity of 2-N,N'-dialkylamino-1,4-naphthoquinone derivatives. *Experimental Parasitology*, v.176, p.46-51, 2017.

DE ARAÚJO, M. V. et al. Synthesis, Leishmanicidal Activity and Theoretical Evaluations of a Series of Substituted bis-2-Hydroxy-1,4-Naphthoquinones. *Molecules*, v.19, n. 9, p. 15180-15195, 2014.

DEKREY, G. K. et al. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. *Infection and immunity*, v.66, n.2, p.827-829, 1998.

DOS ANJOS D. O. et al. Effects of a novel beta-lapachone derivative on Trypanosoma cruzi: parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. *International Journal for Parasitology: Grugs and Drug Resistance*, v. 6, n. 3, 207-219, 2016.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity*, v. 5 n. 491, 2014. DOI: 10.3389 / fimmu.2014.00491

ENSAFI, A. A. et al. Electrochemical study of quinone redox cycling: A novel application of DNA-based biosensors for monitoring biochemical reactions. *Bioelectrochemistry*, v.111, p. 15–22, 2016.

FARIS, R.M. et al. Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. *International Journal of Dermatology*, v. 32, n. 8, p.610-612, 1993.

FERREIRA, S.B. et al. β -lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. *Revista Virtual de Química*. v.2, n. 2, p. 140-160, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. *Highlights of prescribing information*. 2014. Disponível em:

https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2014/204684s000lbl.pdf. Acesso em: 14 jun. 2018.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. As Leishmanioses. 1997. Disponível em

http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/classifica__o_das_esp_cies.htm. Acesso em: 14 jun. 2018.

FREITAS-JUNIOR, L. H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v.2, p. 11–19, 2012.

FRENDSSEN, S.K. et al. Difference in Membrane Repair Capacity Between Cancer Cell Lines and a Normal Cell Line. *The Journal of Membrane Biology*, v. 249, p. 569–576, 2016.

FRIEDMAN, T. et al. Tattoo pigment in lymph nodes mimicking metastatic malignant melanoma. *Plastic and Reconstructive Surgery* v.111, n. 6, p. 2120-2122, 2003.

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research*, v.123, p.439-454, 2006.

GEIGER, A. et al. Escaping deleterious immune response in their hosts: lessons from Trypanosomatids. *Frontiers in Immunology* , v.7, n. 212, 2016. DOI: 10.3389 / fimmu.2016.00212

GOLLOB, K. J.; VIANA A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in human American leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunology*, v.36, n. 8, p. 367-376, 2014.

GOMES-SILVA, A. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology*, v. 140, p. 771-779, 2013.

GOMES, S.L.S. et al. Suzuki-Miyaura coupling between 3-iodolawsone and arylboronic acids. Synthesis of lapachol analogues with antineoplastic and antileishmanial activities. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 28, n. 8, p.1573-1584, 2017.

GOPEE, N.V. et al. Response of mouse skin to tattooing: use of SKH-1 mice as a surrogate model for human tattooing. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 209, n. 2, p.145-58, 2005.

GRINNAGE-PULLEY, T.; SCOTT, B.; PETERSEN, C.A. A mother's gift: Congenital transmission of trypanosoma and leishmania species. *PLoS Pathogens*, v. 12, 2016. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005302

GRYBCHUK, D. et al. RNA viruses in trypanosomatid parasites: a historical overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* , v.113, n. 4, 2018. DOI: 10.1590 / 0074-02760170487

GUO, J. et al. Study on cytotoxicity and structure-activity relationship of HL-7702 cell exposed to naphthoquinones. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.33, n. 3, p. 408-413, 2012.

HAZRA, S. et al. Evaluation of a diospyrin derivative as antileishmanial agent and potential modulator of ornithine decarboxylase of *Leishmania donovani*. *Experimental Parasitology* v.135, n. 2, p. 407-413, 2013.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy Dermatology*, v. 73, n. 6, p. p. 911-926, 2015.

HENDRICKX, S. et al. Experimental induction of paramomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n.5, 2012. DOI: 10.1371 / journal.pntd.0001664

HORTA, M.F. et al. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous leishmaniasis. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, 2012. DOI: 10.1155 / 2012/203818

HOU, A. et al. Comparison of gene expression profiles in primary and immortalized human pterygium fibroblast cells. *Experimental Cell Research*, v.319, n. 18, p. 2781-2789, 2013.

JERNIGAN, J. A. et al. *In Vitro* Activity of Atovaquone against *Leishmania chagasi* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemoteray*, v. 40, n. 4, p.1064, 1996.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 164, n. 2, p.111-117, 2009.

KANEMARU, M. et al. Nanoparticle-mediated local delivery of pioglitazone attenuates bleomycin-induced skin fibrosis. *Journal of Dermatological Science*, v. 93, n. 1, p. 41-49, 2018.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. *Nature Reviews Microbiology*, v.9, n. 8, p.604-615, 2011.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research*, v.90, Supl. 2, p. 55–62, 2003.

KINNEAR, E. et al. A Comparison of Red Fluorescent Proteins to Model DNA Vaccine Expression by Whole Animal In Vivo Imaging. *PLOS one*, v.10, n. 6, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0130375

KRAM, D. et al. Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. *Journal of Immunological Methods*, v. 333, p.79–88, 2008.

LEE, M. et al. Immunobiology of Nitric Oxide and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Results and Problems in Cell Differentiation*, v.62, p. 181-207, 2017.

- LI, M. et al. Composition design and medical application of liposomes, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 164, p. 640-654, 2019.
- LIMA, N. M. F. et al. Antileishmanial Activity of Lapachol Analogues. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.99, n. 7, p.757-761, 2004.
- LIPODOLVÁ, M.; DEMANT, P. Genetic susceptibility to infectious disease: lessons from mouse models of leishmaniasis. *Nature Reviews Genetics*, v.7, p.294-305, 2006.
- LIU, C., et al. Novel 1,4-Naphthoquinone derivatives induce apoptosis via ROS-mediated p38/MAPK, Akt and STAT3 signaling in human hepatoma Hep3B cells. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 96, p. 9-19, 2018.
- MAC-DANIEL, L. et al. Local Immune Response to Injection of Plasmodium Sporozoites into the Skin. *Journal of Immunology*, v.193, n. 3,p.1246-1257, 2014.
- MACHADO, P. L. R. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.79, n. 6, p. 647-664, 2004.
- MAJTNEROVÁ P.; ROUŠAR T. An overview of apoptosis assays detecting DNA fragmentation. *Molecular Biology Reports*, v.45, n. 5, p.1469-1478, 2018.
- MÁRQUEZ, L. M.; ROOSSINCK, M. J. Do persistent RNA viruses fit the trade-off hypothesis of virulence evolution? *Current Opinion Virology*, v.2, n. 5, p.556–560, 2012.
- MASHTAQ, S; DOGRA, D; DOGRA, N. Clinical Response with intralesional Amphotericin B in the treatmet of old world cutaneous leishmaniasis: a preliminary report. *Dermatologic Therapy*, v. 29, n.6, p.398-405, 2016.
- MASLOV, D. A. et al. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. *Trends in Parasitology*, v. 29, n.1, p.43-52, 2013.
- MATHES, B. M.; ALGUIRE, P.C. Intralesional corticosteroid injection. *UptoDate*, 2019. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/intralesional-injection>. Acesso em: 16 jan. 2019.
- MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A.R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *Monthly Journal of the Association of Physicians*, v.107, n.1, p.7–14, 2013.
- MEIRA, Rafaella de Miranda Villarim. *Atividade de análogos sintéticos do lapachol em Leishmania braziliensis in vitro*. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- MEIRA, Rafaella de Miranda Villarim. *Atividade da naftoquinona LQB-166 em Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.
- MENDONÇA, D.V.C. et al. Antileishmanial activity of a naphthoquinone derivatate against promastigote and amastigote stages of *Leishmania infantum* and *Leishmania amazonensis* and

its mechanism of action against *L. amazonensis* species. *Parasitology Research*, v.117, n. 2, p.391-403, 2017.

MENEZES, J. P. B. et al. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *BioMed Research Corporations*, v. 2015, n. 815023, 2015.

MESTIERI, L. B. et al. Cytotoxicity and Bioactivity of Calcium Silicate Cements Combined with Niobium Oxide in Different Cell Lines. *Brazilian Dental Journal*, v. 28, n.1, p. 65-71, 2017.

MORAIS, C. G. V. et al. The dialogue of the host-parasite relationship: *Leishmania* spp. And *Trypanosoma cruzi* infection. *BioMed Research International*, v. 2015. n. 324915, 2015.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Disease*. v.2, n.9, 2011. DOI: 10.1038 / cddis.2011.83

MUKHERJEE, B. et al. Antimony-Resistant *Leishmania donovani* Exploits miR-466i To Deactivate Host MyD88 for Regulating IL-10/IL-12 Levels during Early Hours of Infection. *The Journal of Immunology*, v. 195, n.6, p. 2731-2742, 2015.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, v. 4, p.1561–1577, 2005.

NAIENI, F. F. et al. Bleomycin tattooing as a promising therapeutic modality in large keloids and hypertrophic scars. *Dermatologic Surgery*, v. 32, n. 8, p.1023-1029, 2006.

NIKANDISH, M. et al. Ocular Leishmaniasis Treated by Intralesional Amphotericin B. *Middle East African Journal Ophthalmology*, v. 23, n. 1, p. 153-155, 2016.

OLIVEIRA, R. A. S. et al. The hydroxy-naphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. *International Immunopharmacology*, v.10, n. 11, p. 1463–1473, 2010.

OURIVES-NEVES, L. et al. Estudo clinico randomizado comparando antimonio de meglumina, pentamidina e anfotericina B para o tratamento da leishmaniose cutanea ocasionada por *Leishmania guyanensis*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 6, p. 1092-1101, 2011.

PARIHAR, S. P. et al. Topical Simvastatin as Host-Directed Therapy against Severity of Cutaneous Leishmaniasis in Mice. *Scientific reports*, v.16, n. 33458, 2016. DOI: 10.1038/srep33458

PASSERO, L. F. D; LAURENTI, M. D.; SANTOS-GOMES, G. Modelos Roedores Utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BARRAL, A. ; COSTA, J. M. L. (Org.). *Leishmanias e a leishmaniose tegumentar nas Américas*. 8 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2011. 235 p..

PHAM, T.T.; LOISEAU, P.M.; BARRATT, G. Strategies for the design of orally bioavailable antileishmanial treatments. *International Journal of Pharmaceutics*, v.454, n.1, p. 539-552, 2013.

PIMENTEL, M. I. F. et al. American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (Viannia) *braziliensis* resistant to meglumine antimoniate, but with good response to pentamidine: a case report. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 2, p. 254-256, 2011.

PINHO, B. R. Is nitric oxide decrease observed with naphthoquinones in LPS stimulated RAW 264.7 macrophages a beneficial property? *PLoS One*, v. 6, n. 8, e24098, 2011.

POKORNÁ, D.; RUBIO, L.; MULLER, M. DNA-vaccination via tattooing induces stronger humoral and cellular immune responses than intramuscular delivery supported by molecular adjuvants. *Genetic Vaccines and Therapy*. v.6, n.4, 2008. DOI: 10.1186 / 1479-0556-6-4.

PONTE, C. B. et al. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*, v. 13, n.1 p. 114-119, 2012.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Neglected Tropical Disease*, v.11, n.12, e0006052, 2017.

QIU, H.Y. et al. Naphthoquinones: A continuing source for discovery of therapeutic antineoplastic agents. *Chemical Biology Drug Design*, v. 91, n. 3, p. 681–690, 2018.

RAMALHO, D.B. et al. Meglumine antimoniate intralesional infiltration for localised cutaneous leishmaniasis: a single arm, open label, phase II clinical trial. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.113, n.9, e180200, 2018.

REIMÃO, J. Q. et al. Effectiveness of liposomal buparvaquone in an experimental hamster model of *Leishmania* (*L.*) *infantum chagasi*. *Experimental Parasitology*, v.130, n. 3, p.195–199, 2012.

REVEIZ, L. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. *Plos One*, v.8, n.4, e61843, 2013.

REUTER, J. D. Optimization of cottontail rabbit papilloma virus challenge technique. *Journal of Virological Methods*, v. 98, n. 2, p.127–134, 2001.

REY, L. *Bases da Parasitologia Médica*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 380p.

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

RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathogens*, v.8, n. 2, e1002536, 2012.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites and Vectors*, v. 9, n.1, p.361, 2016.

RITTIG, M.G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitology Today*, v.16, n. 7, p.292-297, 2000.

ROBERTS, W. L. et al. Characterization of the Antimonial Antileishmanial Agent Meglumine Antimonate (Glucantime). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 42, n. 5, p.1076-1082, 1998.

ROCHA, M. N. et al. Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. *Bioinorganic Chemistry and Applications*: v. 2013, 961783, 2013. DOI: 10.1155 / 2013/961783

ROSS, R. Further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal*, n. 28, p.1401, 1903.

ROJAS, R. et al. Resistance to Antimony and Treatment Failure in Human *Leishmania (Viannia)* Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v.193, n. 10, p.1375-1383, 2006.

SATO, Y.; OHSHIMA, T.; KONDO, T. Regulatory role of endogenous interleukin-10 in cutaneous inflammatory response of murine wound healing. *Biochemical Biophys. Research Communications*, v.265, n. 1, p.194–199, 1999.

SANTOS, A. F. et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and Derivatives. *International Journal for Parasitology*, v.30, n.11, p.1199-1202, 2000.

SCHEREIVER, I. et al. Synchrotron-based v-XRF mapping and μ -FTIR microscopy enable to look into the fate and effects of tattoo pigments in human skin. *Scientific Reports*, v.7, e11395, 2017.

SCHUCK, D. C. et al. Biological evaluation of hydroxynaphthoquinones as anti-malarials. *Malaria Journal*, v.12, n. 234, 2003.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *International Journal of Molecular Science*, v.18, n.1296, 2017.

SELVA, Thiago Matheus Guimarães. *Estudos eletroquímicos da lausona (2-hidroxi-1,4-naftoquinona) e derivados da 1,4 naftoquinona com atividade moluscicida*. 2010. 67p. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

SHIO, M.T. et al. Drug delivery by tattooing to treat cutaneous leishmaniasis. *Scientific Reports*, v.4, n. 4156, 2014.

SINGH, K. P. et al. Reactive oxygen species regulates expression of iron–sulfur cluster assembly protein IscS of *Leishmania donovani*. *Free Radical Biology and Medicine*, v.75, p.195–209, 2014.

SINGH, O. P.; SUNDAR, S. Immunotherapy and targeted therapies in treatment of visceral leishmaniasis: current status and future prospects. *Frontiers in Immunology Immunotherapies and Vaccines*, v.5, n. 296, 2014. DOI: 10.3389 / fimmu.2014.00296

SILVA-COUTO, L. et al. Intranasal Vaccination with Leishmanial Antigens Protects Golden Hamsters Against *Leishmania (Viannia) braziliensis* Infection. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.9, n.1, e3439, 2015.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in Human Macrophages. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 6, e1671, 2012.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvos de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOTO, J. et al. Intralesional antimony for single lesions of bolivian cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*, v.56, n. 9, p.1255-1260, 2013.

SOTO, J. et al. Intralesional Pentamidine: A Novel Therapy for Single Lesions of Bolivian Cutaneous Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* , v.94, n. 4, p. 852-856, 2016.

SOULAT, D.; BAGDAN, C. Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. *Frontiers Immunology*, v.8, n.1838, 2017. DOI: 10.3389 / fimmu.2017.01838

SOWDEN, J. M. et al. Red tattoo reactions: X-ray microanalysis and patchtest studies. *The British. Journal of Dermatology*. v.124, n. 6, p.576–580, 1991.

SRIVASTAVA, S. et al. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasites and Vectors*, v.10, n. 41, 2017. DOI: 10.1186 / s13071-017-1969-z

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A. Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, n. 6, e2278, 2013.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2018.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from text book descriptions to biological understanding. *Open Biology*, v. 7, n. 9, 2017. DOI: 10.1098 / rsob.170165

TEIXEIRA, M. J. et al. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal Activity of 2-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (Lapachol). *Phytotherapy Research*, v.15, n. 1, p.44-48, 2001.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*, v.15, n.8, p.525-532, 2011.

TIWARI, N. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.18, n.1, p.26-41, 2018.

VAN DEN BERG, J. H. et al. Intradermal Vaccination by DNA Tattooing. *Methods in Molecular Biology*, v.1143, p. 131-140, 2014.

VÉLEZ, I. et al. Efficacy of Miltefosine for the Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 83, n.2, p.351–356, 2010.

VERNAL, S. et al. Disseminated Leishmaniasis by *Leishmania viannia* Subgenus: A Series of 18 Cases in Southeastern Brazil. *Open Forum Infectious Diseases*. v.3, n. 1, 2015. DOI: 10.1093 / ofid / ofv184

VIANA, A. G. et al. Histopathological and immunohistochemical aspects of American cutaneous leishmaniasis before and after different treatments. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v.88, n. 1, p.32-40, 2013.

WADHONE, P. et al. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. *The Journal of Immunology*, v.182, n.11, p. 7146-7154, 2009.

WAGEMAKERS, A. et al. Rapid outer-surface protein C DNA tattoo vaccination protects against *Borrelia afzelii* infection. *Gene therapy*, v.21, n. 12, p. 1051-1057, 2014.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cellular and Molecular Life Sciences*. v.71, n. 7, p.1245-1263, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. *Leishmaniasis – Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis*: 2017. Geneve, 2017. Disponível em: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html. Acesso em: 18 jun 2018.

YANG, X. Q. et al. The protective effect of recombinant *Lactococcus lactis* oral vaccine on a *Clostridium difficile*-infected animal model. *BMC Gastroenterology*, v.13, n.117, 2013. DOI: 10.1186 / 1471-230X-13-117

XIAOLI, W. E. I. et al. Induction of apoptosis by FFJ-5, a novel naphthoquinone compound, occurs via downregulation of PKM2 in A549 and HepG2 cells. *Oncology Letters*, v.13, n. 2, p. 791-799, 2017.

ZANGGER, H. et al. (2013) Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v.7, n. 1, e2006, 2013.

ZIRKIN, H. J. A tattoo and localized lymphadenopathy: a case report. *Cutis*, v.67, n. 6, p.471-472, 2001.