

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IZANARA CRISTINE PRITSCH

AVALIAÇÃO *in vitro* DA EXPOSIÇÃO DO GLUCANTIME®
EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM
Leishmania (Viannia) braziliensis, VIANNA (1911)

CURITIBA

2015

IZANARA CRISTINE PRITSCH

AVALIAÇÃO *in vitro* DA EXPOSIÇÃO DO GLUCANTIME®
EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM
Leishmania (Viannia) braziliensis, VIANNA (1911)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, área de concentração em Parasitologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro.

Co-orientadora: Profa. Dra. Edilene Alcântara de Castro

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Pritsch, Izanara Cristine

Avaliação *in vitro* da exposição do Glucantime® em macrófagos não infectados e infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*, VIANNA (1911). / Izanara Cristine Pritsch. – Curitiba, 2015.

71 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro

Co-orientadora: Edilene de Alcântara de Castro

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. Macrófagos. 3. Apoptose. I. Título II. Ribeiro, Magda Clara Vieira da Costa. III. Castro, Edilene de Alcântara. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 614.534



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“AVALIAÇÃO *in vitro* DA EXPOSIÇÃO DO GLUCANTIME® EM
MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM
Leishmania (Viannia) braziliensis, VIANNA (1911)”**

por

IZANARA CRISTINE PRITSCH

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**


Prof^ª. Dr^ª. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro – Presidente


Dr^ª. Guilhermina Rodrigues Noletto


Dr. João Carlos Minozzo


Dr^ª. Daniela Parada Pavoni

Curitiba, 31 de março de 2015.

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Roseli, que nunca mediu esforços para me apoiar do início ao fim desta etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e a todos os Espíritos de luz que me guiaram e me deram forças em todos os momentos difíceis. E também por colocar inúmeras pessoas maravilhosas no meu caminho.

Sou imensamente grata à minha mãe, que sempre me apoiou nas minhas decisões e por entender quando precisei ficar ausente em algumas datas especiais, obrigada pelo amor, força e compreensão. Agradeço também meu pai que me deu apoio financeiro nestes dois anos. Obrigada Amarildo, por sempre me citar como exemplo e me admirar por ter chegado até aqui, agradeço pelo muito apoio.

À minha família pelo amor, incentivo e apoio.

Meu namorado, Cesar Lamega Filho, que está sempre ao meu lado dividindo angústias e felicidades. Obrigada pela paciência, por ouvir minha apresentação inúmeras vezes e por me ajudar com traduções, programas e formatações.

A todos os meus amigos, em especial à Carla e o Leandro. Agradeço à Letícia, minha companheira nos momentos de desespero, obrigada por não me deixar desistir e obrigada pelos momentos de descontração. Ao Rodrigo pelo companheirismo e por compartilhar as dificuldades e desafios. Aos meus colegas de laboratório, Thais, Filipe, Paulo, Mauricio e Ludmilla.

Agradeço muito à minha orientadora, Dra. Magda Clara Vieira da Costa Ribeiro, principalmente pela confiança e oportunidade e também por estar disposta a seguir comigo pelos próximos quatro anos. Agradeço à sua orientação e ensinamentos, paciência e dedicação na construção do nosso trabalho.

Ao Dr. Ciro Alberto Ribeiro por unir-se a este desafio, contribuindo com seu conhecimento e experiência que foram de grande importância neste trabalho. E também por conceder o uso dos laboratórios.

Agradeço à minha co-orientadora Dra. Edilene Alcântara de Castro pelas orientações e por tornar possível a realização deste trabalho devido ao seu esforço na construção da estrutura do laboratório de Parasitologia Molecular.

A Dra. Guilhermina Rodrigues Noleto pelos auxílios e orientações, e pela disponibilidade do laboratório.

Agradeço aos alunos e professores do Departamento de Biologia celular, em especial à Andressa que dividiu o seu tempo para me ajudar sempre que precisei.

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Patologia Básica.

Ao Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiologia (CPPI), especialmente ao Dr. João Carlos Minozzo pela disponibilidade de material biológico necessário para a realização da pesquisa.

À Universidade Federal do Paraná, em especial ao Programa de Pós - graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, e a Capes pela concessão da bolsa.

Aos camundongos e também às *Leishmania* que foram a base desta pesquisa.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na concretização deste sonho.

MUITO OBRIGADA!

“Leve na sua memória para o resto de sua vida as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo.”

CHICO XAVIER

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

CORA CORALINA

"Não é a força do gotejar da água que fura a pedra, mas sim a persistência incansável desta ação."

IVAN TEORILANG

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é considerada um problema de saúde pública nas Américas devido a sua alta morbidade e ampla distribuição geográfica. O tratamento de primeira escolha para a LTA são os antimoniais pentavalentes (Glucantime®), no entanto, o mecanismo de ação deste fármaco ainda não está totalmente elucidado, principalmente em macrófagos infectados por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de Glucantime® Sb(V) (300µg/mL) sobre macrófagos peritoneais de camundongos (Swiss) não infectados e infectados com *L. braziliensis*. Foram analisados os seguintes experimentos: a) o índice da atividade fagocítica de macrófagos (expostos em Glucantime® por 24h utilizando *Saccharomyces cerevisiae*; b) a citotoxicidade por meio do teste MTT; c) a morte celular (anexina V/iodeto de propídio) e; d) a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio em macrófagos não infectados e infectados na presença de Glucantime® nos tempos de três e 24 horas. Após exposição de 24 horas ao medicamento foi observado que o mesmo aumentou a atividade fagocítica dos macrófagos. Na exposição de três horas, o Glucantime® foi citotóxico para macrófagos infectados e, em 24 horas, para macrófagos não infectados e infectados. Foi observada morte celular (característica de apoptose), no tempo de três horas, em macrófagos infectados. Os dados obtidos sobre o metabolismo oxidativo mostraram que o Glucantime® induz produção de espécies reativas após 24 horas de exposição em macrófagos não infectados. O que corrobora a elevada atividade fagocítica na presença de *Saccharomyces cerevisiae* nesse mesmo tempo. Os resultados deste estudo indicam que o Glucantime® não tem especificidade para macrófagos infectados, o contrário, em um tempo maior de exposição, apresentou maior efeito citotóxico para os macrófagos não infectados. Ainda, nas três primeiras horas de exposição ao medicamento, houve morte celular no macrófago, característica de apoptose. No entanto, serão necessários mais estudos para avaliar estas questões, principalmente, pelos efeitos observados sobre macrófagos não parasitados. Além disso, conhecer os eventos chaves no mecanismo de morte celular e, a citotoxicidade do antimonial pentavalente para o hospedeiro ou parasito, constituem importantes informações na busca de alvos terapêuticos para o tratamento da LTA.

Palavras-chave: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; Glucantime®; Macrófagos; Morte Celular; Apoptose.

ABSTRACT

The American tegumentary leishmaniasis (ATL) is considered a public health issue in the Americas due to high morbidity and wide geographic distribution. The first-line treatment for the ATL are pentavalent antimonials (Glucantime®), however, the action mechanism from this drug still is not totally elucidated, especially for macrophages infected by *Leishmania (V.) braziliensis*. Along these lines, the current study had as goal evaluate the effects of Glucantime® Sb(V) (300µg/mL) in mice peritoneal macrophages (Swiss) infected and non-infected by *L. braziliensis*. Thus, were analysed: a) the rate of phagocytic activity in macrophages (exposed under Glucantime® for 24h) using *Saccharomyces cerevisiae*; b) the cytotoxicity through MTT test; c) the cell death (Annexin V/propidium iodide) and; d) the production of reactive oxygen and nitrogen species within non-infected and infected macrophages in the presence of Glucantime® along periods of three and 24 hours. After 24h of drug exposure, was observed that it has increased the phagocytic activity from *Leishmania*-infected macrophages. In the period of three hours, Glucantime® was cytotoxic for infected macrophages and, in 24 hours, for both infected and non-infected macrophages. It has been observed characteristic cell death to apoptosis in the period of three hours for infected macrophages. The acquired data from oxidative metabolism have showed that Glucantime® induces production of reactive species after 24 hours of exposure on non-infected macrophages. This study corroborates to the high phagocytic activity when in presence of *Saccharomyces cerevisiae* during the same time. The results of this study also indicate that Glucantime® does not have specificity to infected macrophages, instead of it, in a higher exposure time it has showed stronger cytotoxic effect in non-infected cells. In the first three hours of treatment, there was cell death to macrophages, also characteristic from apoptosis. However further studies will be necessary to evaluate these questions, especially for the observed effects about not parasited macrophages. Furthermore, know about these key events in the cell death mechanism and the pentavalent antimonial cytotoxicity for host cells or parasite, are important information in the search of therapeutic targets for the ATL treatment.

Keywords: *Leishmania (Viannia) braziliensis*; Glucantime®; Macrophage; Cell Death; Apoptosis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	17
2.2	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – OS VETORES.....	18
2.3	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – O AGENTE ETIOLÓGICO	19
2.4	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO	20
2.5	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - ANTIMONIAIS	23
2.6	<i>Leishmania</i> spp. - CÉLULA HOSPEDEIRA.....	25
2.7	<i>Leishmania</i> spp. - AOPTOSE	27
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4	METODOLOGIA.....	32
4.1	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	32
4.2	ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS.....	32
4.3	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS COM <i>L. braziliensis</i>	32
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME®.....	33
4.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME®	34
4.6	CITOTOXICIDADE DO GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM <i>L. braziliensis</i>	34
4.7	AVALIAÇÃO DO AMBIENTE <i>REDOX</i> EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM <i>L. braziliensis</i> APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME® - ÓXIDO NÍTRICO (NO).....	35
4.8	AVALIAÇÃO DO AMBIENTE <i>REDOX</i> EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM <i>L. braziliensis</i> APÓS TRATAMENTO	

	COM GLUCANTIME® – EROS.....	36
4.9	FRAGMENTAÇÃO DO DNA E EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS EXPOSTOS AO GLUCANTIME®.....	37
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	39
5	RESULTADOS	40
5.1	ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	40
5.2	VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME® E CITOTOXICIDADE DO GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS.....	41
5.3	EFEITO DO GLUCANTIME® NO AMBIENTE <i>REDOX</i> DE MACRÓFAGOS.....	43
5.4	FRAGMENTAÇÃO DO DNA E EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA.....	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÕES	52
8	PERSPECTIVAS	52
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
	ANEXO 1 - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA TOXICOLOGY IN VITRO	62
	ANEXO 2 – SOLUÇÕES	70

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são a segunda entre as seis doenças infecciosas e parasitárias mais comuns no mundo. Esse conjunto de doenças são consideradas negligenciadas pelo fato de serem limitados os recursos investidos em seu diagnóstico, tratamento e controle, além da sua relação com a pobreza (ALVES *et al.*, 2013). Segundo dados epidemiológicos da Organização Mundial de Saúde (2012), 310 milhões de pessoas estão sob risco de transmissão de leishmaniose no mundo.

O continente americano, o segundo maior continente do mundo com 35 países, destes, 18 já registraram casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) (PAHO, 2013). A LTA é um problema de Saúde Pública nos países do Novo Mundo, incluindo o Brasil. Sua importância consiste não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que geram lesões que podem afetar o campo psicossocial do indivíduo afetado pela doença (GONTIJO, 2003).

A LTA encontra-se em expansão geográfica no Estado do Paraná, com um número crescente de casos, sendo a espécie *L. braziliensis* responsável por 100% deles, produzindo um amplo espectro de manifestações clínicas nos indivíduos acometidos por essa doença (MONTEIRO *et al.*, 2008; CASTRO *et al.*, 2002).

Na tentativa de eliminar a *Leishmania*, o sistema imune do hospedeiro vertebrado é ativado, entretanto, as espécies deste gênero são capazes de evadir aos mecanismos extracelulares de defesa e invadir as células-alvo (macrófagos), modificar o ambiente intracelular e estabelecer a infecção (CASTELLANO, 2005).

Para estabelecer a infecção, as promastigotas apoptóticas de *Leishmania* induzem a síntese de TGF- β (Fator de transformação do crescimento beta) pelo macrófago e expõem PS (fosfatidilserina) na membrana, inibindo a atividade inflamatória do macrófago permitindo a sobrevivência de *Leishmania* não apoptóticas. As formas amastigotas suprimem a resposta inflamatória pela redução da síntese de NO (óxido nítrico) e secreção de TGF- β . Dessa forma, conseguem burlar e inativar os mecanismos microbicidas das células hospedeiras, possibilitando a sua instalação e disseminação (HORIKAWA *et al.*, 2011).

A diferenciação das formas promastigotas em amastigotas resulta em

modificações nas moléculas de superfície, como glicoproteína 63 (gp63) e lipofosfoglicanos (LPG), e essas mudanças podem refletir na susceptibilidade aos medicamentos das duas formas evolutivas (MARR *et al.*, 2012).

A compreensão do processo de morte de *Leishmania* é de fundamental importância para o controle da doença, fornecendo informações que podem auxiliar no desenvolvimento de novas alternativas de tratamento. Os antimoniais pentavalentes, Glucantime® (antimoniato de meglumina) e Pentostam® (estibogliconato de sódio), fármacos utilizados no tratamento da LTA, possuem modo de ação ainda não elucidado, e trabalhos que investiguem a citotoxicidade da forma pentavalente da droga são escassos.

Além disso, existem estudos que relatam falhas terapêuticas com o uso dos antimoniais no tratamento da LTA causada por *L. braziliensis*, ressaltando a importância de mais investigações sobre essa espécie. Apesar da importância desta espécie no cenário da LTA, comparativamente, há poucos trabalhos envolvendo a espécie *L. braziliensis* em relação a outras espécies do gênero *Leishmania* (AIT- OUDHIA *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2006).

Dada à relevância dessa doença, este estudo visa avaliar os efeitos do Glucantime® sobre macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*. Dessa forma, este trabalho agregará novos elementos que possibilitarão discussões dos mecanismos deste medicamento, tendo em vista que ainda existem muitas controvérsias no que diz respeito a sua forma de ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – HISTÓRICO E DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

As leishmanioses são relatadas desde a antiguidade. Na América a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) foi relatada desde 400-900 D.C. em cerâmicas pré-colombianas feitas pelos índios do Peru, e as primeiras descrições clínicas foram documentadas no século XVI por Oviedo (LIMA, 2010). A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827 (BASANO, 2004).

Estima-se que um milhão de casos de leishmaniose cutânea ocorrem anualmente. Dos casos de leishmaniose cutânea no mundo, a maioria ocorre nos seguintes países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria, tendo o Brasil registrado mais de 23 mil casos de LTA no ano de 2012 (WHO, 2012).

No Brasil, a LTA tem distribuição em todo território nacional e encontra-se em fase de expansão geográfica com diferentes coeficientes de incidência entre as regiões do país (LIMA, 2010; BASANO, 2004), concentrando-se no norte e centro-oeste, seguidas das regiões nordeste, sudeste e sul (MS, 2012). A distribuição geográfica dessa parasitose pode ser limitada a alguns fatores como: a distribuição do vetor, o flebotomíneo, e sua suscetibilidade a climas frios, com melhor adaptação ao clima tropical e subtropical (PASSOS, 2003).

Os primeiros relatos de leishmaniose surgiram na região norte do país. Em função disso, acredita-se que na região sul houve a introdução de *Leishmania* por meio da migração de humanos, animais e até mesmo população de vetores. Vários mamíferos silvestres e sinantrópicos foram incriminados como reservatórios, favorecendo o ciclo de *Leishmania* (MARLOW *et al.*, 2013).

Inicialmente a LTA era associada a áreas de mata primária e zonas rurais, atingindo com mais frequência trabalhadores que invadiam as florestas tropicais ou que moravam próximo a elas (LIMA, 2010). Atualmente, algumas mudanças têm ocorrido na epidemiologia da LTA, de doença silvestre passando a existir em zonas rurais desmatadas e em regiões periurbanas (PASSOS, 2003).

A leishmaniose é uma doença negligenciada e está relacionada com a

pobreza (WHO, 2012). Existem diversos fatores favoráveis à transmissão da doença, os socioeconômicos que englobam a desnutrição e condições precárias de habitação, os relacionados com o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado e os ambientais, que estão associados com o desmatamento, construção de barragens, ou seja, as alterações antrópicas (PASSOS, 2003). O rápido crescimento e urbanização de áreas rurais em que ocorre ciclo zoonótico também contribuem com a distribuição da leishmaniose (WHO, 2012; PASSOS, 2003). Estas situações são comuns no norte e centro-oeste e algumas áreas do sul do Brasil (CASTRO *et al.*, 2005).

Na região sul, o estado do Paraná apresenta o maior número de casos de LTA e ocupa a 13^a colocação entre os estados do país com 408 novos casos no ano de 2012 (MS, 2012). O número de casos elevados caracteriza um problema de saúde pública (SILVEIRA *et al.*, 1999). No Paraná a LTA é endêmica no norte, nordeste e na região do Vale da Ribeira (CASTRO *et al.*, 2005).

2.2 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – OS VETORES

Nas Américas existem aproximadamente 40 espécies de *Lutzomyia* com comprovada capacidade de transmitir *Leishmania* spp., podendo existir mais espécies de vetores ainda não identificadas (LIMA, 2007).

Os flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*, são considerados o de maior importância por abrigar espécies transmissoras de patógenos aos humanos, com ampla distribuição no Brasil desde regiões do sul até o norte do país. As principais espécies envolvidas na transmissão das diferentes espécies de *Leishmania* são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia whitmani*, *Lutzomyia umbratilis*, *Lutzomyia intermedia*, *Lutzomyia wellcomei* e *Lutzomyia migonei* (REIS *et al.*, 2013).

Os flebotomíneos são dípteros da família Psychodidae, subfamília, Phlebotominae. São insetos de pequeno porte, medindo cerca de três a cinco mm de comprimento. As fêmeas praticam a hematofagia, que desempenha papel importante na ovogênese. Algumas espécies possuem notável grau de antropofilia o que também confere envolvimento na transmissão da *Leishmania* spp. (SILVA, 2010).

Estudos sobre a fauna de flebotomíneos no estado do Paraná foram realizados de forma mais ampla na região norte, onde o maior número de casos de

LTA foi registrado. As espécies *Nyssomyia neivai*, *Ny. whitmani*, *Pintomyia pessoai*, *Pintomyia fischerie*, *Migonemyia migonei* são incriminadas na transmissão de *Leishmania* e as espécies *Ny. neivai* e *Ny. whitmani* estão sempre presentes em grande número em áreas peridomiciliares e domésticas na maior parte do norte do Paraná (CRUZ *et al.*, 2013). As diferenças observadas quanto à frequência e à riqueza de espécies de flebotomíneos, entre as diversas localidades, ocorrem, muito provavelmente, pela influência dos habitats, aspectos característicos de cada região geográfica, principalmente quanto ao tipo de solo e de fatores topográficos locais, bem como, das condições climáticas dessas áreas (SILVA *et al.*, 2008).

2.3 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – O AGENTE ETIOLÓGICO

O termo leishmaniose refere-se à infecção de hospedeiros vertebrados com protozoários do gênero *Leishmania*, os quais, como outros tripanossomatídeos da ordem Kinetoplastida, apresentam um DNA extranuclear no citoplasma, o cinetoplasto (LESSA *et al.*, 2007). O gênero *Leishmania* é composto aproximadamente por trinta espécies e, destas, cerca de vinte são patogênicas para os seres humanos (GRAÇA *et al.*, 2012).

Durante seu ciclo biológico (Figura 1), este protozoário apresenta duas formas evolutivas nos hospedeiros: amastigota e promastigota. A forma amastigota é intracelular obrigatória e ocorre em hospedeiros vertebrados, parasitando o fagossoma das células do SFM (Sistema Fagocítico Mononuclear). A forma promastigota (flagelada) é encontrada no aparelho digestivo do hospedeiro invertebrado (LESSA *et al.*, 2007; CASTRO *et al.*, 2002).

A LTA ocorre nas Américas desde o Sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. O foco mais importante é o sul-americano, que compreende todos os países, com exceção do Uruguai e do Chile (GONTIJO, 2003). Nas Américas, são reconhecidas onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No Brasil existem sete espécies envolvidas na etiologia da LTA, em dois sub-gêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As espécies causadoras de LTA no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lindenbergie* *L. (L.) amazonensis* (BRITO *et al.*, 2012). Contudo, na região sul do país, *L. braziliensis* é responsável por quase 100% dos casos (BACHA *et al.*, 2011). Vale ressaltar, o

relato de *L. amazonensis* no estado de Santa Catarina (GRISARD *et al.*, 2000).

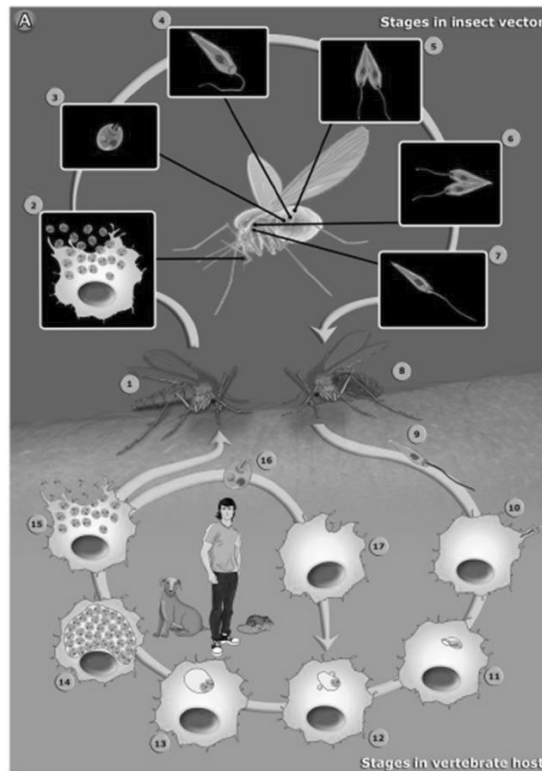


Figura 1. Ciclo biológico da *Leishmania* spp. Fonte: TEIXEIRA *et al.*, 2013.

2.4 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA – ASPECTOS CLÍNICOS E TRATAMENTO

A LTA é considerada uma doença complexa que apresenta características clínicas e epidemiológicas que podem variar de acordo com a espécie de *Leishmania*, com a susceptibilidade do hospedeiro e de região para região (BRITO *et al.*, 2012; SAMPAIO *et al.*, 2002).

A LTA é caracterizada pelas seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LM), leishmaniose disseminada, leishmaniose difusa e leishmaniose cutânea atípica (WHO, 2012). As lesões podem ocorrer em qualquer parte do corpo, mas normalmente tem início no local da inoculação, podendo se desenvolver em semanas, meses ou até anos após a infecção. Nas formas cutâneas localizadas ocorre presença de lesões ulceradas pequenas, podendo apresentar aspecto acneiforme, espargidas por todo o corpo. A LM causa metástase e se dissemina por via hematogênica, acometendo a mucosa das vias aéreas superiores, preferindo as estruturas mais resfriadas pelo acesso de

ar, causada principalmente pela *L. braziliensis* e *L. (V.) panamensis*. A leishmaniose difusa ou anérgica, que se dissemina progressivamente por todo tegumento apresentando-se na forma de nódulos, não apresenta lesões nas mucosas e não tem cura espontânea, causada principalmente pela *L. mexicana* e *L. amazonensis* (FERREIRA *et al.*, 2012; WHO, 2012). A forma disseminada se manifesta por meio de numerosas lesões nodulares ou ulceradas, causada principalmente pelas espécies *L. braziliensis* e *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis*. As lesões observadas na leishmaniose cutânea atípica podem ser verrucosas, crostosas, vegetantes e lupóides, causada principalmente pela espécie *L. braziliensis* (WHO, 2012).

L. braziliensis é o principal agente etiológico da LTA, sendo comumente associada com lesões mucocutâneas, dessa forma, é responsável pelo maior número de casos de LM no Novo Mundo (CUERVO *et al.*, 2004; STRAZZULA *et al.*, 2013).

A LCL é caracterizada por uma resposta celular induzida através de células T CD4⁺ (linfócito T-helper possui receptor CD4 na superfície) e células T CD8⁺ (linfócito T-citotóxico possui receptor CD8 na superfície). Os receptores CD4 e CD8 interagem com as moléculas do MHC classe II e classe I, respectivamente, quando os receptores do antígeno das células T reconhecem de forma específica o complexo peptídeo-MHC nas células apresentadoras de antígeno (APCs) (ABBAS, 2007), que caracterizam por lesões cutâneas ulceradas. No entanto, a destruição da mucosa nasofaríngea ocorre devido à LM que está associada com uma exacerbada resposta imune celular, predominantemente por células T CD4⁺ (FARIAS *et al.*, 2013).

O linfócito T helper ou auxiliar (Th) após ser estimulado por interleucina (IL) 4 e IL-10, diferencia-se em Th2 e ao ser estimulado por IL-12 tem-se uma diferenciação para Th1 (ABBAS, 2007). Na co-infecção com HIV, observa-se progressiva desregulação do sistema imunológico com desvio da resposta celular tipo Th1 para a resposta humoral tipo Th2, o que é favorável para a replicação e disseminação da *Leishmania* (SAMPAIO *et al.*, 2002). Os quadros clínicos são atípicos com lesões cutâneas não usuais (JÚNIOR *et al.*, 2009). Silva *et al.* (2002) relataram leishmaniose visceral causada por *L. braziliensis* em um paciente portador do vírus da imunodeficiência humana.

Estima-se que 3-5% dos pacientes com LCL, causada por *L. braziliensis* no

Novo Mundo apresentam evolução natural da doença para a LM mesmo nos casos em que a lesão de pele não é detectada ou clinicamente manifesta-se como autolimitada (BEDOYA-PACHECO *et al.*, 2011). Acredita-se que a forma mucosa da leishmaniose seja, geralmente, causada por disseminação hematogênica de formas de *Leishmania* inoculada na pele para as mucosas nasal, orofaringe, palatos, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e árvore respiratória superior. A cavidade nasal é o local preferencialmente acometido na quase totalidade das lesões mucosas dessa doença (MOTA, 2011).

Segundo o Ministério da Saúde, os medicamentos de primeira escolha no tratamento da leishmaniose cutânea são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de N-metilglucamina e estibogluconato de sódio) que possuem um esquema terapêutico preconizado para as diversas formas clínicas de LTA (MS, 2007).

O índice de cura, ou seja, cicatrização das lesões dos pacientes tratados após um primeiro ciclo de antimoniato de meglumine é muito variável na literatura, variando de 26% a 100%. Os casos com baixos índices de cura representam mais um agravante na operacionalização do tratamento especialmente para pacientes residentes em áreas afastadas dos centros de saúde. O uso de medicamentos alternativos como a anfotericina B e a pentamidina são indicados nos casos de resistência ou impossibilidade de uso do antimoniato de meglumine (RODRIGUES *et al.*, 2006).

O insucesso do tratamento da LTA pode ser consequência de dose insuficiente da medicação, promovendo a seleção de *Leishmania* resistente aos antimoniais pentavalentes, assim como as características bioquímicas e moleculares do protozoário, e os fatores relacionados com o hospedeiro, como estado imunitário, farmacocinética, farmacogenética e a adesão ao tratamento (FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). De fato, o surgimento de resistência aos compostos antimoniais (Sb) tem sido demonstrado *in vitro* e em animais naturalmente infectados em exposições curtas a essa classe de medicamentos, ou a esquemas terapêuticos que utilizaram uma dose baixa de medicamento (RODRIGUES *et al.*, 2006). Além disso, recentes estudos têm mostrado que a superexpressão do gene em *pgpA* pode estar relacionado com a resistência ao Glucantime® em cepas selvagens (SOLEIMANIFARD *et al.*, 2014).

A presença de *L. braziliensis* em lesões cicatrizadas e no sangue de pacientes considerados clinicamente curados pode sugerir que o tratamento

antimonial, mesmo prolongado, não é suficiente para eliminar totalmente os protozoários, o que pode levar a recidivas da doença (SCHUBACH *et al.*, 1998).

É sabido que a *L. braziliensis* responde aos antimoniais de diferentes maneiras em cada hospedeiro e que pode estar envolvido, ou não, com as características intra-específicas do protozoário. No entanto, o mecanismo de ação ainda não está bem elucidado.

É sugerido por Ait-oudhia *et al.* (2011) que em pacientes que não respondem ao tratamento com antimoniais, a resistência pode ocorrer devido não só ao contato repetitivo com o medicamento durante a terapia, mas também pela característica particular de *Leishmania*, relacionadas ou não às características genéticas do mesmo. Já Baptista *et al.* (2012) preconizam que as manifestações clínicas atípicas, resistência aos mecanismos de tratamento ou reativação das lesões em pacientes com *L. braziliensis* podem ser ocasionados por uma diferenciação na população de protozoários.

Experimentos de Solomon *et al.* (2012) sugeriram que a anfotericina B lipossomal, além de ser melhor tolerada pelo paciente, deveria ser uma terapia de primeira linha para os pacientes com LC ocasionada por *L. braziliensis*. Apesar do custo elevado, há redução significativa durante a internação (hospitalar ou ambulatorial) para o tratamento com os antimoniais.

2.5 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - ANTIMONIAIS

Os antimoniais têm sido à base do tratamento das leishmanioses por décadas, no entanto, muitos estudos têm sido realizados na busca de uma dose mínima eficaz e com o mínimo de efeitos colaterais. Portanto, tem se tornado um desafio tendo em vista as falhas nas respostas terapêuticas e a presença dos protozoários resistentes conforme revisado por Mitropoulos *et al.* 2012.

Existem dois antimoniais pentavalentes comercialmente disponíveis: Glucantime® (antimoniato de meglumina) e Pentostam® (estibogliconato de sódio) que possuem ações similares. Em ambos, acredita-se que o antimônio pentavalente - Sb(V) é reduzido a antimônio trivalente (SbIII) responsável pelos efeitos secundários tóxicos observados nos pacientes (SALAÜN *et al.*, 2013; MARSDEN, 1985).

A terapia com antimoniais é realizada em injeções intramusculares diárias

com duração de pelo menos três semanas que podem causar: cardiotoxicidade, pancreatite, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade. Com relação à hepatotoxicidade, Kato *et al.* (2014) descreveram que os altos níveis de Sb(III) aumentam o estresse oxidativo nas células hepáticas, sendo portanto, responsáveis pela hepatotoxicidade. Além disso, estudos de Lima *et al.* (2010) mostraram que o Glucantime® induz dano ao DNA *in vitro* e *in vivo* indicando que é um composto pró-mutagênico. A administração repetida de antimoniato de meglumine durante a gestação leva um acúmulo de Sb em gestante e fetos, segundo estudos de Miranda *et al.* (2005) em ratos.

O mecanismo de homeostasia em *Leishmania* conhecido como *redox*, atua como um sistema de defesa antioxidante envolvendo a tripanotiona (T[SH]₂), tripanotiona redutase (TryR), tryparedoxin (TryX) e triparedoxin peroxidase (TryP) (JAEGER *et al.*, 2006). A TryP é mantida em estado reduzido pela tripanotiona redutase (TR) que combatem o estresse oxidativo em *Leishmania*. A glutathione e glutathione redutase mantêm o ambiente *redox* nas células de mamíferos (VAN ASSCHE *et al.*, 2011). Estudos relatam que os antimonias induzem o efluxo de glutathione e tripanotiona e inibem a atividade da enzima tripanotiona redutase (BAIOCCO *et al.*, 2009).

De acordo com o modelo no qual se acredita que o Sb(V) é reduzido em Sb(III), quatro grupos tiols podem agir como agentes redutores de Sb(V) em Sb(III), sendo eles: glutathione, cisteína e cisteína-glicina (encontradas nos lisossomos) e tripanotiona. Essas reações ocorrem em pH 5 e pH 7, mas são favorecidas pelo pH ácido e em temperatura ligeiramente elevada. Dessa forma, a amastigota que sobrevive em pH ácido, consistente com o ambiente intracelular e em temperaturas mais elevadas, é afetada pela redução do Sb(V) em Sb(III) (FRÉZARD *et al.*, 2009). TryR pode catalisar a conversão de Sb V para Sb III usando glutathione como redutor (LIMA *et al.*, 2007).

DNA topoisomerases desempenham um papel fundamental em processos celulares, principalmente no metabolismo de ácidos nucleicos, afetando a topologia e organização do DNA intracelular de *Leishmania*. Os antimonias têm revelado um efeito inibitório de DNA topoisomerases (MISHRA *et al.*, 2007; DAS *et al.*, 2006).

Outro modo de ação proposto para os antimonias é na interferência na β oxidação de ácidos graxos e na glicólise, que refletem na depleção dos níveis intracelulares de ATP, os quais são essenciais na sobrevivência de amastigotas de

Leishmania (MISHRA *et al.*, 2007).

2.6 *Leishmania* spp. - CÉLULA HOSPEDEIRA

Os monócitos são originados na medula óssea e entram no sangue periférico, quando chegam aos tecidos diferenciam e tornam-se macrófagos. São os macrófagos as principais células fagocitárias que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra agentes infecciosos. Estas células possuem a capacidade de reconhecer e endocitar agentes estranhos no organismo (Abbas, 2007).

Quando o inseto vetor transmite o protozoário durante o repasto sanguíneo, macrófagos e neutrófilos são recrutados para o local da picada (Peters *et al.*, 2008), no entanto, os macrófagos são as células hospedeiras mais importantes para o estabelecimento da doença e proliferação de *Leishmania* (PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015).

Durante a infecção dos macrófagos por *Leishmania* um grande número de moléculas estão envolvidas. A ligação das moléculas de superfície do protozoário com os receptores da membrana da célula hospedeira permitem o reconhecimento e posterior internalização. Os lipofosfoglicanos (LPG) e gp63 são as principais moléculas de superfície de promastigotas de *Leishmania* e estão envolvidas no reconhecimento e na internalização de *Leishmania* pelos macrófagos. Em relação ao hospedeiro, as moléculas do sistema complemento são capazes de promover a opsonização da promastigota de *Leishmania*, promovendo a sua adesão aos receptores do complemento CR1 e CR3 na superfície dos macrófagos (BLACKWELL *et al.*, 1985). Além disso, *Leishmania* também pode ser internalizada pela ligação com outros receptores, como os receptores Fc, receptores de fibronectina e os receptores de manose (PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015; RUSSELL *et al.*, 1989).

Após o reconhecimento de *Leishmania*, os macrófagos são ativados e podem realizar a fagocitose, na qual, englobam o protozoário formando uma vesícula, denominada fagossomo ou vesícula fagocítica. Dessa forma, sinais são liberados através de receptores de superfície e vesículas provenientes do complexo de Golgi contendo lisozima e hidrolases ácidas que são capazes de se fundir com o fagossomo. Além disso, vários processos moleculares são iniciados pelo macrófago,

como produção de enzimas de degradação, óxido nítrico e o *burst* oxidativo, na tentativa de degradar a *Leishmania* (VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Dentro da vesícula fagocítica, ocorre um aumento das concentrações de várias citocinas, tais como IFN- γ e TNF- α que aumentam a atividade da enzima NADPH-oxidase e, subsequentemente, a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), tal como ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$). A produção de $O_2^{\cdot -}$ conduz à formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (HO^{\cdot}), hipoclorito (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). A produção dessas destes mediadores e citocinas normalmente leva à destruição do microrganismo fagocitado, mas as espécies de *Leishmania* podem sobreviver e replicar neste ambiente hostil (VAN ASSCHE *et al.*, 2011).

Estudos de interação de *Leishmania* e hospedeiro têm sugerido os possíveis mecanismos pelos quais a *Leishmania* pode burlar os mecanismos de defesa do macrófago e estabelecer a infecção. Inicialmente, ao se ligar nos receptores CR3 e CR1, a *Leishmania* promove a inibição do *burst* oxidativo, o qual seria essencial para a destruição do protozoário nos momentos iniciais de contato parasito-hospedeiro. As espécies do gênero *Leishmania* no hospedeiro vertebrado sofrem alterações na membrana que são capazes de impedir a inserção do complexo C5b-C9 (MAC) do sistema complemento do hospedeiro. Esta ligação aos receptores do complemento inibe os mecanismos oxidativos do fagócito, facilitando a entrada da *Leishmania* na célula-alvo (CASTELLANO, 2005). Quando o protozoário está dentro da vesícula fagocítica, a molécula de LPG inibe a fusão do fagossomo com os lisossomos contendo enzimas líticas. E a gp63 inativa as enzimas do lisossomo, caso a fusão com o fagossomo aconteça (BARROS *et al.*, 2012). Além disso, *Leishmania* spp possuem enzimas como a catalase, tripanotona redutase e a superóxido dismutase em altas concentrações, que conferem proteção ao protozoário contra o *burst* oxidativo gerado pelos macrófagos e que também estão envolvidas com a infectividade da cepa (DE BARROS *et al.*, 2012; CASTELLANO, 2005).

Além dos mecanismos relacionados, a interação *Leishmania*-macrófago, a inibição do metabolismo oxidativo do macrófago e o envolvimento da *Leishmania* na produção de determinadas interleucinas por macrófagos podem contribuir para o estabelecimento da infecção. A IL-12 confere uma resposta imune efetiva contra patógenos intracelulares, no entanto, *Leishmania* é capaz de inibir a síntese de IL-12 (ALEXANDER *et al.*, 1999). Outras citocinas associadas com patogenicidade da leishmaniose são IL-4, IL-6, IL-10 e TGF- β (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012;

ALEXANDER *et al.*, 1999).

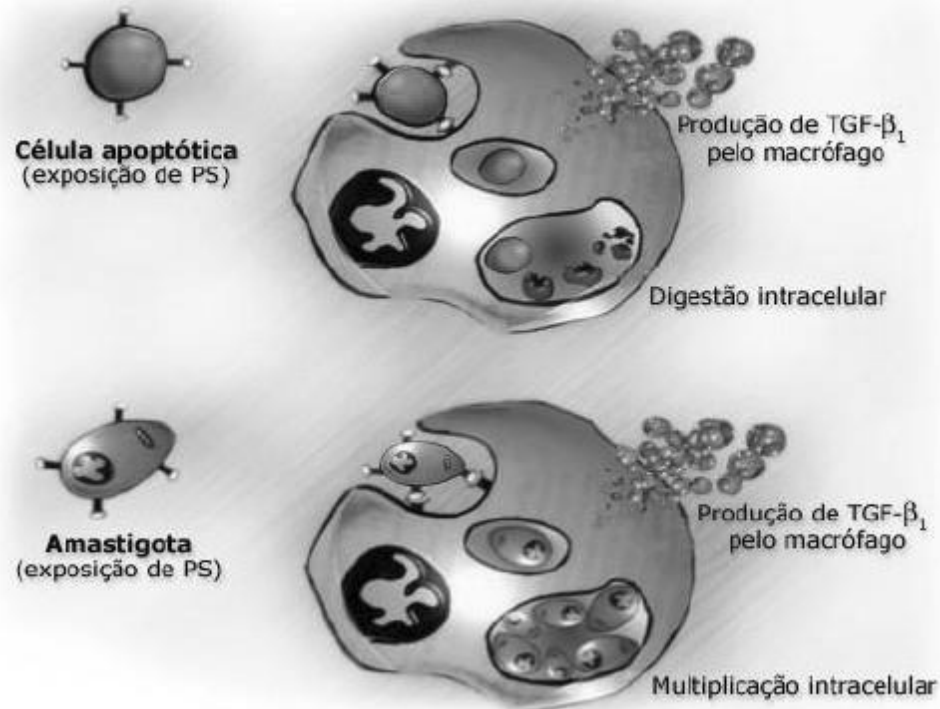
O resultado da infecção por *Leishmania* depende não somente da espécie envolvida, mas também da competência do indivíduo para combater o desenvolvimento do protozoário. As respostas imunológicas do hospedeiro parecem desempenhar como resistente (Th1) ou susceptível (Th2), respectivamente, contra a infecção por *Leishmania* (BRELAZ-DE-CASTRO *et al.*, 2012; SILVEIRA *et al.*, 2008).

2.7 *Leishmania* spp. - APOPTOSE

A morte celular programada, apoptose, descrita inicialmente por Currie *et al.* (1972) é crucial para embriogênese, homeostase e controle de doenças em metazoários. Em organismos eucariontes unicelulares, a apoptose tem sido observada em parasitos do gênero *Trypanosoma* e *Leishmania* (SHAHA, 2006). Em tripanossomatídeos, a apoptose tem sido relatada em resposta a vários estímulos, como: choque térmico, espécies reativas de oxigênio, antiparasitários, prostaglandinas e peptídeos antimicrobianos (GANNAVARAM *et al.*, 2012)

A apoptose é definida pelas características morfológicas da célula, que inclui: formação de vesículas, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, arredondamento e encolhimento celular (GANNAVARAM *et al.*, 2012). Os fatores bioquímicos associados com a apoptose, em ambas as formas evolutivas de *Leishmania*, incluem: fragmentação do DNA, externalização da fosfatidilserina, liberação do citocromo c, perda do potencial de membrana mitocondrial e clivagem proteolítica de substratos intracelulares (GANNAVARAM *et al.*, 2012; SHAHA, 2006).

A exposição da fosfatidilserina difere entre as formas promastigotas e amastigotas. As formas apoptóticas de promastigotas são sempre destinadas à morte e induzem a síntese de TGF- β pelo macrófago, inibindo sua atividade inflamatória e colaborando para a sobrevivência das promastigotas não apoptóticas. As formas amastigotas também são capazes de suprimir a resposta inflamatória, induzindo secreção de TGF- β e reduzindo a síntese de NO. Diferentemente do que ocorre nos promastigotas, as formas amastigotas, ao expor fosfatidilserina na superfície, não necessariamente sofrem morte por apoptose, e por isso esse processo foi denominado de mimetismo apoptótico (HORIKAWA *et al.*, 2011). Para este processo duas hipóteses estão sendo estudadas: a exposição de fosfatidilserina não corresponde necessariamente a uma etapa da apoptose, ou pode ocorrer nos



amastigotas um resgate da morte celular por apoptose por um mecanismo ainda desconhecido, permitindo a internalização e a sobrevivência intracelular da *Leishmania* (Figura 2) (HORIKAWA *et al.*, 2011; WANDERLEY *et al.*, 2010).

Figura 2. Reconhecimento da fosfatidilserina em célula apoptótica e em amastigota de *Leishmania*.

Fonte: HORIKAWA *et al.*, 2011.

As caspases são proteases que desempenham um papel fundamental na apoptose em Metazoa. Existem evidências da atividade de caspase-like e nucleases associadas com processo de morte em protozoários (JIMÉNEZ-RUIZ *et al.*, 2010),

entretanto as descrições dessas atividades ainda são controversas e não elucidadas (EL-HANI, *et al.*, 2012).

No final dos anos 90, Aravind foi o primeiro a descrever ortólogos das caspases que são ausentes em metazoos e presentes em plantas, fungos e protozoários (MESLIN *et al.*, 2011). No entanto, recentemente, alguns autores têm expressado desacordo quanto à classificação de metacaspases como um grupo de caspases. Contudo, em alguns estudos com tripanossomatídeos, as metacaspases têm sido identificadas e descritas. Em *Leishmania* com morte induzida por peróxido de hidrogênio, LdMCs (tipos de metacaspase) têm sido encontradas na organela acidocalcisoma (MESLIN *et al.*, 2011). As metacaspases em *Leishmania* têm sido associadas com a estimulação de morte celular induzida pelo estresse oxidativo (TSIATSIANI *et al.*, 2011).

A sobrevivência da *Leishmania* dentro do macrófago, nos fagolisossomos, acontece por inibição do *burst* oxidativo ou aumento da defesa antioxidante pela *Leishmania*. A indução de apoptose em células hospedeiras pode ser útil para a disseminação do protozoário, aumentando a infecção sem a ativação do sistema de defesa inflamatório do hospedeiro, pois corpos apoptóticos contendo *Leishmania* poderiam ser liberados e fagocitados por macrófagos ainda não infectados. A inibição da apoptose em células infectadas pode diminuir a eliminação do protozoário (DESCHACHT *et al.*, 2012).

A espécie *Leishmania* (*L.*) *donovani* tem seus mecanismos de morte amplamente descritos na literatura. Sudhandiran & Shaha (2003) evidenciaram a ocorrência de apoptose em amastigotas de *L. donovani* tratadas com tartarato de antimônio e potássio (antimônio trivalente, conhecido como tártaro emético). Já Das *et al.* (2001), induziram apoptose em promastigotas de *L. donovani* com peróxido de hidrogênio. Estudos de Lee *et al.* (2007) demonstraram a existência de morte programada da célula induzida por Pentosam e Anfotericina B em promastigotas e amastigotas axênicas de *L. donovani*. Entretanto, houve uma diferença de marcadores entre promastigotas e amastigotas, podendo sugerir diferenças no processo de apoptose ou diferenças na sensibilidade para a droga entre essas formas evolutivas.

Existem muitos trabalhos que evidenciam a ocorrência de apoptose em diversas espécies de *Leishmania*, utilizando vários compostos como tratamento, fármacos já usados no tratamento das leishmanioses, compostos naturais, derivados

de drogas antimaláricas e outros (GARCIA *et al.*, 2013; EBRAHIMISADR *et al.*, 2013; SHARLOW *et al.*, 2013; SOFLAEI *et al.*, 2012; SERENO *et al.*, 2001; MOREIRA *et al.*, 1996). Contudo, não existem estudos que evidenciem qual tipo de morte celular é induzida pelo antimonial pentavalente (Glucantime®) em *L. braziliensis*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade e o tipo de morte celular em macrófagos peritoneais de camundongo (Swiss) infectados e não infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis* expostos ao antimonial pentavalente (Glucantime®).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade fagocítica de macrófagos expostos ao Glucantime®;

Avaliar a viabilidade de macrófagos não infectados expostos ao Glucantime® e, a citotoxicidade do Glucantime® em macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*;

Avaliar as alterações no ambiente *redox* em macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*, expostos ao Glucantime®;

Avaliar a fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina em macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* expostos ao Glucantime®.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO *IN VITRO* DE *Leishmania (Viannia) braziliensis*

O cultivo *in vitro* de promastigotas de *L. braziliensis* foi realizado por meio de repiques semanais em meio Tobie-Evans. Para a obtenção da massa de promastigotas uma alíquota foi transferida para frascos de cultura contendo meio RPMI 1640, SFB (Soro Fetal Bovino) 20% e 100 µg/mL penicilina estreptomicina.

4.2 ISOLAMENTO DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos peritoneais foram extraídos de camundongos Swiss (6-8 semanas de idade). A coleta consistiu na infusão de 10 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) na cavidade peritoneal do camundongo. As células coletadas foram plaqueadas com meio RPMI 1640 suplementadas com 10% SFB em placas de 24 poços contendo 5×10^5 células/poço ou em placas de 96 poços contendo 8×10^4 células/poço (de acordo com cada objetivo proposto). Para a aderência, as placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas a avaliação da atividade fagocítica de macrófagos e por duas horas para os demais bioensaios. Após a incubação, as células não aderidas foram lavadas duas vezes com PBS a 37°C (ADRIAZOLA *et al.*, 2014).

O uso do material biológico dos camundongos (Swiss) foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFPR), protocolo N° 714.

4.3 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS COM *L. braziliensis*

Para o processo de infecção foram realizadas duas metodologias, sendo uma para placa de 96 poços e outra para placa de 24 poços que consistiram na relação de um macrófago para cada cinco promastigotas de *Leishmania* (1:5).

Em placas de 24 poços a metodologia consistiu em adicionar $2,5 \times 10^6$ *Leishmania*/poço contendo os macrófagos aderidos (5×10^5 células/poço) por duas horas.

Em placas de 96 poços, o processo de infecção consistiu em adicionar 4 x

10^5 *Leishmania*/poço contendo os macrófagos aderidos (8×10^4 células/poço) por duas horas.

Para ambas as metodologias, as placas foram incubadas por 12 horas, em estufa a 34°C , com 5% de CO_2 , após a adição das promastigotas de *Leishmania*. Após a incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37°C para a remoção das promastigotas de *L. braziliensis* não fagocitadas

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME®

Para a avaliação da atividade fagocítica, os macrófagos (5×10^5 células/poço) aderidos, por 24 horas, em estufa a 37°C , com 5% de CO_2 , foram submetidos à concentração de $300 \mu\text{g/mL}$ de antimonial pentavalente (Glucantime®), por 24 horas, nas mesmas condições. Após esse tempo, a atividade fagocítica foi avaliada a partir da interação com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* diluídas e homogeneizadas em 10 mL de PBS na relação de um macrófago para dez leveduras (1:10) e incubadas por 15 minutos (BUSSOLARO *et al.*, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Após a incubação, os poços foram lavados com PBS a 37°C para remoção das leveduras não fagocitadas. Em seguida, as células foram fixadas com álcool 95% e coradas com Giemsa (Merck®) para contagem em microscopia de luz e o cálculo do índice fagocítico foi realizado a partir das seguintes equações (BUCHI & DE SOUZA, 1992):

$$\% \text{ Ma} = \text{Ma} / \text{Mt}$$

$$\text{I.E.} = \text{Mi} / \text{Ma} * \% \text{ Ma}$$

Onde:

I.E. = índice endocítico

Mi = nº de microrganismos internalizados

Ma = nº de macrófagos com microrganismos

Mt = nº total de macrófagos

4.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME®

A viabilidade de macrófagos não infectados foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripán de acordo com Philips (1973), com modificações para células aderentes. Esse método tem como princípio a penetração do corante no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática, permitindo a detecção de células não viáveis, que são coradas por azul. A integridade da membrana é pré-requisito para viabilidade celular, portanto, as células viáveis não são coradas (RIBEIRO *et al.*, 2003). O teste consistiu no tratamento dos macrófagos peritoneais aderidos (5×10^5 células/poço) com Glucantime® na concentração de 300 µg/mL, por três horas e nas concentrações de 150 e 300 µg/mL, por 24 horas, e mantidos em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Em seguida o azul de Tripán (0,04%, Sigma®) foi adicionado em cada poço. Após 30 segundos os poços foram lavados três vezes com PBS e levados ao microscópio invertido (Leica DM IL LED) para a captura de imagens. A análise foi realizada a partir de 15 imagens de campos distintos da lâmina, com um número mínimo de 100 células por imagem. A porcentagem foi realizada de acordo com o cálculo:

$$\% V = CM * 100 / C$$

Onde:

% V = Percentual de células viáveis

CM = Número de células marcadas com azul de tripan

C = Número de células totais por campo

4.6 CITOTOXICIDADE DO GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM *L. braziliensis*

A citotoxicidade do Glucantime® em macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* foi avaliada pelo teste de MTT (3 - [4,5-dimetil-2-il] -2, brometo de 5-difenil tetrazólio) (MOSMANN, 1983). O teste MTT é um método colorimétrico que se baseia na capacidade de células viáveis e metabolicamente ativas reduzirem

enzimaticamente o MTT a sais de formazam de cor púrpura que podem ser quantificados por espectrofotometria após diluição com DMSO (REILLY *et al.*, 1998). Sendo as desidrogenases mitocondriais responsáveis pela reação de redução, para que esta reação ocorra há a necessidade de que a célula esteja com as mitocôndrias funcionais.

O teste consistiu no tratamento dos macrófagos não infectados e infectados com 300 µg/mL de Glucantime® e mantidos em estufa a 37°C, com 5% de CO₂, por três e 24 horas. Em seguida, os poços foram lavados com PBS duas vezes e foi adicionado 400 µL de MTT (5 µg/mL) em cada poço. Após duas horas, os poços foram lavados duas vezes com PBS a 37°C e adicionado 400 µL de DMSO. Na sequência, a absorbância foi detectada em espectrofotômetro a 560 nm em leitor de placas Tecan *Infinite* 200.

4.7 AVALIAÇÃO DO AMBIENTE REDOX EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM *L. braziliensis* APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME® - ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O método utilizado para a determinação de óxido nítrico foi a detecção fluorimétrica do 1-(H)-naphthotriazole, um produto fluorimétrico da reação entre o nitrito (metabólito comum do NO) e o 2,3-diaminonaphthalene (DAN). O ensaio foi realizada como descrito por Misko *et al.* (1993), com modificações. Os macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados com 300 µg/mL de Glucantime® por três e 24 horas e mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Na sequência, foram adicionados 10 µL de 2,3-diaminonaphthalene (DAN) (0,05 mg/mL em HCl 0,62 M) a 150 µL do meio de reação. Após 30 min de incubação protegida da luz, a reação foi interrompida pela adição de 5 µl de NaOH 2,8 M. A formação de 1-H-naphthotriazole foi medida em espectrofluorímetro, com comprimento de onda de excitação 365 nm e comprimento de onda de emissão de 450 nm em leitor de placas Tecan *Infinite* 200.

Os níveis de NO foram normalizados pelos resultados de citotoxicidade obtidos pelo teste de MTT (item 4.6) de forma a minimizar a interferência das células com mitocôndrias inviabilizadas, tendo em vista que a mitocôndria serve como a principal organela responsável pela produção de espécies reativas e muitos eventos

ao longo do ciclo celular (KOHEN, NYSKA, 2002). A normalização foi realizada de acordo com o cálculo:

$$\% \text{ Na} = \text{Abs} (\%) / \text{C}$$

Onde:

Na = normalização

Abs = Absorbância

C = Células sem efeito citotóxico

4.8 AVALIAÇÃO DO AMBIENTE REDOX EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS COM *L. braziliensis* APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME® – EROS

Para detectar os níveis de EROs foi utilizado o marcador fluorescente diclorofluoresceína diacetato (H₂DCFDA), que se difunde passivamente nas células, é desacetilado (DCFH₂) e subsequentemente oxidado por EROs, originando 2'-diclorofluoresceína (DCF) fluorescente (HAUGLAND, 1996; BENOVA et al., 1998)

Para detectar os níveis de EROs, os macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados com 300 µg/mL de Glucantime® por três e 24 horas e mantidos em estufa a 37°C, com 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura dos poços foi removido e 200 µL de meio de cultura contendo 10 µmoles/L de H₂DCFDA foi adicionado a cada micropoço. Após 15 minutos de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, e em seguida 300 µL de PBS foi adicionado em cada poço para leitura em espectrofluorímetro Tecan *Infinite* 200 (λ de excitação = 488 nm; λ de emissão = 530 nm) (BENOVA et al., 1998; HAUGLAND, 1996).

Os níveis de EROs foram normalizados pelos resultados de citotoxicidade obtidos pelo teste de MTT (item 4.6) de forma a minimizar a interferência das células com mitocôndrias inviabilizadas, tendo em vista que a mitocôndria serve como a principal organela responsável pela produção de espécies reativas e muitos eventos ao longo do ciclo celular (KOHEN, NYSKA, 2002). A normalização foi realizada de acordo com o cálculo:

$$\% \text{ Na} = \text{Abs} (\%) / \text{C}$$

Onde:

Na = normalização

Abs = Absorbância

C = Células sem efeito citotóxico

4.9 FRAGMENTAÇÃO DO DNA E EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS EXPOSTOS AO GLUCANTIME®

Para avaliar a fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina, os macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados com 300 µg/mL de Glucantime® e mantidos em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por três horas. Após incubação, as células foram lavadas com PBS a 37°C e suspensas em 1X annexin-binding buffer com 5 µl de anexina V-FITC e 5 µl de iodeto de propídio (IP) (Kit Alexa Fluor® 488 annexin V, Invitrogen – USA) por 15 minutos, protegido da luz, em temperatura ambiente, de acordo com as instruções do fabricante. Para finalizar, as lâminas foram montadas com Fluormont G, vedadas com esmalte isento de formol. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Jena, DE), equipado com software Metafer 4 de captura automatizada (Metasystems, Altflusheim, DE).

A análise dos resultados com iodeto de propídio e anexina V foi realizada segundo recomendações do fabricante e são descritas a seguir.

O iodeto de propídio é uma molécula que se intercala em qualquer DNA, desde que a membrana celular esteja permeável. Isso ocorre porque o IP possui elevado peso molecular, portanto, não penetra na célula intacta a não ser que esta esteja com alguma alteração na estrutura da membrana plasmática, o que seria interpretado como uma célula em apoptose tardia ou em necrose. O kit Alexa Fluor® 488 annexin V é composto pela proteína anexina V marcada com um fluoróforo (FITC) que pode identificar células apoptóticas devido à sua afinidade pelo fosfolípido fosfatidilserina (PS). Em células vivas, a PS localiza-se na monocamada interna da bicamada lipídica que forma a membrana plasmática. No entanto, quando a célula encontra-se em eventos tardios de apoptose, esta molécula é translocada da

monocamada interna para a monocamada externa da membrana plasmática e permitindo sua ligação com a anexina conjugada com o FITC.

Desse modo, as células que foram marcadas em verde possuem PS na monocamada externa da membrana plasmática e são caracterizadas como células em apoptose. No entanto, se houver marcação por ambos os fluoróforos, significa que a membrana plasmática destas células perdeu sua integridade e a Anexina V está identificando a PS da monocamada interna da membrana plasmática da mesma forma que o IP marca as moléculas de DNA, confirmando a entrada de ambas as moléculas na célula. Este evento somente é possível se a membrana estiver danificada. Isto significa que a célula marcada por ambos os fluoróforos caracteriza eventos de necrose ou apoptose secundária.

A contagem de células foi realizada em dez campos para cada plicata. A porcentagem foi realizada de acordo com os cálculos:

$$\% \text{ IP} = \text{CM} * 100 / \text{C}$$

Onde:

% IP = Percentual de células marcadas com iodeto de propídio

CM = Número de células marcadas com iodeto de propídio

C = Número de células totais por campo

$$\% \text{ A} = \text{CM} * 100 / \text{C}$$

Onde:

% A = Percentual de células marcadas com Anexina V-FITC

CM = Número de células marcadas com Anexina V-FITC

C = Número de células totais por campo

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos como média \pm DP de três experimentos independentes e, para cada experimento foi realizado em mínimo de triplicata. É considerado experimento independente quando foi utilizado *pools* de dois ou mais camundongos para cada experimento. Na avaliação da fragmentação do DNA e externalização da fosfatidilserina (item 4.9) foi realizado um experimento independente em triplicata. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste t e ANOVA no GraphPad Prisma software versão 5.0, considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

5.1 ATIVIDADE FAGOCÍTICA

Os resultados encontrados na avaliação da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo evidenciaram que o número de *Saccharomyces cerevisiae* internalizados por macrófago foi maior na presença do Glucantime®. A diferença foi comparada entre macrófagos expostos previamente ao Glucantime® e macrófagos sem exposição, após a interação com leveduras. Esta diferença foi verificada estatisticamente em um aumento de 69% (Figura 3). Além disso, foi possível observar que os macrófagos na presença do Glucantime® modificavam a morfologia, ficando maiores e mais vacuolizados (Figura 4).

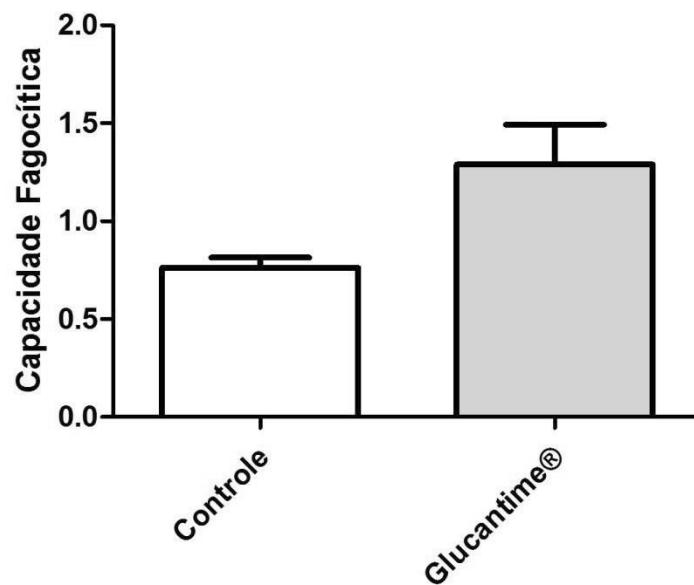


Figura 3. Índice da capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de camundongo na presença de *Saccharomyces cerevisiae*, após 24h de exposição ao Glucantime®. Significativamente diferente do controle * $p < 0,01$.

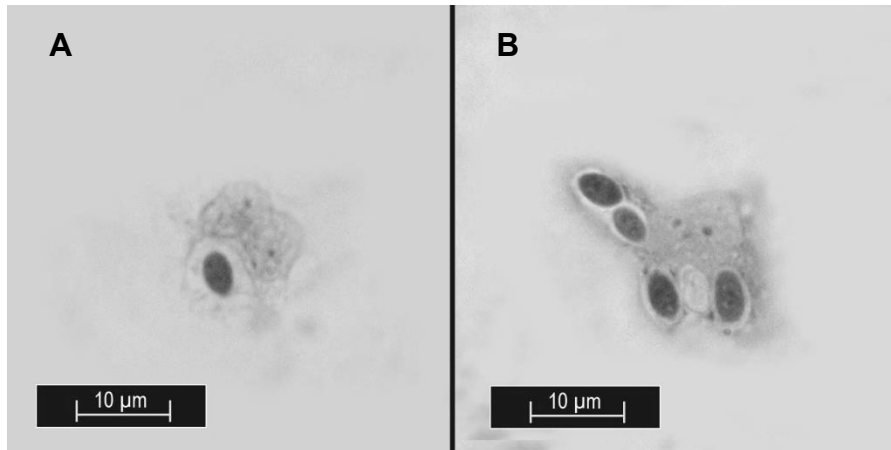


Figura 4. Figura representativa da avaliação da atividade fagocítica de macrófagos após interação com *Saccharomyces cerevisiae* internalizadas (A) sem exposição ao Glucantime® (B) após 24h de exposição ao Glucantime®.

5.2 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS APÓS TRATAMENTO COM GLUCANTIME® E CITOTOXICIDADE DO GLUCANTIME® EM MACRÓFAGOS NÃO INFECTADOS E INFECTADOS

A viabilidade de macrófagos não infectados foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de tripan, após exposição ao Glucantime® (300 µg/mL) por três horas. A viabilidade não apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle. Após 24 horas de exposição, a viabilidade reduziu 9,49% na concentração de 150 µg/mL e 12,55% na concentração 300 µg/mL, ambos comparados ao grupo controle (Figura 5). Porém, ao comparar os grupos de 300 e 150 µg/mL não houve diferença significativa. Dessa forma, optou-se por realizar as demais análises utilizando a concentração de 300 µg/mL.

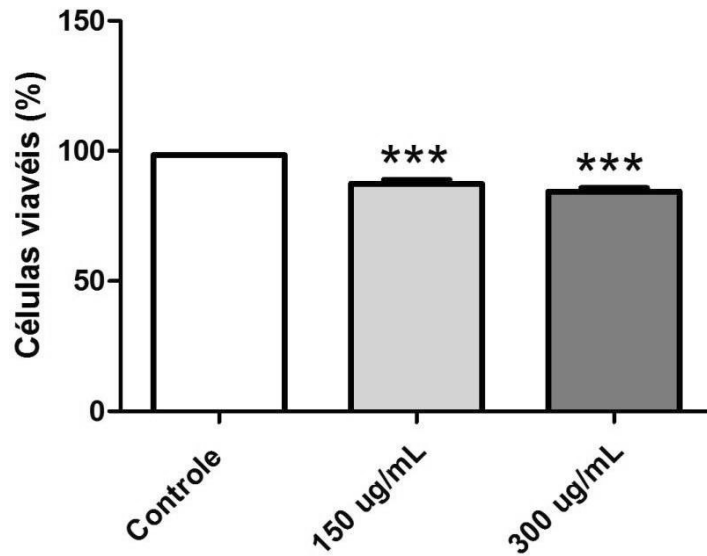


Figura 5. Efeito do Glucantime® na viabilidade celular de macrófagos não infectados usando Teste de Exclusão do Azul de Tripan. Incubação com Glucantime® nas concentrações 150 e 300 µg/mL após 24h de exposição. Significativamente diferente do controle ***p <0,0003.

A citotoxicidade do Glucantime® foi avaliada pela técnica de MTT em macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*, na qual os grupos foram submetidos à concentração de 300 µg/mL de Glucantime® pelo período de três e 24 horas.

A comparação foi realizada entre os grupos expostos ao Glucantime® com os grupos controle. Em três horas, somente em macrófagos infectados foi apresentado efeito citotóxico, o equivalente a 11% (Figura 6). Em macrófagos sem infecção não houve diferença significativa em três horas.

Em 24 horas de exposição, ambos os grupos de macrófagos apresentaram efeitos da citotoxicidade deste medicamento com diferença significativa do grupo controle. A citotoxicidade foi de 78% nos macrófagos não infectados e 74% nos macrófagos infectados (Figura 7).

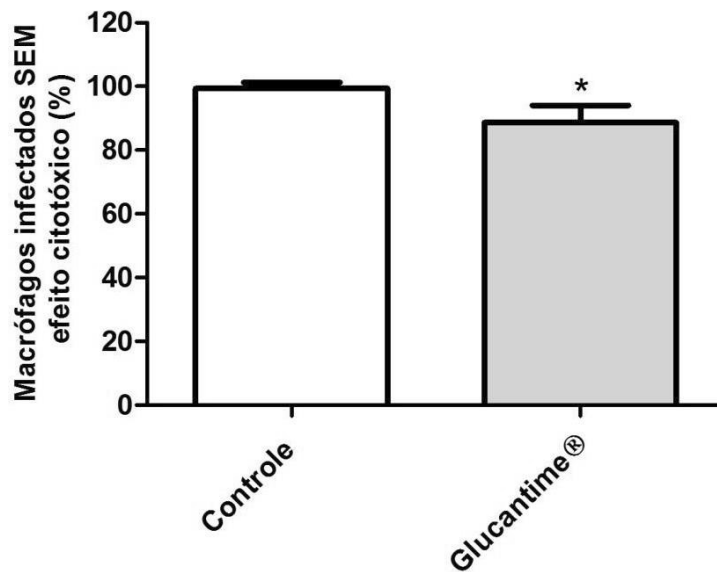


Figura 6. Efeito do Glucantime® (300 µg/mL) em macrófagos infectados após 3h de exposição avaliado pelo método de MTT. Significativamente diferente do controle * $p < 0,02$.

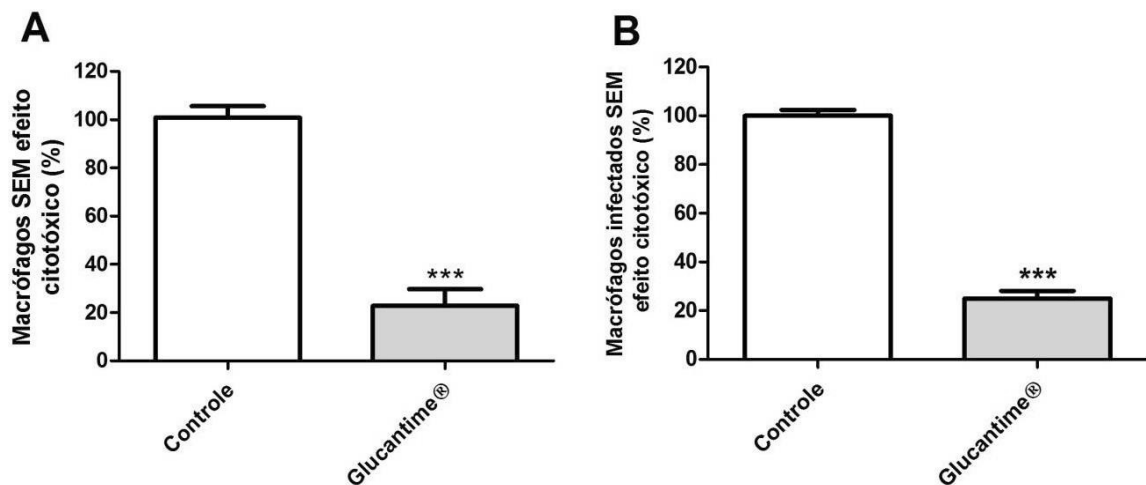


Figura 7. Efeito do Glucantime® (300 µg/mL) pelo MTT em (A) macrófagos não infectados (B) macrófagos infectados após 24h de exposição. Significativamente diferente do controle *** $p < 0,0001$.

5.3 EFEITO DO GLUCANTIME® NO AMBIENTE *REDOX* DE MACRÓFAGOS

Para avaliar o ambiente *redox* foram utilizados os níveis de produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (EROs) em macrófagos não infectados e infectados por *L. braziliensis* após exposição ao Glucantime® por três e 24 horas. Para comparação, foram considerados os grupos: 1) macrófagos não infectados expostos por três e 24 horas em relação ao controle; e

2) macrófagos infectados expostos por três e 24 horas em relação ao controle. Os valores descritos são os percentuais superiores aos obtidos no grupo controle.

Para o grupo 1, no tempo de três horas, somente o nível de NO reduziu 9,21 % (Figura 8). No tempo de 24 horas, tanto os níveis de EROs quanto os níveis de NO tiveram um aumento significativo. Os níveis de NO elevaram 327% enquanto o de EROs aumentou 283,74% (Figura 9).

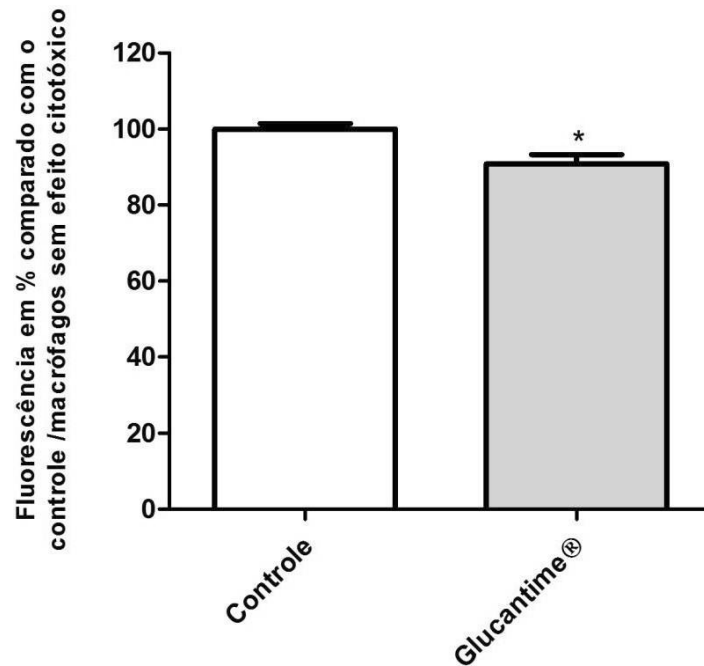


Figura 8. Níveis de NO em macrófagos não infectados após 3h de exposição ao Glucantime®. Significativamente diferente do controle * $p < 0,04$.

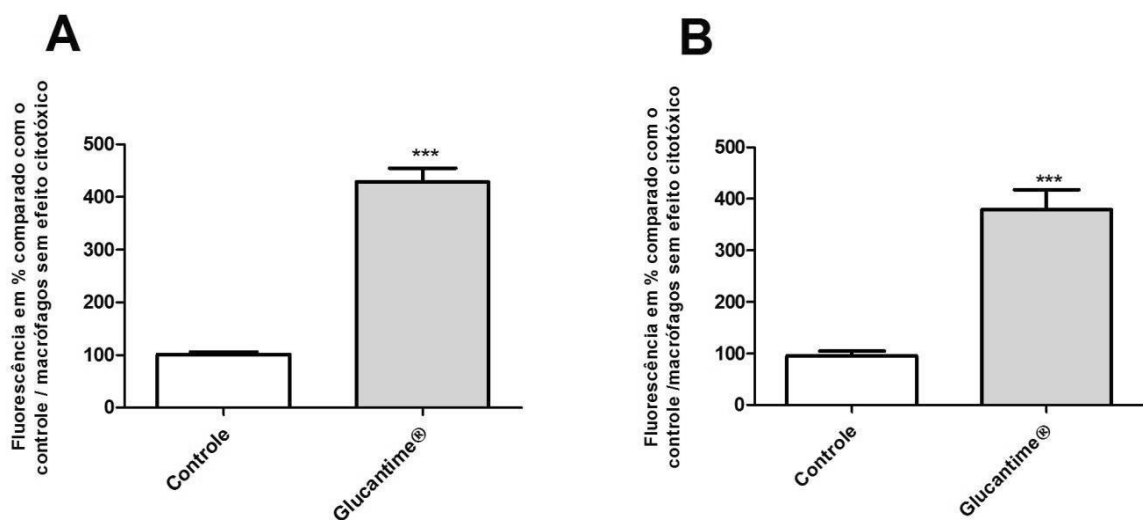


Figura 9. Níveis de espécies reativas em macrófagos não infectados após 24h de exposição ao Glucantime® (A) NO (B) EROs. Significativamente diferente do controle *** $p < 0,0001$.

Para o grupo 2, não foram observadas diferenças significativas para o tempo de três horas de exposição. No tempo de 24 horas, os níveis de espécies reativas mostrou aumento, porém, relativamente inferior aos macrófagos sem infecção, sendo NO 290,88% e EROs 261,20% (Figura 10).

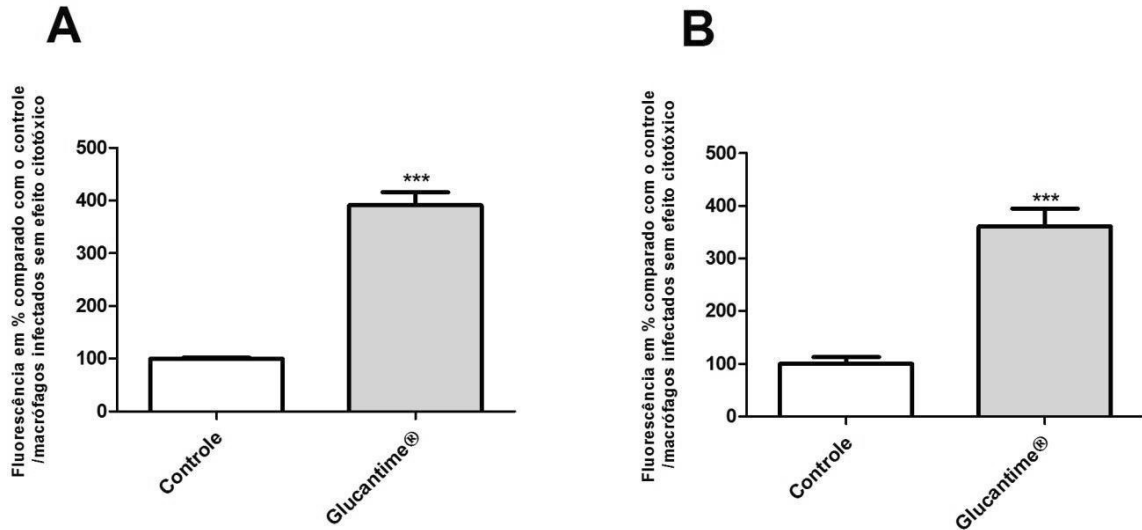


Figura 10. Níveis de espécies reativas em macrófagos infectados após 24h de exposição ao Glucantime® (A) NO (B) EROs. Significativamente diferente do controle ***p <0,0001.

5.4 FRAGMENTAÇÃO DO DNA E EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA

Para investigar qual tipo de morte celular que o Glucantime® estaria induzindo nos macrófagos, dois marcadores foram utilizados: o iodeto de propídio (IP) e a anexina V. Sendo assim, três grupos foram testados: a) branco (ausência de Anexina V-FITC e IP), b) grupo controle (sem Glucantime®/com Anexina V-FITC e IP) e c) grupo tratado (com Glucantime®/com Anexina V-FITC e IP) com macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*. O branco foi utilizado para excluir autofluorescência, portanto, somente as células com fluorescência superior ao branco foram consideradas.

Diferenças significativas foram encontradas em macrófagos não infectados e infectados na presença do Glucantime® por três horas. Os resultados mostram que quando comparados com o grupo controle, é observado que em 4,8% dos macrófagos não infectados (Figura 11) e 21,9% dos macrófagos infectados (Figura 12) foram marcadas com Anexina V-FITC.

Os grupos tratados marcados com Anexina V-FITC foram comparados, apresentando 7,4% para macrófagos não infectados e 31% para macrófagos infectados, ou seja, 23,6% a mais de células marcadas em macrófagos infectados (Figura 13). Sendo assim, houve marcação com Anexina V-FITC em macrófagos não infectados e infectados (Figura 14).

Não foram evidenciadas diferenças significativas em relação ao iodeto de propídio para este tempo de três horas.

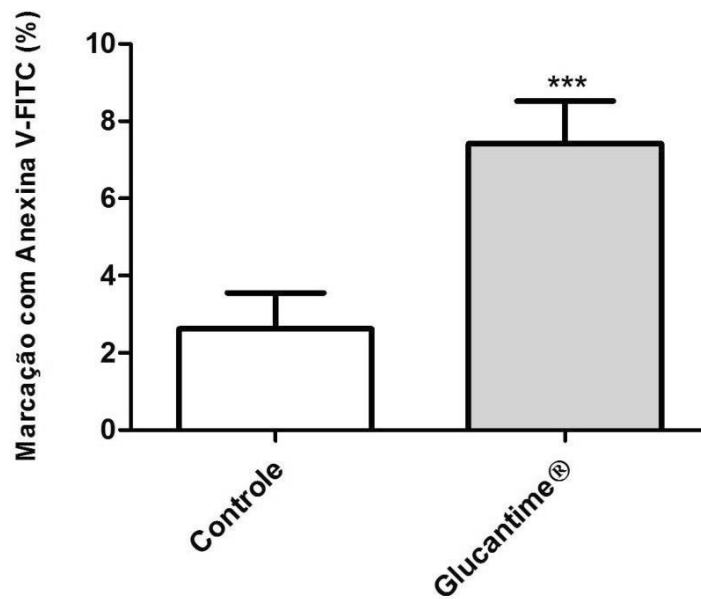


Figura 11. Marcação com Anexina V-FITC em macrófagos não infectados expostos ao Glucantime® (300 µg/mL) por 3h. Significativamente diferente do controle *** $p < 0,0001$.

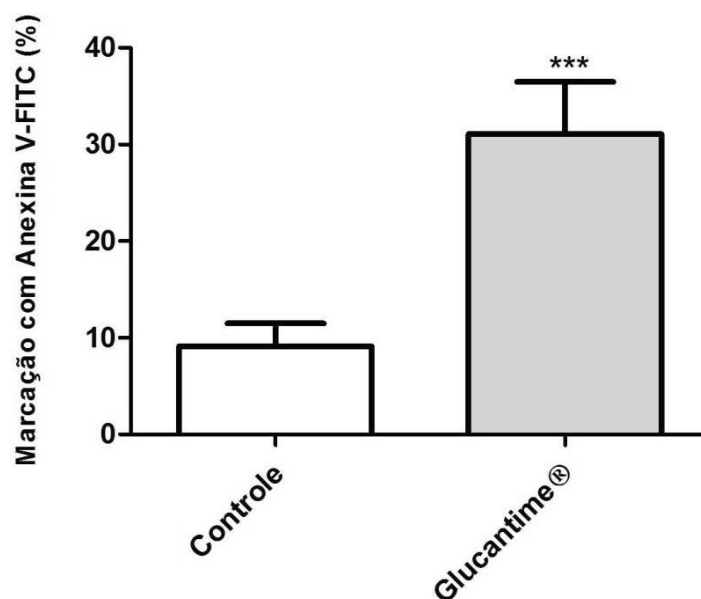


Figura 12. Macrófagos infectados marcados com Anexina V-FITC em relação ao grupo controle quando expostos ao Glucantime® por 3h. Significativamente diferente do controle *** $p < 0,0004$.

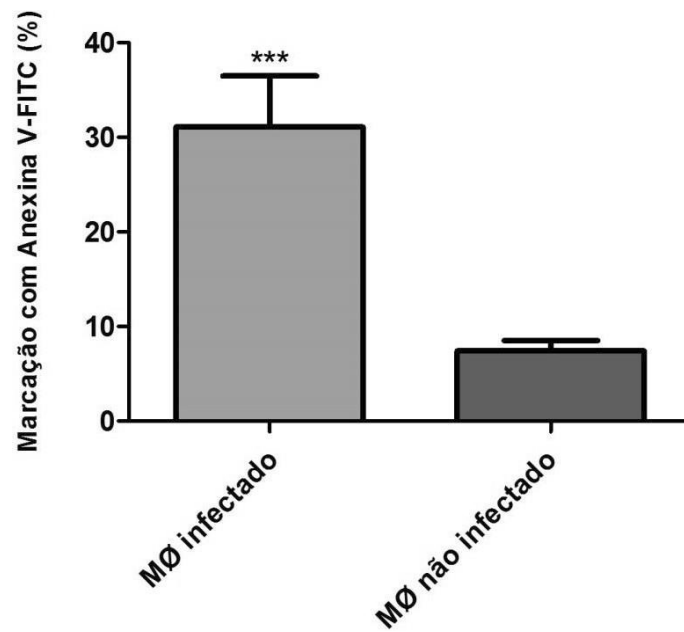


Figura 13. Macrófagos infectados e macrófagos não infectados expostos ao Glucantime® por 3h e marcados com Anexina V-FITC. Significativamente diferente comparado ao macrófago não infectado *** $p < 0,0002$. MØ = macrófago.

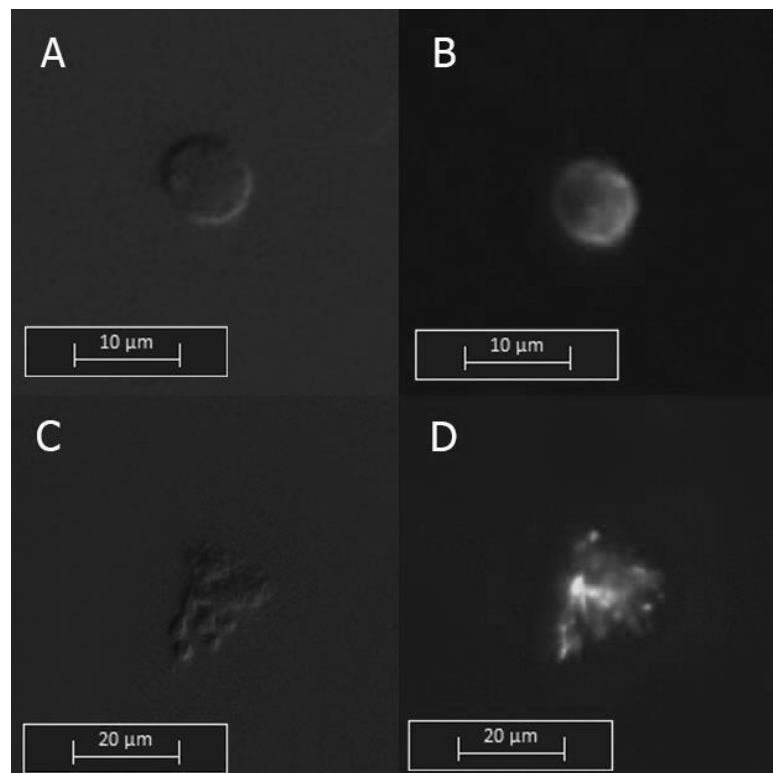


Figura 14. Microscopia representativa (A) Macrófago não infectado e (B) Macrófago não infectados marcado com Anexina V-FITC (C) Macrófago infectado (D) Macrófago infectado marcado Anexina V-FITC, quando expostos ao Glucantime® por 3h.

6 DISCUSSÃO

Os macrófagos são uma das principais células da primeira linha de defesa do sistema imune, e podem realizar diversas funções, tais como: detecção e eliminação de patógenos, produção de citocinas e quimiocinas, englobamento e eliminação de células apoptóticas (MARTIN *et al.*, 2014). Contudo, no ciclo de vida de alguns protozoários como o de *Leishmania*, os macrófagos são as células hospedeiras para a sua replicação. Após a internalização por fagocitose, a multiplicação do parasito ocorre na célula, dentro da vesícula fagocítica na forma amastigota (LIU & UZZONA, 2012).

A *Leishmania* causa as leishmanioses no hospedeiro, que apresenta diferentes formas de manifestações clínicas, de acordo com a espécie de protozoário envolvida (PEARSON & DE QUEIROZ SOUSA, 1996). O tratamento clássico para todas as formas clínicas de leishmaniose é a administração de antimoniais pentavalentes. No entanto esses medicamentos produzem graves/severos efeitos colaterais e também já existem relatos de resistência de *Leishmania* ao antimonial (WISE *et al.*, 2012; MUKHOPADHYAY *et al.*, 1996). O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está compreendido e nem qual a forma química, se a forma trivalente ou a pentavalente, é responsável pelos efeitos leishmanicidas e citotóxicos na célula hospedeira (macrófago).

Tendo em vista que há poucas informações sobre a citotoxicidade e indução de morte celular do Glucantime® em macrófagos infectados com *L. brasiliensis*, principal agente etiológico da LTA, o objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade, o provável tipo de morte celular e a atividade fagocítica de macrófagos expostos ao Glucantime®. A viabilidade celular pelo teste de exclusão de azul de tripan, que avalia a integridade da membrana plasmática, mostrou que o Glucantime® nas concentrações de 150 e 300 µg/mL, afetou a viabilidade de macrófagos não infectados em aproximadamente nove e 12% respectivamente, quando expostos por 24 horas. Estes resultados indicam que o Glucantime® nas condições avaliadas interfere na integridade da membrana celular dos macrófagos. Devido às características intrínsecas dos macrófagos infectados com *Leishmania* (formação de grumos) esta avaliação foi realizada somente em macrófagos não infectados.

O teste de citotoxicidade avaliado pelo método do MTT é baseado na capacidade das células viáveis e metabolicamente ativas converterem enzimaticamente o MTT a sais de formazam de cor púrpura, o qual é quantificado por espectrofotometria (REILLY *et al.*, 1998). Este papel é desempenhado pelas desidrogenases mitocondriais responsáveis pela reação de redução. Portanto, para que esta reação ocorra há a necessidade de que a célula esteja viável e suas mitocôndrias funcionais. Os resultados deste teste mostraram que em três horas de incubação somente para os macrófagos infectados o Glucantime® apresentou efeito citotóxico de aproximadamente 11%. Quando macrófagos não infectados e infectados foram incubados por 24 horas com Glucantime®, a citotoxicidade observada foi de 78 e 74%, respectivamente. Estes resultados mostram que o Glucantime® na concentração de 300 µg/mL foi ligeiramente mais tóxico para macrófagos não infectados, o que confirma as informações da literatura sobre o risco de graves efeitos secundários no tratamento da LTA com Sb(V). Recentemente, Da França Rodrigues *et al.* (2015) descreveram que a toxicidade seletiva dos compostos antimoniais foi maior para macrófagos nos estudos *in vitro*, do que para a *Leishmania*. Estes resultados sugerem que cerca de 26% de macrófagos infectados estão viáveis, sendo provável que este percentual pode ser suficiente para manter amastigotas de *Leishmania* em condições de proliferarem, o que pode resultar em não eficácia de 100% do Glucantime®. A possibilidade do Glucantime® causar danos em tecidos não alvos foi descrito por Cantanhêde *et al.* (2014). Esses autores relataram que o estresse oxidativo em vários órgãos vitais de camundongo, constituía a causa dos efeitos secundários do medicamento, também corroborado por Bento *et al.* (2003).

Diante da alta percentagem de citotoxicidade o provável tipo de morte celular foi investigado. Os resultados das avaliações com iodeto de propídio e Anexina V-FITC mostraram que ambos os macrófagos (não infectados e infectados) quando expostos durante três horas com Glucantime® apresentaram morte celular sugestivo de apoptose. Ao comparar macrófagos não infectados com macrófagos infectados observa-se uma percentagem de 23% a mais de células com característica de apoptose em macrófagos infectados. Alguns autores demonstraram o efeito tóxico do Sb(III) sobre outras espécies de *Leishmania* com a indução de apoptose em amastigotas intracelulares de *L. donovani* (SHAHA, 2006;

SUDHANDIRAM & SHAHA, 2003), ou pela morte celular com características apoptóticas em amastigotas axênicas de *L. infantum* (SERENO *et al.*, 1998).

Nas condições testadas não foi observado fragmentação do DNA evidenciada pela ausência de marcação pelo iodeto de propídio. A ausência de dano ao DNA nos resultados encontrados estão em conformidade com Lima *et al.* (2010) que não evidenciaram danos causados pelo Glucantime®, em três e 24 horas de exposição, em linfócitos. Além disso, a ausência de marcação com iodeto de propídio após exposição ao Glucantime® por três horas em macrófagos não infectados está em conformidade com o teste de exclusão pelo azul de tripan, o qual não evidenciou inviabilidade celular significativa, ou seja, não ocorreu rompimento de membrana nos macrófagos não infectados.

Como o Sb(V) já foi demonstrado ser citotóxico para o macrófago com indícios de danos sobre as mitocôndrias no tempo de três horas, este tipo de alteração pode desencadear a morte celular por apoptose via liberação para o citosol do citocromo c, assim como de outras proteínas mitocondriais chaves para ativar mecanismos de morte celular dependente ou não dependente de caspases. Os resultados de citotoxicidade observados pelo teste MTT, o qual avalia a função mitocondrial estão em concordância com as evidências de morte celular por apoptose.

Os dados obtidos sobre o metabolismo oxidativo no macrófago mostraram que o Glucantime® não induz a produção de espécies reativas durante as primeiras horas, no entanto, após 24 horas de exposição em macrófagos não infectados e infectados as espécies reativas são evidenciadas. Estes dados vão de encontro aos da atividade fagocítica, onde os índices de fagocitose aumentaram com a exposição ao composto estudado. Por outro lado, é observado que nos macrófagos infectados, a produção de espécie reativa induzida pela presença de Glucantime® foi menor, corroborando com descrições de Castellano (2005) que demonstram que a *Leishmania* é capaz de inibir o *burst* oxidativo induzido pelo macrófago o que deixaria a célula incapaz de exercer seu papel na defesa do organismo.

O resultado de atividade fagocítica *in vitro* mostrou que o Glucantime® induziu significativamente a fagocitose de macrófagos para *Saccharomyces cerevisiae*, após 24 horas de exposição. Esta é uma resposta que as células em geral apresentam sob estresse químico, ou seja, são ativadas (como no caso dos macrófagos) ou em outros tipos celulares, ativam mecanismos de sobrevivência nestas

circunstâncias, fenômeno conhecido por hormese (BOELSTERLI, 2007). Esse dado corrobora esta informação uma vez que os macrófagos foram nitidamente ativados após a exposição ao xenobiótico em questão. O fato é que este tipo de comportamento celular não indica que este medicamento não seja tóxico, na verdade dá a falsa impressão de que é benéfico para a célula (hormese). Se fosse observado um tempo maior de exposição, provavelmente o nível de atividade fagocítica poderia diminuir.

Por outro lado, o fato de ter sido explorado apenas o tempo de 24 horas, indica a eficácia do tratamento em tempo mais prolongado, onde o sistema imunológico inato sofreria picos de ativação. Isso poderia ser benéfico para o combate dos protozoários, mas não necessariamente para a integridade e funcionamento do sistema imunológico. De acordo com De Saldanha *et al.* (2012), o Glucantime® induz a ativação do macrófago, no qual, a atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica são rapidamente aumentadas, o que foi corroborado pelo presente estudo. O fato dos macrófagos ativados serem maiores que os não ativados, possuírem maior aderência, espriar e também maior capacidade de endocitose (Lopes, 2014) corrobora a hipótese de que a eficiência do tratamento possa ser na ativação do macrófago pelo medicamento.

Os resultados deste estudo corroboram com as informações de que os antimoniais são tóxicos para células infectadas e não infectadas, ou seja, não confere especificidade, o que pode ser responsável pela gravidade dos efeitos colaterais. Embora não tenham sido investigados os mecanismos de ação do Glucantime®, os resultados deste estudo mostram que o Glucantime® *per si* leva o macrófago a um estado microbicida.

Desta forma, seria interessante investigar se o Glucantime® é de fato responsável por danos em outros tecidos evidenciando seu efeito secundário para o organismo.

7 CONCLUSÕES

- O Glucantime® aumenta a capacidade fagocítica de macrófagos;
- O Glucantime® é citotóxico para macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*;
- O Glucantime® leva ao aumento de espécies reativas para macrófagos não infectados e infectados com *L. braziliensis*;
- O Glucantime® induz morte celular característico de apoptose em macrófagos infectados com *L. braziliensis* em três horas de exposição.

8 PERSPECTIVAS

- Investigar o papel do Sb(V) e (III) na ativação dos macrófagos por meio de estudos *in vivo* e avaliar os efeitos secundários do tratamento;
- Avaliar a citotoxicidade do Sb(V) e (III) em formas amastigotas de *L. braziliensis*;
- Investigar o papel do Sb(V) e (III) em outras células para entender o seu potencial tóxico como efeito secundário ao tratamento;
- Investigar os mecanismos de morte celular em macrófagos não infectados, infectados com *L. braziliensis* e, em formas amastigotas de *L. braziliensis* expostos ao Sb(V) e (III) abordando outras metodologias como, por exemplo, a ativação de caspases, citocromo c citosólico e proteínas pró e antiapoptóticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. HH; PILLAI, S.. **Imunologia celular e molecular**. Elsevier Brasil, 2007.

ADRIAZOLA, I. O. et al. Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex *in vitro*. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 132, p. 45-51, 2014.

AIT-LOUDHIA, K. *Leishmania* antimony resistance: what we know what we can learn from the field. **Parasitology Research**, v. 109, p. 1225-1232, 2011.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A.R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, v. 112, n. 18, p. 2993-3002, 1999.

ALVES, P. F. R.; RIBAS-SILVA, R.C. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana na região centro ocidental do Paraná. **Revista de Saúde Biologia**, Campo Mourão, v.8, n.1, p.77-84, 2013.

BACHA, H. A. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* identification by PCR in the State of Para, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.105, p. 173-178, 2011.

BADIOCCO, P. et al. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis†. **Journal of medicinal chemistry**, v. 52, n. 8, p. 2603-2612, 2009.

BAPTISTA, C. et al. Evaluation of genetic polymorphism of *Leishmania (V.) braziliensis* isolates obtained from the same patient before and after therapeutic failure or reactivation of cutaneous lesions. **Journal of Tropical Medicine**, p. 1-5, 2012.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p. 328-337.2004.

BEDOYA-PACHECO, S. J. et al. Endemic tegumentary leishmaniasis in Brazil: correlation between level of endemicity and number of cases of mucosal disease. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n.6, p. 901-905. 2011.

BENOV, L.; SZTEINBERG, L.; FRIDOVICH, I.; Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic. Biol. Med.**, v.25, p.826-831, 1998.

BENTO, D. B. et al. Oxidative stress in mice treated with antileishmanial meglumine antimoniate. **Research in veterinary science**, v. 95, n. 3, p. 1134-1141, 2013.

- BLACKWELL, J. M. et al. Macrophage complement and lectin-like receptors bind *Leishmania* in the absence of serum. *The Journal of experimental medicine*, v. 162, n. 1, p. 324-331, 1985.
- BOELSTERLI, U. A. **Mechanistic toxicology: the molecular basis of how chemicals disrupt biological targets**. CRC Press, 2007.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M.C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular immunology**, v. 279, n. 2, p. 180-186, 2012.
- BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45, n.4, p.425-429, 2012.
- BUCHI, D.F., DE SOUZA, W. Internalization of surface components during ingestion of *Saccharomyces cerevisiae* by macrophages. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 24, p.135–141, 1992.
- BUSSOLARO, D.; FILIPAK NETO, F.; GARGIONI, R.; FERNANDES L.C.; RANDI, M.A.F.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; The immune response of peritoneal macrophages due to exposure to inorganic lead in the house mouse *Mus musculus*. **Toxicology in Vitro**, v.22, p. 254–260, 2008.
- CANTANHÊDE, L. F. et al. Soy isoflavones have antimutagenic activity on DNA damage induced by the antileishmanial Glucantime (meglumine antimoniate). **Drug and chemical toxicology**, v. n. 0, p. 1-6, 2014.
- CASTELLANO, L. Resposta imune anti-*Leishmania* e mecanismos de evasão Anti-*Leishmania* immune response and evasion mechanisms. **Vitae academia biomédica digital**, n. 25, 2005.
- CASTRO, E. A. et al. Eco-epidemiological survey of *Leishmania (Viannia) braziliensis* american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Ribeira Valley River, Paraná State, Brazil. **Acta Tropica**, v.93, p. 141-149, 2005.
- CASTRO, E. A. et al. Estudo das características epidemiológicas e clínicas de 332 casos de leishmaniose tegumentar notificados na região norte do Estado do Paraná de 1993 a1998. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.5, p.445-452, 2002.
- CRUZ, C. F. R.; CRUZ, M. F. R.; GALATI, E. A. B. Sandflies (Diptera: Psychodidae) in rural and urban environments in an endemic area of cutaneous leishmaniasis in southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 303-311, 2013.
- CUERVO, P. et al. *Leishmania (Viannia)*: genetic analysis of cutaneous and mucosal strains isolated from the same patient. **Experimental Parasitology**, v.108, p.59-66, 2004.

CURRIE, A. R. et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, p. 239-57. 1972.

DA FRANCA RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 160, p. 32-40, 2015.

DAS, B. B. et al. Topoisomerase research of kinetoplastic parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. **Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 221, 2006.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**, v. 114, n. 13, p.2461-2469, 2001.

DE BARROS, M. P. et al. Mecanismos específicos de patogenicidade de protozoários intracelulares: *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Plasmodium* spp. **Revista Liberato**, v. 13, n. 20, p.647-662, 2012.

DE SALDANHA, R. R. et al. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 596-603, 2012.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony (V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1570, p.192-198, 2002.

DESCHACHT, M. et al. Role of oxidative stress and apoptosis in the cellular response of murine macrophages upon *Leishmania* infection. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p.1429-1437, 2012.

EBRAHIMISADR, P.; GHAFARIFAR, F.; HASSAN, Z. M. *In-vitro* Evaluation of Anti-leishmanial Activity and Toxicity of Artemether with Focus on its Apoptotic Effect. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 4, p. 903-909, 2013.

EL-HANI, C. N. et al. Apoptosis and apoptotic mimicry in *Leishmania*: an evolutionary perspective. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p.1-6, 2012.

FARIAS, L. H. S. et al. Phosphatidylserine exposure and surface sugars in two *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* strains involved in Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 207, p. 537-43, 2013.

FERNÁNDEZ, O. L. et al. Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania* *Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2871, 2014.

FERREIRA, C. C.; MAROCHIO, G. G.; PARTATA, A. K. Estudo sobre a leishmaniose tegumentar americana com enfoque na farmacoterapia. **Revista Científica do ITPAC**, v.5, n.4, Pub.1, 2012.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, n. 7, p.2317-2336, 2009.

GANNAVARAM, S.; DEBRABANT, A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p.1-9, 2012.

GARCIA, F. P. et al. Eupomatenoïd-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p.1-11, 2013.

GE, R.; SUN, H. Bioinorganic chemistry of bismuth and antimony: target sites of metallodrugs. **Accounts of chemical research**, v. 40, n. 4, p. 267-274, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 1-80, 2003.

GRAÇA, G. C. et al. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 5, p. 664-674, ago. 2012.

GRISARD, E. C. Characterization of *Leishmania* sp. strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. **Acta Tropica**, v. 74, p. 89-93, 2000.

HAUGLAND, R.P.; Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, **Molecular Probes**, Leiden, 1996.

HORIKAWA, M. M.; PEÑA, M. S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. **Revista da Biologia**, v. 6b., p. 36-37, 2011.

JAEGER, T.; FLOHÉ, L.. The thiol-based redox networks of pathogens: unexploited targets in the search for new drugs. **Biofactors**, v. 27, n. 1, p. 109-120, 2006.

JIMÉNEZ-RUIZ, A. et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasit Vectors**, v. 3, p. 104, 2010.

JÚNIOR, R. D. N. et al. Estudo de uma série de casos de leishmaniose tegumentar americana no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 38, n. 2, p.103-114, 2009.

KARP, G. **Biologia celular e molecular**. Editora Manole Ltda, 2005.

KATO, K.C. et al. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of residual Sb (III) and protective effect of ascorbic acid. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 481-488, 2014

LEE, N. et al. Characterization of Metacaspases with Trypsin-Like Activity and Their Putative Role in Programmed Cell Death in the Protozoan Parasite *Leishmania*. **Eucaryotic Cell**, v. 6, n. 10, p. 1745-1757, 2007.

LESSA, M. M. et al. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista brasileira de otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843-847, 2007.

LIMA, A.C.V.M.R. **Estudo da variabilidade genética de *Leishmania (Viannia) braziliensis* Vianna, 1911 de diferentes regiões do Brasil**. 2010. 166 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LIMA, M. I. S. et al. Genotoxic effects of the antileishmanial drug glucantime®. **Archives of toxicology**, v. 84, n. 3, p. 227-232, 2010.

LIMA, E. B. de et al. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. bras. dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111-124, 2007.

LIMA, M. V. N. et al. Atendimento de pacientes com leishmaniose tegumentar americana: avaliação nos serviços de saúde de municípios do noroeste do Estado do Paraná, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 12, p. 2938-2948, 2007

LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, p. 1-8, 2012.

LOPES, M. F.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; DOSREIS, G. A. Innate Immunity to *Leishmania* Infection: Within Phagocytes. **Mediators of inflammation**, v. 2014, p. 1-8, 2014.

MARLOW, M. A. et al. Divergent profile of emerging cutaneous leishmaniasis in subtropical Brazil: new endemic areas in the southern frontier. **PlosOne**, v. 8, n.2, p. e56177, 2013.

MARR, A. K.; MCGWIRE, B. S.; MCMASTER, W. R.. Modes of action of Leishmanicidal antimicrobial peptides. **Future microbiology**, v. 7, n. 9, p. 1047-1059, 2012.

MARSDEN, P. D. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, n. 3, p. 187-198, 1985.

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. **Current opinion in microbiology**, v. 17, p. 17-23, 2014.

MESLIN, B.t et al. Are protozoan metacaspases potential parasite killers. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 26, p. 1-7, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Indicadores e dados básicos, 2012**. Disponível em <http://tabnet.datasus.gov.br/>. Acesso em 29 Ago. 2014

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de vigilância em saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. 2007.

MIRANDA, E. S. et al. Developmental toxicity of meglumine antimoniate and transplacental transfer of antimony in the rat. **Reproductive Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 292-300, 2005.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MISKO, T.; SCHILLING, R.J.; SALVEMINI, D.; MOORE, W.M.; CURRIE, M.G.; A fluorometric assay for the measurement of nitrite in biological samples, **Anal. Biochem**; 214, 6–11, 1993.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 63, n. 2, p. 309-322, 2012.

MONTEIRO, W. M. et al. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.24, n.6, p. 1291-1303, 2008.

MOREIRA, M. E., et al. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania amazonensis*. **J. Cell Physiol**, v. 167, p. 305-313. 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R.R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v.15, n.3, p.376-381, 2011.

MUKHOPADHYAY, R. et al. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 93, n. 19, p. 10383-10387, 1996.

OLIVEIRA, S. M.; OLIVEIRA, C. C.; ABUD, A.P. R.; GUIMARÃES, F.S.F.; BERNARDI, R. P.; COLETTI, E.; BUCHI, D. F., *Mercurius solubilis*: action son macrophages. **Homeopathy**; 100, 228 e 236 ,2011.

PAHO - Pan American Health Organization, 2013. Disponível em: <<http://www.paho.org/>>. Acesso em: 03 Jun. 2013.

PASSOS, L. N. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) no diagnóstico da leishmaniose cutânea no Estado do Espírito Santo, Brasil**. 2003. 157 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, Anastacio. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, p. 1-11, 1996.

PETERS, N. C. et al. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970-974, 2008.

- PHILLIPS, H. J.; Dye exclusions tests for cell viability. In: Tissue Culture, methods and applications, Kruse, J. R.; Patterson, J. R. M. K. (eds). A. P.: **New York**, p. 406-408, 1973.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A.. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2015.
- REILLY, T. P.; BELLEVEUE, F. H.; WORSTER, P. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v. 55, p. 803-808, 1998.
- REIS, S. R. et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. **Acta Amazonica**, v.43, n.1, p. 121-124. 2013.
- RODRIGUES, A. M. et al. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniatos de meglumina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.2, p.139-145, mar./abr. 2006.
- SALAÜN, P.; FRÉZARD, F. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, n. 15, p. 5201-5214, 2013.
- SAMPAIO, R. N. R. et al. Leishmaniose tegumentar americana associada à AIDS: relato de quatro casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p.651-654, 2002.
- SCHUBACH, A. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n.6, p. 824-827, 1998.
- SERENO, D. et al. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 7, p. 2064-2069, 2001.
- SERENO, D. et al. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 12, p. 3097-3102, 1998.
- SHAHA, C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 123, n. 3, p. 233, 2006.
- SHARLOW, E. R. et al. Auranofin Is an Apoptosis-Simulating Agent with in Vitro and in vivo Anti-leishmanial Activity. **ACS chemical biology**, v. 9, n. 3, p. 663-672, 2013.
- SHAW, C. D.; CARTER, K. C. Drug delivery: lessons to be learnt from *Leishmania* studies. **Nanomedicine**, v. 9, n. 10, p. 1531-1544, 2014.

SILVA, D. M. **Estudos de algumas populações de *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) procedentes de áreas de transmissão de Leishmaniose Tegumentar Americana no Norte e Nordeste do Brasil.** 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – FIO- CRUZ, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SILVA, A. C. V. et al. Avaliação “in vitro” da infectividade de amostras de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **Amazônia Ciência e Cultura**, 2009.

SILVA, A. M. et al. Diversidade, distribuição e abundância de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) no Paraná. **Neotropical Entomology**, v.3, n.2, p. 209-225, 2008.

SILVA, E. S. da et al. Visceral leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in a patient infected with human immunodeficiency virus. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 145-149, 2002.

SILVEIRA, F. T. et al. Revisão sobre a patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com ênfase à doença causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9-20, 2008.

SILVEIRA, T. G. et al. Observações sobre o diagnóstico laboratorial e a epidemiologia da leishmaniose tegumentar no Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.32, n.4, p. 413-423, 1999.

SOFLAEI, S. et al. *In Vitro* Antiparasitic and Apoptotic Effects of Antimony Sulfide Nanoparticles on *Leishmania infantum*. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 1-7, 2012.

SOLEIMANIFARD, Simindokht et al. P-glycoprotein A Gene Expression in Glucantime-Resistant and Sensitive *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, n. 3, p. 423-428, 2014.

SOLOMON, M. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis in travelers. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 68, n. 2, p. 284-289, 2012.

STRAZZULA, A. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. **BioMed Research International**, vol. 2013, p. 1-7, 2013.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 27, p. 25120-25132, 2003.

TSIATSIANI, L. et al. Metacaspases. **Cell Death & Differentiation**, v. 18, n. 8, p. 1279-1288, 2011.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337-351, 2011.

WANDERLEY, J. L. M.; BARCINSKI, M. A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. **Cellular and molecular life sciences**, v. 67, n. 10, p. 1653-1659, 2010.

WHO – World Health Organization, 2012. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso em: 30 Ago. 2014.

WISE, E. S. et al. Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travellers with new world cutaneous leishmaniasis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. e1688, 2012

ANEXO 1 - ARTIGO SUBMETIDO NA REVISTA TOXICOLOGY IN VITRO.

Cytotoxicity evidences of Antileishmania Meglumine Antimoniate (Sb^{5+}) in non-infected and infected macrophages by *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Izanara Cristine Pritsch^a, Andressa Glinski Pessotto^b, Guilhermina Rodrigues Noletto^c, João Carlos Minozzo^d, Alceu Bisseto Junior^e, Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro^b, Magda Clara Vieira Da Costa-Ribeiro^{a,*}

^aDepartment of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Polytechnic Center, Curitiba, Paraná, Brazil

^bDepartment of Cellular Biology, Federal University of Paraná, Polytechnic Center, Curitiba, Paraná, Brazil

^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Polytechnic Center, Curitiba, Paraná, Brazil

^dProduction and Research Center of Immunobiology (CPPI), Piraquara, PR, Brazil

^eCoordination in Entomology, Ministry of Health of Paraná, Curitiba, PR.

*Corresponding author. Tel.: +55 41 3361 1701;

E-mail address: magdaribeiro@ufpr.br, magdacostaribeiro@gmail.com

(M.C. Vieira da Costa-Ribeiro).

Abstract

The pentavalent antimony has been used as therapeutic agents for all forms of Leishmaniasis in the last 70 years, but few are known about its side effects. According to the literature pancreatitis, hepatotoxicity and nephrotoxicity have been related as risks involved in the treatment of the disease. The higher cytotoxicity observed to macrophages exposed to Sb demonstrates the potential toxic effects of Sb(V) or even Sb(III) to the host cell. The current results showed that Sb is toxic to both non-infected and infected macrophages by *Leishmania*. The observed disturbs in mitochondria strongly suggest that Sb exposure may develop to apoptosis or even necrosis destroying the host cells. Therefore, the toxic mechanism of Sb in host cells and parasite must be investigated in order to elucidate the efficiency of the antimony treatment to Leishmaniasis.

Keywords: Meglumine antimoniate toxicity, macrophages and leishmaniasis

Introduction

The Leishmaniasis is endemics in 98 countries and is considered by the World Health Organization as a neglected tropical disease (PACE, 2014; WHO, 2014). The pentavalent antimonial agents (Sb^{5+}) were introduced since 1940 (Kato et al., 2014) in the original form of

sodium stibogluconate (Pentosam[®]) or meglumine antimoniate (Glucantime[®]), and used as therapeutic agents for all forms of Leishmaniasis. Glucantime[®] has been the most indicated in cutaneous leishmaniasis treatment in Brazil (Ministry of Health, Brazil, 2007) where the toxic effects are not completely elucidated (Marsden, 1985; Salaün, 2013) for both parasite and target host cells as macrophages. Thus the focus of the current study was to investigate same aspects related to cytotoxicity in macrophages infected and non-infected by *Leishmania (Vianna) braziliensis* but exposed to Glucantime[®]. This species is the most important causative agent of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and the most common specie in the Americas (Lainson & Shaw, 1998).

Material and methods

Reagents: (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) (MTT) and Schneider's medium, RPMI 1640 culture medium, Pen Strep (Penicillin Streptomycin), Meglumine antimoniate (Glucantime[®]) were obtained from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO).

Macrophage primary culture: The peritoneal macrophages were collected from Albino Swiss mice (6–8 weeks old) by infusing in the peritoneal cavity with 8–10 mL of phosphate buffered saline (PBS) and cultivated in culture medium RPMI 1640 supplemented with 5% fetal bovine serum and antibiotics (penicillin streptomycin) in 24 well plates (5×10^5 cells/well). After 2 h of incubation at 37 °C under 5% CO₂ in a humidified incubator, non- adherent cells were removed by washing twice with PBS at 37 °C. All experimental procedures were according to Brazilian legislation (Law No. 6.638,05, 1979) and approved by the Animal Ethics Committee from Federal University of Parana, Sector of Biological Center number 714.

Culture of Promastigotes Leishmania: *Leishmania (Vianna) braziliensis:* promastigotes were cultured at 24 °C in Evans' modified Tobie's medium (EMTM). In the exponential phase

the cells were transferred and maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) and 100 µg/ml penicillin streptomycin.

Cytotoxicity procedures

Effect of meglumine antimoniate (MA) on peritoneal macrophages cell viability: The macrophages (5×10^5) were treated with Glucantime® 300 µg/mL for 24h of incubation at 37 °C under 5% CO₂. The cytotoxicity was evaluated using a MTT reagent and Trypan blue exclusion, as described by Mosman (1983) and Philips (1973) respectively after adaptations.

Effect of meglumine antimoniate (MA) on peritoneal macrophages infected with L.

braziliensis cell viability: The macrophages (5×10^5) were infected with 2.5×10^6 log-phase promastigotes in 24 well dishes for 12h of incubation at 34 °C under 5% CO₂. After 12h of incubation, the cells were treated with Glucantime® (300 µg/mL) for 24h incubation at 37 °C under 5% CO₂. After the exposure the viability was evaluated trough MTT reagent, as described by Mosman (1983).

Statistical Procedures: The results were expressed as mean±SD of three independent experiments, each performed in triplicate. Differences between groups were analyzed using t test on Graph-Pad Prisms software version 5.0, considering the *p* value < 0.05 as statistically significant.

Results and discussion

The cytotoxicity of meglumine antimoniate (Sb⁵⁺) (300 µg/mL) measured by MTT reagent increased after 24 h of exposure for both tested groups. Additionally, the evidences of Sb (pent or trivalent chemical form) cytotoxicity was highlighted by the decrease of cell viability in non-infected macrophages (78%, ****p*<0.0001) and infected macrophages with amastigotes *Leishmania* form (74%, ****p*<0.0001), when compared to non-exposed group (C) (Figure 1). Also, the trypan blue exclusion test showed a significant decrease in the viability

of macrophage after Sb exposure (13%, 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) when compared to non-exposed group (data not showed).

In humans macrophages are the primary resident cell for *Leishmania*. After internalization by phagocytosis the parasite proliferation occurs into the cell within the phagosome vesicle. In the luminal environment of phagolysosome the promastigotes form develops to amastigotes *Leishmania* form, and the parasites survive into the host cell (Liu, 2012). To access the parasite and take effect, the meglumine antimoniate compounds must cross multiple membranes, as the macrophage plasmatic membrane, phagolysosome vesicle or parasitophorous vacuole and finally the parasite plasmatic membrane (SHAW, 2014). In fact the Sb(III) means to be the most accessible chemical form of antimony due to a metabolic conversion present into the host cell and has used in the majority of studies of cytotoxicity. The absence of data about toxicity of the original chemical form of antimony (Sb^{5+}) stimulated the current investigation. Thus the knowledge about the antimony cytotoxicity is relevant to understand its mechanism of toxicity and the risk of side-effects as pancreatitis, hepatotoxicity and nephrotoxicity (Wise et al., 2012) in the treatment of the disease.

The present results reveal that meglumine antiamoniate is toxic to both macrophages and amastigote *Leishmania* form (ALF). The higher cytotoxicity observed to macrophages exposed to Sb(V) clearly demonstrated that this chemical form is potentially toxic to these cells. In this sense, the treatment involves not only the success to combat the ALF proliferation, but also showed its expressive cytotoxicity to macrophages. Curiously a less effective cytotoxicity effect was found in macrophages after parasite internalization. As in the present study the cytotoxicity was based on MTT test, it is well described that damages in mitochondria may develop to cell death, including apoptosis or even necrosis. Again the current data confirm the potential toxicity of Sb(V) to macrophages and the eminent risk of the treatment. A new and intriguing question is why the infected macrophage by amastigote

form is more resistant to the Sb(V) treatment? Additionally, a coevolutionary process may drive mechanisms in order to favor the success of the parasite cycle within the host cell, explaining the lower cytotoxicity under chemical stress. Rodrigues et al. (2015) also described a selective toxicity of meglumine antimoniate *in vitro* to macrophages than to *Leishmania* corroborating the risk of severe side-effects due to the treatment with Sb(V), as mentioned above.

Although studies have suggested that the conversion to trivalent chemical form of antimony, favored by the intracellular acid environment, increase the toxic effect to amastigote *Leishmania* form (Frézard et al., 2009; Salaun et al., 2013), but nothing is noticed concern to the toxic effect of Sb(V) to both host and parasite cells. Also the cellular level where the conversion occurs is not totally elucidated. The high cytotoxicity as described here to macrophage suggest that this conversion can occur within the host cell, even in absence of *Leishmania*, and may lead to macrophage death destroying the host cells. This proposition is against the postulated by Das et al (2006) and Mishra et al (2007), where is suggested that meglumine antiamoniate acts on the parasite.

The current results showed that Sb(V) present cytotoxicity to host cell and parasite trough disturbs in cell mitochondrial activity, but few was evaluated in terms of mechanism about the hole of Sb(III) or Sb(V) as a causal effect. Although Wise et al. (2012) proposed that Sb(V) suffer reduction in acid intracellular compartment to release Sb(III), considered the most toxic form, why infected macrophage showed less cytotoxicity if both infected and non-infected cells present these compartments? Additionally, our results lead to another hypothesis where Sb(V) is toxic to host cells trough an independent way. Theoretically the infected macrophage present more acid compartments due to the cell activation but controversially showed less cytotoxicity. Most of these questions should be investigated in order to elucidate

the toxic mechanisms and discuss the efficiency of the Sb(V) treatment to Leishmaniasis and the real risks involved to patients.

Conflict of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thanks for *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (Capes) and National Council for Scientific and Technological Development Agency (CNPq) for financial support and Federal University of Parana.

References

- Da Franca Rodrigues, K. A., Amorim, L. V., Dias, C. N., Moraes, D. F. C., Carneiro, S. M. P., & de Amorim Carvalho, F. A., 2012. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation *in vitro*. *Journal of ethnopharmacology*. 160, 32-40.
- Das, B. B., Sen, N., Dasgupta, S. B., Ganguly, A., Das, R., & Majumder, H. K., 2006. Topoisomerase research of kinetoplastic parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics. *Indian Journal of Medical Research*. 123(3), 221.
- Frézard, F., Demicheli, C., & Ribeiro, R. R., 2000). Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*. 14(7), 2317-2336.
- Kato, K. C., Morais-Teixeira, E., Reis, P. G., Silva-Barcellos, N. M., Salaün, P., Campos, P. P., & Frézard, F., 2014. Hepatotoxicity of pentavalent antimonial drug: possible role of

residual Sb (III) and protective effect of ascorbic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 58(1), 481-488.

Lainson R & Shaw JJ., 1998 New World leishmaniasis. The neotropical *Leishmania* species. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infectious Diseases*. 9, 241–266.

Liu, D., & Uzonna, J. E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2.

Marsden, P. D., 1985. Pentavalent antimonials: old drugs for new diseases. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 18(3), 187-198.

Ministry of Health – BR., 2007. Department of health surveillance. *Surveillance Manual ATL*.

Mishra, J., Saxena, A., & Singh, S., 2007. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current medicinal chemistry*, 14(10), 1153-1169.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 65(1), 55-63.

Pace, D., 2014. Leishmaniasis. *Journal of Infection*. 69, S10 e S18.

Phillips, H. J., 1973. Dye exclusion tests for cell viability. In *Tissue culture methods and applications Academic Press New York*. 406-40.

Salaün, P., & Frézard, F., 2013. Unexpectedly high levels of antimony (III) in the pentavalent antimonial drug Glucantime: insights from a new voltammetric approach. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 405(15), 5201-5214.

Shaw, C. D., & Carter, K. C., 2014. Drug delivery: lessons to be learnt from *Leishmania* studies. *Nanomedicine*, 9(10), 1531-1544.

Wise ES, Armstrong MS, Watson J, Lockwood DN., 2012 Monitoring toxicity associated with parenteral sodium stibogluconate in the day-case management of returned travelers with New World cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1688.

World Health Organization (WHO). Leishmaniasis. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> [accessed 14.12.14].

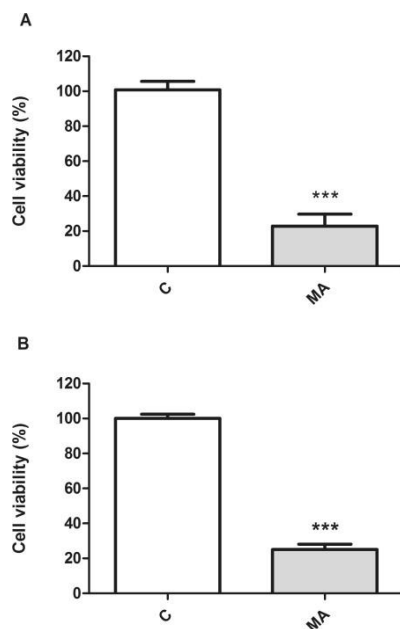


Figure captions

Figure 1. Evaluation of Meglumine antimoniate (Sb^{5+}) cytotoxicity through MTT reagent in: (A) macrophage, (B) infected macrophage with *Leishmania* form. * Significantly different from control, *** $P < 0.001$ s. C = non-exposed group, MA = exposed groups.

ANEXO 2 – SOLUÇÕES

TOBIE - EVANS

- 2 g ágar bacteriológico
- 0,8 g de cloreto de sódio
- 0,3 g de extrato de carne
- 0,2 g de peptona
- 100 mL água purificada

Preparo do meio:

Alíquotar dois mL por tubo. Autoclavar a 121°C por 20 minutos. Adicionar 0,2 mL por tubo de sangue de coração de coelho. Retirar um tubo para teste de esterilidade.

RPMI 1640

- 16,4 g RPMI 1640
- 2 g bicarbonato de sódio
- 100 µg/mL penicilina estreptomina
- 1000 mL água purificada q.s.p.
- Corrigir o pH para 7.2 – 7.4

Preparo do meio:

Filtrar em membrana 0,22 µm e retirar uma alíquota para teste de esterilidade.

PBS

- 1,99 g fosfato de sódio dibásico
- 0,355 g fosfato de sódio monobásico

- 8,18 g cloreto de sódio
- 1000 mL água purificada
- Corrigir o pH para 7.2

Preparo:

Autoclavar a 121°C por 20 minutos.

REAGENTE DE MTT (5 MG/ML)

- 66 mg de reagente de MTT
- 12 mL de PBS estéril

Preparo:

Diluir 10x para uso.

2,3-DIAMINONAPHTHALENE (DAN)

- 0,05 mg
- 1 mL de ácido clorídrico 0,62M

H₂DCFDA

- 0,0487 g de H₂DCFDA
- 5 mL de DMSO