

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA

Michele Maria Xavier Silveira

**ESTUDO DE UM DERIVADO DE AMINOQUINOLINA: CITOTOXICIDADE EM
MACRÓFAGOS, POTENCIAL EFEITO EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E
MITOCÔNDRIA**

JUIZ DE FORA

2016

Michele Maria Xavier Silveira

**ESTUDO DE UM DERIVADO DE AMINOQUINOLINA: CITOTOXICIDADE EM
MACRÓFAGOS, POTENCIAL EFEITO EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E
MITOCÔNDRIA**

Monografia apresentada ao
Departamento de Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito para conclusão do
curso de Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Elaine Soares Coimbra

JUIZ DE FORA

2016

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

Silveira, Michele Maria Xavier.

Estudo de um derivado de aminoquinolina: citotoxicidade em macrófagos, potencial efeito em *Leishmania amazonensis* e mitocôndria / Michele Maria Xavier Silveira. -- 2016.

39 f. : il.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, 2016.

1. Leishmania. 2. Quimioterapia. 3. Aminoquinolina. I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. Título.

MICHELE MARIA XAVIER SILVEIRA

**ESTUDO DE UM DERIVADO DE AMINOQUINOLINA: CITOTOXICIDADE EM
MACRÓFAGOS, POTENCIAL EFEITO EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS* E
MITOCÔNDRIA**

Monografia apresentada ao
Departamento de Farmácia da
Universidade Federal de Juiz de Fora,
como requisito para conclusão do
curso de Farmácia.

Juiz de Fora, 22 de Julho de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof^a Dr^a Elaine Soares Coimbra

Examinador 1: Gabriane Nascimento Porcino

Examinador 2: Patrícia de Almeida Machado

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Senhor nosso Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse, pela oportunidade e pelo privilégio de realizar, não somente nestes anos como universitária, mas em todos os momentos. Ele é o maior Mestre que alguém pode conhecer.

Aos meus pais Silvania e Valter, não sei como agradecer vocês por tudo que fazem por mim, obrigada pelas palavras de encorajamento nos momentos de desânimo e cansaço, obrigada por abrir mão dos próprios sonhos em favor dos meus. Mãe, suas orações que me mantêm de pé, seu carinho e dedicação me deram impulso para não desistir. Pai, sua presença significa segurança e esperança para vencer a cada dia. Vocês são a palavra chave da minha existência como pessoa. Amo vocês.

Ao meu noivo, que de forma especial e carinhosa me ajudou com palavras de incentivo, orações, e compreensão. Esta conquista é nossa.

Aos meus familiares, que oraram por mim e acreditaram neste sonho e que de alguma forma doaram um pouco de si nesta realização.

Aos meus amigos de turma, pelas conversas, conselhos e risadas, tudo isso é incentivo para o alcance dos objetivos.

À minha orientadora Elaine, que dedicou seu tempo me ensinando e fazendo com que se tornasse possível a conclusão desta monografia.

À Luciana, pela bondade e paciência ao ajudar-me nas correções e no desenvolver deste trabalho.

À toda equipe do laboratório de parasitologia, pelo aprendizado.

À FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro. E a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, obrigada.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infectoparasitárias causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*. Estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo com cerca de 20.000 a 30.000 mortes anualmente. O tratamento de primeira linha no Brasil se faz por meio do antimoniato N-metilglucamina (Glucantime®), outras drogas utilizadas como segunda escolha são a anfotericina B e a pentamidina. Todas estas drogas apresentam uma série de problemas, dentre eles a toxicidade, efeitos adversos consideráveis e custo elevado. Diversos estudos demonstram que derivados de quinolina possuem resultados promissores em *Leishmania*. No passado, os compostos derivados de quinolina foram extensivamente estudados visando o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de um derivado de aminoquinolina, aqui denominado AMQ 010, em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como a citotoxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos. Além disto, estudar o possível mecanismo de ação do composto, com enfoque na mitocôndria do parasito. O composto avaliado AMQ 010 apresentou expressiva atividade leishmanicida com CI_{50} de 43,25 μ M e 5,48 μ M para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente, com baixa toxicidade para a célula hospedeira e elevada seletividade pelo o parasito. Observou-se que o tratamento de promastigotas com o composto AMQ 010 a 86,0 μ M levou a um aumento na produção de espécies reativas do oxigênio (61,67%) e redução no potencial da membrana mitocondrial (34,5%), quando comparados com o controle negativo. Esses dados sugerem que a mitocôndria do parasito pode ser um alvo para este composto. Os resultados obtidos neste estudo mostram a potente atividade leishmanicida do derivado de quinolina, com perspectivas para a síntese racional de novas drogas contra *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania*. Quimioterapia. Aminoquinolina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious and parasitic disease caused by flagellate protozoa of the genus *Leishmania*. It is estimated that 12 million people are infected worldwide, with a death rate of approximately 25,000 deaths per year. The first-line treatment in Brazil is made through the N-methylglucamine antimoniate (Glucantime®), and other drugs used as second choice are amphotericin B and pentamidine. All these drugs have a variety of problems which includes toxicity, significant side effects and a high cost. Several studies show that quinoline derivatives have promising results against *Leishmania*. In the past, compounds derived from quinoline have been studied extensively in order to develop new therapeutic agents. Thus, the objective of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of an aminoquinoline derivative, here denominated AMQ 010, against promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* and the cytotoxicity on murine peritoneal macrophages. Furthermore, the mechanism of action of the compound AMQ 010, focusing on the mitochondria of the parasite, was also studied. The compound AMQ 010 showed significant leishmanicidal activity with IC_{50} of 43,25 μ M and 5,48 μ M for promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* respectively, with low toxicity to the host cell and high selectivity for the parasite. Promastigotes treated with the compound AMQ 010 at 86,0 μ M induced an increase of ROS production (61,67%) and reduction of the mitochondrial membrane potential (34,5%), as compared to the negative control. The data suggest the parasite mitochondria can be a target of this compound. The results obtained in this study showed the potential antileishmanial activity of the quinoline derivatives, with perspectives to the rational design of new drugs against *Leishmania*.

Keywords: *Leishmania*. Chemotherapy. Aminoquinoline.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	19
2.1 GERAL	19
2.2 ESPECÍFICOS	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 COMPOSTO UTILIZADO	20
3.2 CULTIVO DE <i>LEISHMANIA AMAZONENSIS</i>	20
3.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA	20
3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/c	21
3.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA	21
3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADOS COM AMQ 010.....	22
3.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADOS COM O COMPOSTO AMQ 010	23
3.8 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE E DO ÍNDICE DE ESPECIFICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010	24
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	24
4 RESULTADOS	26
4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	26
4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c.....	27
4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	28

4.4 SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010	30
4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$ M) EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADOS COM AMQ 010	31
4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROs) EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADOS COM AMQ 010	32
5 DISCUSSÃO	34
6 CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. (A) Promastigotas e (B) Amastigotas dentro de macrófagos peritoneais de camundongos.....	14
Figura 2 Forma promastigota ilustrando a mitocôndria	15
Figura 3 Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp	16
Figura 4 Porcentagem de inibição dos promastigotas em diferentes concentrações do composto AMQ 010.....	26
Figura 5 Porcentagem de macrófagos viáveis em diferentes concentrações do composto AMQ 010.....	28
Figura 6 Porcentagem de inibição do número de amastigotas em diferentes concentrações do composto AMQ 010	29
Figura 7 Alteração no potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto AMQ 010	32
Figura 8 Produção de EROs em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto AMQ 010.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Atividade do composto AMQ 010 em promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	27
Tabela 2 Citotoxicidade do composto AMQ 010 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	28
Tabela 3 Atividade do composto AMQ 010 em amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	30
Tabela 4 Índice de Seletividade e Especificidade do composto AMQ 010 para as formas evolutivas de <i>L. amazonensis</i>	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMQ	Aminoquinolina
ATP	Adenosina Trifosfato
BOD	“Biochemical Oxygen Demand”, Demanda Bioquímica de Oxigênio
CBR	Centro de Biologia de Reprodução
CC ₅₀	Concentração do composto que reduziu 50% da viabilidade dos macrófagos
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CI ₅₀	Concentração do composto que inibiu 50% do crescimento parasitário
DCF	2',7' Diclorofluoresceína
DMSO	Dimetilsulfóxido
GFP	“Green Fluorescent Protein”, Proteína Fluorescente Verde
H ₂ DCFDA	Diacetato de 2',7' - diclorodihidrofluoresceína
IE	Índice de Especificidade
IS	Índice de Seletividade
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6' -tetracloro1,1',3,3' -tetraetilbenzimidazolcarbocianina
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico
NUPEQ	Núcleo de Pesquisas Químicas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	“Phosphate Buffer Saline”, Salina Tampão Fosfato
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
RPMI	“Roswell Park Memorial Institute”, Instituto Parque Memorial Roswell
SBF	Soro Bovino Fetal
WHO	“World Health Organization”, Organização Mundial de Saúde
$\Delta\psi_m$	Potencial de Membrana Mitocondrial

1 INTRODUÇÃO

As infecções causadas por *Leishmania* representam um problema de saúde de importância global, sendo a segunda maior causa de morte por doenças parasitárias no mundo (PINO, 2010). Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente. A Organização Mundial da Saúde (OMS) calcula que 310 milhões de pessoas estejam expostas ao risco de infecção (WHO, 2016).

As leishmanioses afetam principalmente indivíduos com menor nível socioeconômico, e está associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e deficiência no sistema imune. A incidência da doença também está diretamente relacionada a inúmeros fatores, tais como, o crescimento urbano desordenado, desequilíbrio ambiental devido as mudanças climáticas e intervenções sistemáticas do homem, como construção de barragens, migração de pessoas para áreas endêmicas e crescente urbanização, controle inadequado de vetores, ausência de vacina efetiva (WHO, 2016).

Embora tenha ocorrido uma diminuição da incidência das leishmanioses no Brasil devido à melhor condição socioeconômica e o aumento da vigilância epidemiológica nos últimos 15 anos, proporcionando uma diminuição do número de pessoas expostas aos vetores, a doença ainda persiste no país com um elevado número de casos, ressaltando que entre 2010 e 2012, foram registrados no Brasil 68.855 ocorrências de leishmaniose tegumentar (TELES, et al, 2015).

O gênero *Leishmania* inclui protozoários flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, cuja característica principal é a presença da organela cinetoplasto, localizada no interior da mitocôndria que é única e possui regiões ricas em DNA (TOMÁS; CASTRO, 2013). Este gênero agrupa diferentes espécies de protozoários flagelados, unicelulares, digenéticos e encontrados sob duas formas evolutivas: as formas promastigotas (Figura 1a), que possuem flagelo livre emergindo a partir da bolsa flagelar, núcleo central e cinetoplasto na porção anterior e possui como característica a motilidade; e as formas amastigotas (Figura 1b), que são intracelulares obrigatórios, com corpo celular pequeno, esférico e sem motilidade, não possui flagelo evidente sob microscopia ótica, o qual encontra-se internalizado e mantido na bolsa flagelar. Essas formas são encontradas no interior de vacúolos das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente em

macrófagos do hospedeiro mamífero. Em ambas as formas há presença de uma mitocôndria que se estende ao longo do corpo celular (SILVA, 2008).

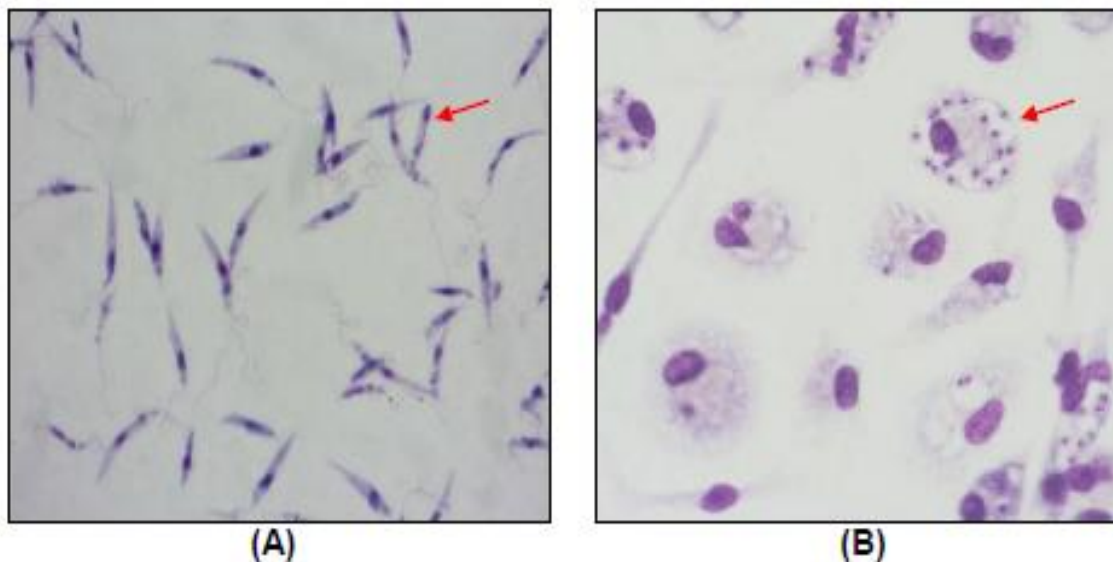


Figura 1: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. (A) Promastigotas e (B) Amastigotas dentro de macrófagos peritoneais de camundongos.

Fonte: ANTINARELLI, 2013.

Parasitos do gênero *Leishmania*, assim como os demais tripanossomatídeos, apresentam uma organização básica, comum às outras células eucarióticas superiores, com presença de membrana plasmática, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Contudo, apresenta diversas organelas e estruturas altamente especializadas que são peculiares ao tripanossomatídeos. Neste sentido, vale ressaltar que a mitocôndria de tripanossomatídeos vem sendo estudada como potencial alvo para fármacos, visto que, diferentes dos demais eucariotas se apresenta como organela única no parasito (MESQUITA, 2013). A mitocôndria está presente nas formas promastigotas e amastigotas, possui uma membrana mitocondrial externa, a qual constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citosol e assim como nos demais eucariotas, é geradora de energia química para a célula, onde oxidam carboidratos para produzir energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP) (MESQUITA, 2013).

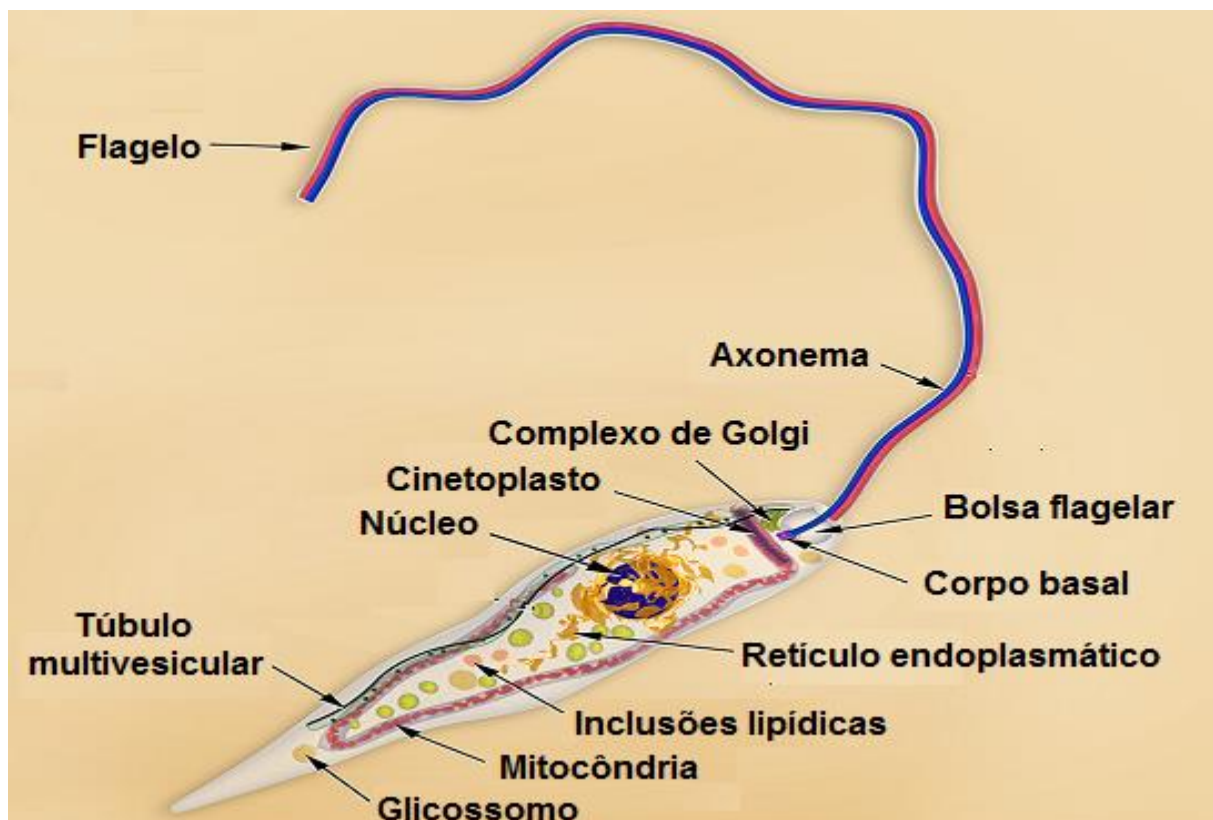


Figura 2: Forma promastigota ilustrando a mitocôndria.

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, et al, 2013.

O ciclo biológico do parasito tem início quando a fêmea infectada do inseto vetor, genericamente denominado de flebotomíneo, ao realizar o repasto sanguíneo suga o sangue do hospedeiro vertebrado não-infectado, transferindo promastigotas de *Leishmania* sp para a pele. Posteriormente, no hospedeiro vertebrado os promastigotas se transformam em amastigotas, quando são fagocitados pelos macrófagos. O rompimento da célula hospedeira ocorre após multiplicação intensa das formas amastigotas, liberando assim os parasitos, os quais irão infectar outras células do hospedeiro vertebrado. Dando continuidade ao ciclo do parasito, um flebotomo não infectado durante o repasto sanguíneo, no hospedeiro infectado, faz ingestão de macrófagos infectados com amastigotas e no intestino do inseto vetor estas formas irão se diferenciar em promastigotas, que irão se multiplicar por divisão binária e posteriormente migrar para a parte anterior do tubo digestivo. A fêmea do inseto vetor ao realizar um novo repasto sanguíneo transmite a infecção para o hospedeiro mamífero não-infectado e o ciclo é reiniciado (ANTINARELLI, 2013).

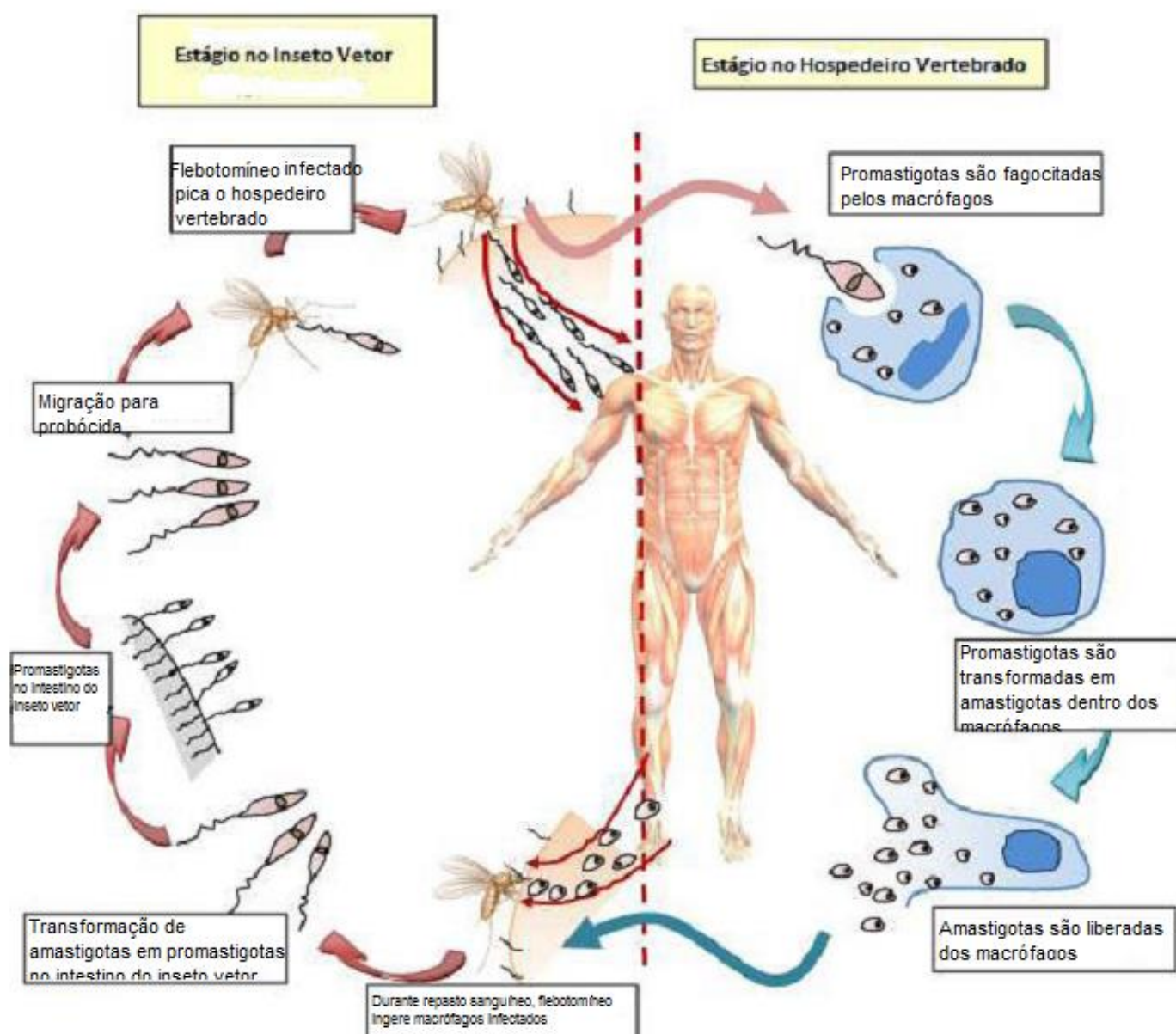


Figura 3: Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Fonte: Adaptado de ROY, et al, 2012.

As leishmanioses compreendem uma série de patologias marcadas pelo amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde infecções assintomáticas até manifestações mais graves, como a forma visceral. Podem ser divididas em leishmaniose cutânea, mucocutânea, difusa e visceral (PINHEIRO, 2013). A leishmaniose visceral é caracterizada pela infecção crônica de órgãos viscerais como fígado, baço e medula óssea, pode causar febre irregular de longa duração, perda de peso, hepatoesplenomegalia, chegando a ser fatal se não for tratada. Em relação às manifestações tegumentares, a forma cutânea de maior prevalência, é

caracterizada pela presença de úlceras na pele em geral indolores, bem delimitadas, apresentando bordas elevadas, a forma mucocutânea na qual os parasitos são disseminados pelo sistema linfático ou hematogênico e parasitam a mucosa nasal e orofaríngea, é caracterizada por lesões ulceradas e infiltradas na mucosa da boca, nariz e faringe e a forma cutânea-difusa produz lesões crônicas e disseminadas, e estas lesões múltiplas contêm alto número de parasitos (PINHEIRO, 2013; WHO, 2016).

Neste trabalho, a espécie *L. amazonensis* foi utilizada como modelo para avaliar o efeito do derivado de aminoquinolina. No Brasil, a *L. amazonensis* está relacionada com as manifestações cutâneas localizada ou com a forma difusa (RIBEIRO, 2014).

Os derivados antimoniais pentavalentes, disponibilizado atualmente pelo Ministério da Saúde na formulação do antimoniato N-metilglucamina (Glucantime®), começaram a ser utilizados como tratamento de primeira escolha para leishmanioses no Brasil em 1912 (PINHEIRO, 2013). O esquema terapêutico não é simples, necessita de administração parenteral por um período prolongado e monitorização terapêutica em função da elevada toxicidade do fármaco (ANTINARELLI, et al, 2015).

Fármacos como anfotericina B e pentamidina são utilizados como segunda escolha (ANTINARELLI, 2013). Contudo, nenhum tem demonstrado uma estratégia de fato efetiva na erradicação da doença, devido a uma série de limitações que incluem: alto custo, elevada toxicidade, administração parenteral por período prolongado, indução de efeitos adversos que resultam em baixa adesão ou abandono do tratamento pelos pacientes e, conseqüentemente, comprometem a eficácia do tratamento (MESQUITA, 2013; SILVA, et al, 2015). Até o momento, o único fármaco oral já aprovado é a miltefosina, entretanto, seu uso continua restrito ao tratamento da leishmaniose visceral devido ao seu baixo efeito para o tratamento da leishmaniose cutânea. Além disso, tem apresentado efeitos adversos digestivos e risco de teratogenicidade (ANTINARELLI, 2013; NAGLE, et al, 2014).

Deste modo, é de extrema relevância estudos de novos compostos para a quimioterapia das leishmanioses. Um grande número de compostos sintéticos vem sendo testados em ensaios de atividade leishmanicida (SANTOS, et al, 2008), dentre eles os derivados de quinolinas.

Alguns estudos demonstram que derivados de quinolina possuem resultados promissores em *Leishmania* (NAKAYAMA, et al, 2005; NANAYAKKARA, et al, 2008). O exemplo mais bem sucedido é a sitamaquina, um derivado de 8-aminoquinolina, que está em estudo de fase clínica para o tratamento oral da leishmaniose visceral na Índia (JHA, et al, 2005). A atividade *in vitro* destes derivados também tem sido sistematicamente avaliada em nosso laboratório (ANTINARELLI, et al, 2015; CARMO, et al, 2011; COIMBRA, et al, 2011).

Neste contexto, foi proposto a avaliação da atividade *in vitro* de um derivado sintético de quinolina em *L. amazonensis* e em macrófagos bem como o possível mecanismo de ação deste composto. Inicialmente, o alvo escolhido para o estudo foi a mitocôndria, visto que a mesma desempenha um papel importante em tripanosomatídeos e é a principal reguladora dos mecanismos de morte de *Leishmania* (FIDALGO; GILLE, 2011).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a citotoxicidade de um derivado de aminoquinolina em macrófagos peritoneais de camundongos, bem como o efeito leishmanicida em *L. amazonensis* e seu mecanismo de ação com enfoque na mitocôndria do parasito.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade de AMQ 010, em diferentes concentrações, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Avaliar a atividade antipromastigota de um derivado aminoquinolina, aqui denominado AMQ 010, em diferentes concentrações em *L. amazonensis*;
- Avaliar a atividade anti-mastigota de AMQ 010, em diferentes concentrações, em *L. amazonensis* transfectada com GFP;
- Avaliar se o efeito leishmanicida do composto AMQ 010 está relacionado à alterações mitocondriais, através da análise do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e da produção de espécies reativas do oxigênio (EROs).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMPOSTO UTILIZADO

O composto AMQ 010 foi sintetizado no Núcleo de Pesquisas Químicas (NUPEQ) pelo grupo do Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. Visto que os resultados deste composto ainda não foram divulgados em forma de artigos, o mesmo será identificado na forma de código (AMQ 010) e sua estrutura não será divulgada neste trabalho.

3.2 CULTIVO DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) e *L. amazonensis* (WHOM/Br/75/Josefa) transfectada com o gene da proteína verde fluorescente (GFP), foram cultivadas em meio Warren, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantida em estufa BOD a 25 °C através de repiques realizados em intervalo de quatro dias, sendo coletada em fase logarítmica de crescimento.

3.3 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

A partir da fase logarítmica de crescimento foram obtidas formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) na concentração de 6×10^6 células/mL, em meio Warren suplementado com 10% de SBF. O composto AMQ 010 foi adicionado em concentrações variadas de 3,12 a 100 μ M após diluição em dimetilsulfóxido (DMSO) e os testes foram realizados em placas de 96 poços. Foi utilizado o método do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico (MTT), os testes foram realizados em duplicatas, em três experimentos independentes, e poços sem adição do composto foram utilizados como controle negativo. Após 72 horas de incubação a 25 °C, adicionou-se 10 μ L da solução MTT à 5 mg/mL para verificar a viabilidade da célula, este é um método quantitativo colorimétrico, que após incubação de quatro horas, verifica-se a mudança da coloração de amarelo para roxo, se houver parasitos viáveis. A reação foi interrompida pela adição 100 μ L de solução de isopropanol ácido e realizou-se a leitura em um espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. Os resultados

foram expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B.

3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO BALB/c

Os macrófagos peritoneais foram obtidos por meio do lavado peritoneal de camundongos BALB/c estimulados com 2 mL de tioglicolato 3%. Os macrófagos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF, seguido de contagem na câmara de Neubauer. Em placas de 96 poços foram adicionados estes macrófagos, após 24 horas cada poço foi lavado com PBS estéril e foi adicionado o meio RPMI-1640 contendo 10% SBF juntamente com o composto AMQ 010 nas concentrações de 9,37 a 150 μ M. Após 72 horas de incubação em estufa com 5% de CO₂ a 33 °C, a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método MTT e a leitura foi realizada em um espectrofotômetro de microplacas a 570 nm. Os testes foram realizados em duplicatas, em três experimentos independentes, com determinados poços sendo o controle negativo, sem adição do composto. Como controle positivo foi utilizado anfotericina B. Os resultados foram expressos pela concentração citotóxica do composto que inibe 50% da viabilidade de macrófagos (CC₅₀).

3.5 ENSAIO DA ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA

O ensaio anti-amastigota foi realizado em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* GFP (WHOM/BR/75/Josefa) transfectada. Os macrófagos foram obtidos 72 horas após estímulo intraperitoneal com tioglicolato 3% estéril, por meio da realização do lavado peritoneal dos camundongos e posterior centrifugação das células a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com meio RPMI-1640, sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Em cada poço da placa de 24 poços, adicionou-se 300 μ L de uma cultura ajustada na concentração de $2,0 \times 10^6$ macrófagos peritoneais/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e a placa permaneceu por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 33 °C para os macrófagos aderirem. Após esse período, as células foram lavadas com PBS estéril e foram

adicionados 300 μL , em cada poço, de uma suspensão de 20×10^6 formas promastigotas em fase estacionária/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SBF, para interagir por 3 horas com as células hospedeiras, na razão de 10 parasitos para cada macrófago, em estufa com 5% de CO_2 a 33 °C. Em seguida, cada poço foi lavado quatro vezes com PBS estéril para retirada dos promastigotas que não foram fagocitados e o composto AMQ 010 foi adicionado em diferentes concentrações (1,56 a 100 μM). Após 72 horas em estufa de CO_2 a 33 °C, retirou-se o meio RPMI-1640 e adicionou-se 100 μL de água deionizada, em cada poço, para lisar os macrófagos e liberar os amastigotas intracelulares. Na sequência, transferiu-se os 100 μL da suspensão de células para uma placa de 96 poços e repetiu-se o procedimento, totalizando 200 μL da suspensão de células na placa de 96 poços. Macrófagos não infectados foram utilizados como branco. A leitura foi realizada no fluorímetro FLx 800 (Bio Tek Instruments, Inc) utilizando os pares de filtros de 485 nm de excitação e 528 nm de emissão (ANTINARELLI, et al, 2015). Cada concentração foi testada em duplicata. Como controle negativo utilizou-se macrófagos infectados sem adição do composto, e como controle positivo utilizou-se miltefosina.

3.6 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADOS COM AMQ 010

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi\text{m}$), foi utilizado o iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina (JC-1). Este é um produto catiônico, lipofílico e permeável à membrana plasmática das células. Em células com elevado $\Delta\psi\text{m}$, o corante se agrega na matriz mitocondrial (JC-agregados) e apresenta fluorescência vermelha. Entretanto, em células com baixo $\Delta\psi\text{m}$, o corante não se acumula na mitocôndria e permanece no citoplasma na forma monomérica (JC-monômeros), emitindo fluorescência na cor verde (MORAES, 2014). A razão entre a fluorescência vermelha/verde determina o $\Delta\psi\text{m}$. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas na concentração final de $10 \times 10^6/\text{mL}$ com o composto AMQ 010 nas concentrações de 43,0 e 86,0 μM , em estufa a 25 °C por 24 horas. Após este tempo de incubação, a suspensão de *Leishmania* foi centrifugada a 2500 rpm por 15 minutos e foi lavada com PBS, ressuspendeu-se em solução Hank's e a contagem de *Leishmania* foi realizada na câmara de Neubauer. A concentração de *Leishmania* foi ajustada para $5 \times 10^6/\text{mL}$ em

microtubos. Em seguida adicionou 10 μ L do corante JC-1 na concentração final de 10 μ g/mL e incubou-se em estufa a 37 °C por 30 minutos no escuro, pois o corante é fotossensível. Após este tempo de incubação, as células foram centrifugadas três vezes para retirar o excesso do corante que não reagiu, o sobrenadante foi aspirado e as células ressuspendidas em 1000 μ L de solução de Hank's. Adicionou 200 μ L da suspensão de *Leishmania* em cada poço de uma placa negra de 96 poços. A leitura foi realizada em um fluorímetro da marca Bio Tek utilizando os seguintes pares de filtros: 540/600 nm (fluorescência vermelha) e 485/528 nm (fluorescência verde). O $\Delta\psi_m$ foi calculado pela razão entre a fluorescência vermelha/verde para cada tratamento e para o controle sem tratamento. Como controle positivo, promastigotas foram tratadas com FCCP (20 μ M).

3.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADOS COM O COMPOSTO AMQ 010

A produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) foi determinada utilizando-se o corante não fluorescente 2',7'- diacetato dediclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), que após a clivagem por esterases intracelulares e oxidação, ocorre a conversão do corante no composto de alta fluorescência 2',7' diclorofluoresceína (DCF) (CARVALHO, et al, 2011; MESQUITA, 2013).

Promastigotas de *L. amazonensis* na concentração final de 10x10⁶/mL foram cultivadas em estufa BOD a 25 °C por 24 horas e incubadas com AMQ 010 nas concentrações de 43,0 e 86,0 μ M. Após este tempo, os parasitos foram centrifugados a 2500 rpm por 15 minutos, ressuspendeu-se o sedimento em 1mL de PBS e realizou-se a contagem em câmara de Neubauer. Adicionou 200 μ L da suspensão de promastigota diluída em PBS, em placa negra, na concentração final de 20x10⁶ células. Em seguida, adicionou-se 10 μ L do corante H₂DCFDA na concentração final de 20 μ M e incubou-se em estufa a 37 °C por 30 minutos no escuro, pois o corante é fotossensível (ANTINARELLI, et al, 2015). Como controle positivo, utilizou-se miltefosina na concentração do CI₅₀. A leitura foi realizada em um fluorímetro da marca Bio Tek utilizando os comprimentos de onda (emissão de 528 nm e excitação de 485 nm).

3.8 CÁLCULO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE E DO ÍNDICE DE ESPECIFICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010

O índice de seletividade (IS) é a relação entre citotoxicidade do composto para células de mamíferos e sua atividade leishmanicida. Foi calculado a partir da razão entre a citotoxicidade para macrófagos (CC_{50}) e a atividade contra amastigotas (CI_{50}). Valores de $IS > 20,0$ indicam que o composto foi mais tóxico para o parasito em relação à célula hospedeira. Valores de $IS < 20,0$ demonstram toxicidade do composto para macrófagos (DON; IOSET, 2014).

O índice de especificidade (IE) é definido como a especificidade do composto para as formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* sp. Este índice é calculado pela razão entre o CI_{50} em promastigotas e o CI_{50} em amastigotas. Valores de $IE > 2,0$ indicam que o composto foi mais ativo para amastigotas. Valores de $IE < 0,4$ sugerem que o composto foi mais efetivo em promastigotas. Composto com valor de IE entre 0,4 e 2,0 é considerado ativo para ambos os estágios (DON; IOSET, 2014).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de CI_{50} obtidos nos ensaios de antipromastigota e anti-amastigota e de citotoxicidade em macrófagos peritoneais (CC_{50}) foram determinados por extrapolação gráfica da curva dose-resposta, por análise pelo programa estatístico Grafit versão 5.0, considerando a média de três experimentos independentes, realizados em duplicata. Os gráficos e a análise estatística dos resultados foram realizados no programa GraphPad Prism 5.0 (Graph Prism Inc., San Diego, CA).

3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c provenientes do Centro de Biologia de Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), foram mantidos no Laboratório de Parasitologia/UFJF dentro de estante ventilada. Os animais foram utilizados nos experimentos com idade aproximada entre 6-8 semanas e peso médio entre 18-22 g. Todos os procedimentos foram previamente

aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFJF (Protocolos Nº #054/2013, #056/2013, (#0XX/2013-CEEA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

O efeito leishmanicida, *in vitro*, do composto AMQ 010 foi avaliado inicialmente em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Como pode ser observado na Figura 4, em relação a atividade antipromastigota, houve um efeito concentração-dependente do composto AMQ 010, de forma que nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μM houve inibição do crescimento do parasito em torno de 81,53%; 58,69%; 30,42%; 14,46% e 6,47%, respectivamente.

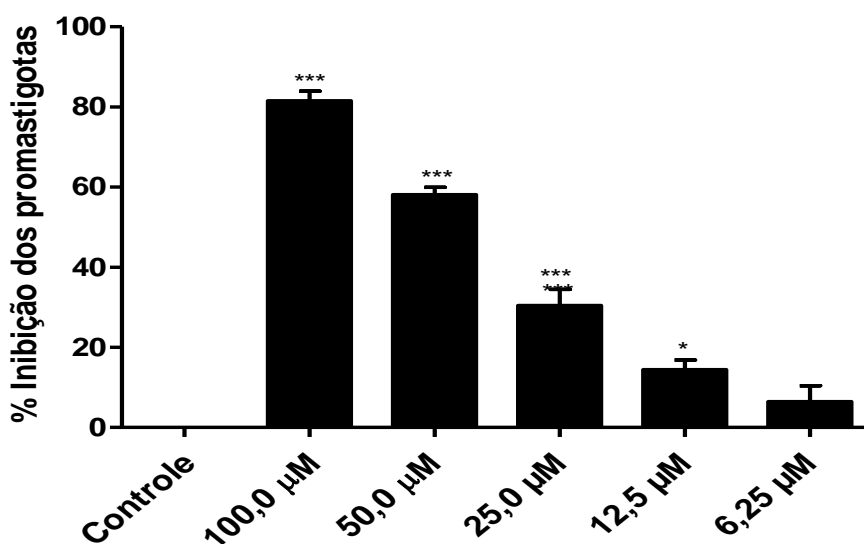


Figura 4: Porcentagem de inibição dos promastigotas em diferentes concentrações do composto AMQ 010.

O composto AMQ 010 apresentou um CI_{50} de 43,25 μM e anfotericina B, fármaco de referência, exibiu valor de CI_{50} de 0,1 μM para *L. amazonensis* (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade do composto AMQ 010 em promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Composto	Promastigota <i>L. amazonensis</i> *Cl ₅₀ (µM)
AMQ 010	43,25 (±2,68)
Anfotericina B	0,10 ± 0,02

*Cl₅₀ (µM) – Concentração do composto que inibe 50% do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

4.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/c

No intuito de avaliar o efeito citotóxico do composto para macrófagos, consideradas como as principais células hospedeiras de *Leishmania*, realizou-se o ensaio de viabilidade dos macrófagos, pelo método do MTT. Como pode ser visto na Figura 5 e Tabela 2, o composto AMQ 010 exibiu baixo efeito tóxico nos macrófagos. A Figura 5 exhibe as porcentagens de macrófagos viáveis, pode-se observar que nas concentrações testadas de 150,0; 75,0; 37,5; 18,75 e 9,37 µM o composto não demonstrou ser citotóxico apresentando porcentagem de células vivas em torno de 79,49%; 84,45%; 74,20%; 86,40% e 78,50%, respectivamente. A Tabela 2 mostra que o composto apresentou CC₅₀ > 150,0 µM.

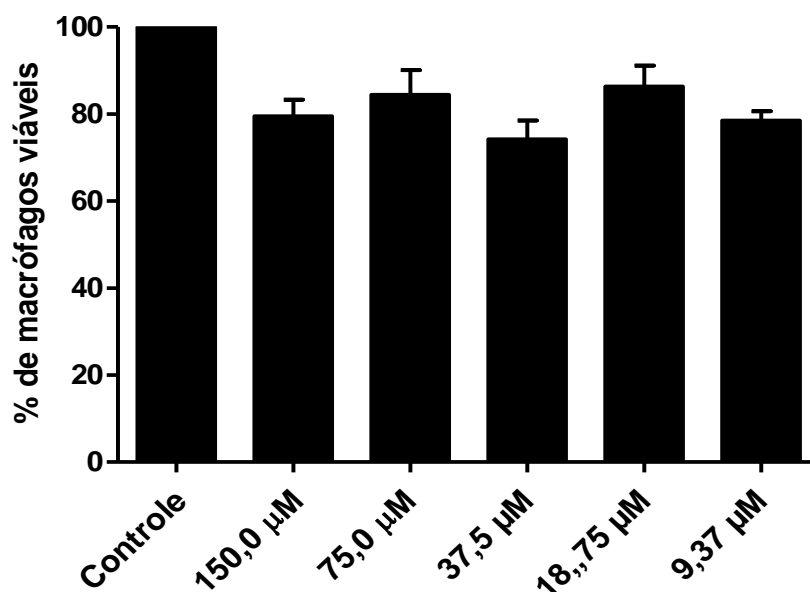


Figura 5: Porcentagem de macrófagos viáveis em diferentes concentrações do composto AMQ 010.

Tabela 2: Citotoxicidade do composto AMQ 010 em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Composto	Macrófagos Peritoneais *CC ₅₀ (µM)
AMQ 010	>150
Anfotericina B	>150

*CC₅₀ (µM) – Concentração Citotóxica do composto que inibe 50% da viabilidade das células de mamíferos.

4.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPOSTO AMQ 010 EM FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *L. AMAZONENSIS*

Visto a baixa toxidez do composto AMQ 010 e efetiva atividade em promastigotas de *L. amazonensis*, deu-se continuidade ao estudo em formas amastigotas intracelulares, no intuito de se determinar o potencial leishmanicida deste composto no estágio clinicamente relevante do parasito. Padronizou as concentrações a serem testadas em 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µM e

conforme mostra a Figura 6, macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com as concentrações citadas acima, por 72 horas, apresentaram uma redução expressiva no número de parasitos intracelulares de 86,42%; 79,63%; 87,28%; 84,25%; 55,27%; 23,69% e 10,95%, respectivamente.

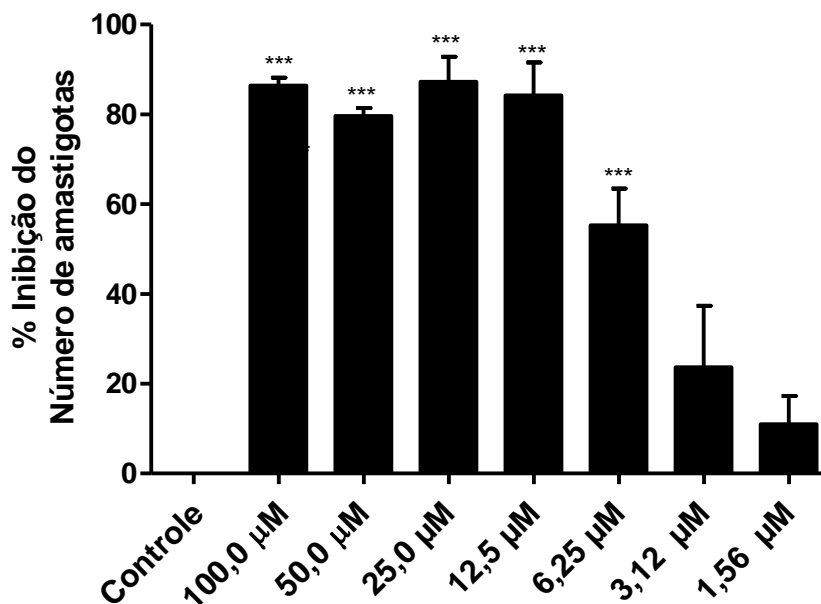


Figura 6: Porcentagem de inibição do número de amastigotas em diferentes concentrações do composto AMQ 010.

Na Tabela 3, verifica-se também que o composto AMQ 010 apresentou CI_{50} de 5,48 μ M em amastigotas de *L. amazonensis*. O conjunto destes resultados apontam que o composto AMQ 010 tem efeito tóxico significativo sobre as formas amastigotas, sendo este o estágio evolutivo de importância clínica, por ser o responsável pelas manifestações clínicas da doença.

Tabela 3: Atividade do composto AMQ 010 em amastigotas de *Leishmania amazonensis*

Composto	Amastigota <i>L. amazonensis</i> *Cl ₅₀ (µM)
AMQ 010	5,48 (±0,31)
Miltefosina	4,05 (±1,79)

* Cl₅₀ (µM) – Concentração do composto que inibe 50% do crescimento das formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

4.4 SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE DO COMPOSTO AMQ 010

O índice de seletividade (IS) foi calculado com o objetivo de avaliar a seletividade do composto entre a célula hospedeira, como o macrófago e as formas amastigotas do parasito. Valores de IS > 20,0 indicam que o composto foi mais tóxico para as formas amastigotas, enquanto valores abaixo de 20,0 demonstram maior toxicidade do composto para macrófagos (DON; IOSET, 2014). O composto AMQ 010 apresentou IS > 27,37 o que sugere que o composto é seletivo para o parasito (Tabela 4).

O índice de especificidade (IE) foi calculado com o intuito de avaliar a especificidade do composto para as formas promastigotas e/ou amastigotas de *L. amazonensis*. O cálculo é a razão entre o Cl₅₀ em promastigotas e o Cl₅₀ em amastigotas de *L. amazonensis*. Valores de IE > 2,0 indicam que o composto foi mais ativo para amastigotas, valores de IE < 0,4 sugerem que o composto foi mais efetivo em promastigotas, e compostos com valores de IE entre 0,4 e 2,0 é considerado ativo para ambos os estágios (DON; IOSET, 2014). O composto AMQ 010 apresentou IE de 7,89 o que sugere que o composto foi mais específico para as formas amastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 4).

Tabela 4: Índice de Seletividade e Especificidade do composto AMQ 010 para as formas evolutivas de *L. amazonensis*

Composto	*IS <i>L. amazonensis</i>	*IE <i>L. amazonensis</i>
AMQ 010	> 27,37	7,89

*IS = Índice de Seletividade foi calculado pela razão entre CC_{50} para macrófagos e CI_{50} para amastigotas.

*IE = Índice de Especificidade foi calculado pela razão entre CI_{50} de promastigotas e CI_{50} para amastigotas.

4.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_m$) EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADOS COM AMQ 010

Na etapa final deste trabalho, realizou-se ensaios no intuito de se determinar se o possível mecanismo de ação do composto AMQ 010 em *L. amazonensis* estaria relacionado as alterações mitocondriais do parasito.

Promastigotas foram tratadas com 43,0 e 86,0 μM do composto por 24 horas (concentrações referentes a 1 e 2 vezes o valor do CI_{50} de 72 horas) e de acordo com a Figura 7, podemos verificar que na concentração de 86,0 μM ocorreu uma redução expressiva de 34,5% no $\Delta\Psi_m$, quando comparado com o controle negativo. Quando avaliado na concentração de 43,0 μM não foi observado uma redução significativa no $\Delta\Psi_m$, quando comparado com o controle negativo. Como controle positivo, promastigotas foram tratadas com FCCP (20 μM) os quais reduziram o $\Delta\Psi_m$ em 56,5%.

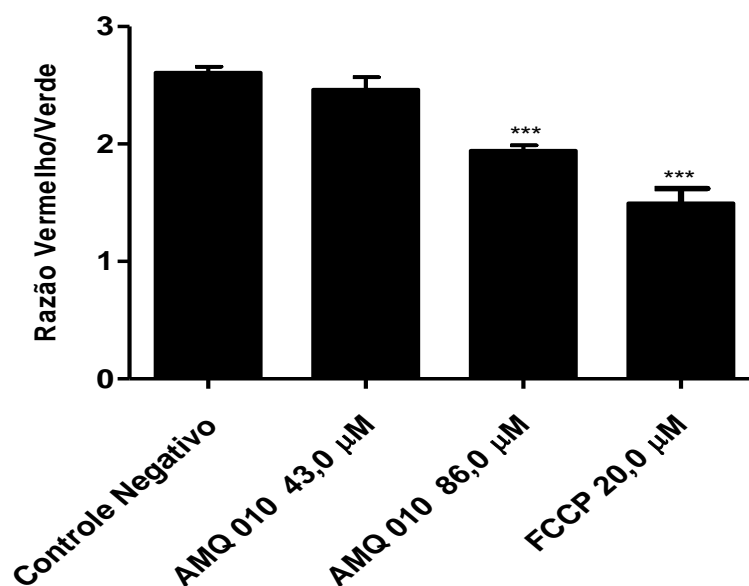


Figura 7: Alteração no potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto AMQ 010. Promastigotas foram tratadas com 43,0 e 86,0 µM do composto AMQ 010 e após 24 horas foram marcadas com JC-1. A intensidade de fluorescência foi determinada por fluorimetria. A razão (600/528 nm) foi calculada para promastigotas tratadas e não-tratadas. O controle negativo foi considerado como 100% e os resultados expressos como porcentagem em relação ao controle. $P < 0,001$ (***) diferença significativa comparada com o controle negativo. Os dados foram expressos como a média de pelo menos dois experimentos independentes.

4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROs) EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADAS COM AMQ 010

Após tratamento com o composto AMQ 010 nas concentrações de 43,0 e 86,0 µM, observou-se que somente na concentração de 86,0 µM houve um aumento de 61,67% na produção de EROs, quando comparado com o controle negativo (Figura 8). Como controle positivo, promastigotas foram tratadas com Miltefosina (22 µM) os quais houve um aumento de 67,55% na produção de EROs.

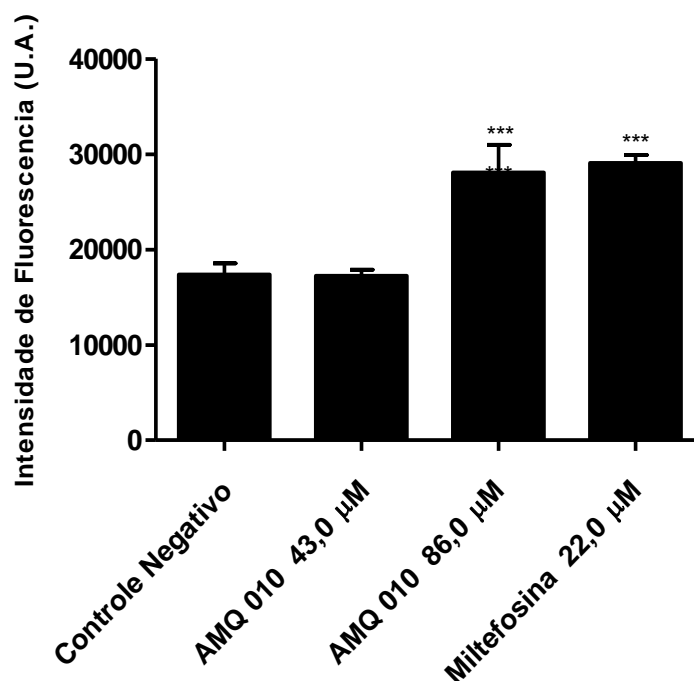


Figura 8: Produção de EROs em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto AMQ 010. Promastigotas foram tratadas com 43,0 e 86,0 µM do composto AMQ 010 por 24 horas e marcadas com o corante H₂DCFDA. A intensidade de fluorescência foi obtida em um fluorímetro de microplacas utilizando os comprimentos de onda de 485 e 528 nm de excitação e emissão, respectivamente. $P < 0,001$ (***) diferença significativa comparada com o controle negativo. Os dados foram expressos como a média de dois experimentos independentes.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que o composto AMQ 010 é efetivo em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, podendo estar associado a danos mitocondriais na forma extracelular do parasito. Além disso, tal composto mostrou baixa toxicidade para macrófagos.

5 DISCUSSÃO

É indiscutível a necessidade de novas alternativas para o tratamento das leishmanioses. A quimioterapia para estas doenças apresenta sérias limitações, as quais incluem o repertório restrito de fármacos disponíveis, toxicidade elevada, contra-indicações, cepas resistentes em alguns países e ainda a necessidade de administração parenteral em períodos prolongados (WHO, 2016).

Neste trabalho foi demonstrado o efeito leishmanicida de um derivado aminoquinolina, denominado AMQ 010. Inicialmente, pode ser ressaltado que este composto foi muito mais efetivo para as formas amastigotas (CI_{50} de 5,48 μ M) que para as formas promastigotas (CI_{50} de 43,25 μ M) de *L. amazonensis*, sem efeito tóxico significativo para os macrófagos (CC_{50} >150 μ M). Corroboram com estes dados o índice de especificidade de 7,89 (Tabela 4), demonstrando que o composto foi mais ativo nas formas amastigotas, bem como o índice de seletividade (IS), no qual o composto demonstrou ser mais tóxico para o parasito do que para as células hospedeiras. Sendo assim o composto demonstra ser seletivo ao parasito com baixa toxidez para os macrófagos. Para *Leishmania* sp, IS > 20 é considerado adequado para subseqüentes ensaios *in vivo* (DON; IOSET, 2014).

A mitocôndria da família dos tripanosomatídeos, que inclui o gênero *Leishmania*, é um interessante alvo para drogas, visto que apresenta-se como uma única unidade e desempenha funções essenciais na sobrevivência do parasito (MESQUITA, 2013). Esta organela está envolvida em diversos processos e vias metabólicas, incluindo formação de EROs, sendo que um aumento na quantidade destes radicais pode induzir alterações mitocondriais (ANTINARELLI, et al, 2015). Sendo assim, a mitocôndria se mostra um elemento fundamental nos processos de morte celular e estudos já comprovaram a associação entre o efeito leishmanicida de derivados de quinolinas, como exemplo a tafenoquina (CARVALHO, et al, 2010), à disfunção mitocondrial.

Outro fato que reforça o envolvimento da mitocôndria como alvo leishmanicida é observado na presença de alguns fármacos que atuam nas proteínas mitocondriais induzindo à morte celular. A pentamidina, fármaco utilizado como de segunda escolha no tratamento das leishmanioses, tem mostrado promover alterações na membrana mitocondrial, alterar o cinetoplasto e interferir na síntese do DNA (MORAES, 2014).

Neste sentido, o composto AMQ 010 foi selecionado para a realização do teste de mecanismo de ação, no qual a mitocôndria foi a organela a ser estudada. Estes estudos se concentraram na avaliação do efeito do composto sobre o $\Delta\psi_m$ e sobre a produção de EROs.

Neste trabalho foi usado o marcador JC-1, o qual é um marcador fluorescente que mensura o $\Delta\psi_m$ das células viáveis. De acordo com a Figura 7 houve redução no $\Delta\psi_m$, entretanto o mesmo somente foi observado na concentração de 86,0 μM , com redução expressiva de 34,5%, quando comparado com o controle negativo. O $\Delta\psi_m$ é um importante parâmetro da função mitocondrial usado não apenas como um indicador de viabilidade celular, mas também como indicador de apoptose (MORAES, 2014).

Além de desempenhar funções essenciais a sobrevivência do parasito, a mitocôndria é uma das principais organelas produtoras de EROs (MENNA-BARRETO; CASTRO, 2014). Semelhante ao ocorrido em relação ao potencial mitocondrial, somente na concentração de 86,0 μM houve um aumento de 61,67% na produção de EROs, quando comparado com o controle negativo (Figura 8).

É interessante ressaltar que em ambos os ensaios de estudo sobre o efeito do composto AMQ 010 na mitocôndria do parasito, somente na maior concentração estudada que foi de 86,0 μM (referente a 2 vezes o valor do CI_{50} de 72 horas) foi possível observar atuação do composto sobre esta organela. Na concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (CI_{50}) após 72 horas, ou seja, 43,0 μM não foi observado nem alteração do $\Delta\psi_m$ e nem aumento significativo da produção de EROs após o tratamento por 24 horas. Estes dados sugerem que, apesar do composto AMQ 010 ter efeito leishmanicida após 72 horas de tratamento, nos tempos iniciais há necessidade de concentrações maiores para que o composto afete a mitocôndria.

Convém ressaltar que o composto AMQ 010 pode também ter atuação em outros alvos da mitocôndria, bem como em outras organelas do parasito e, portanto, seu efeito leishmanicida pode estar associado a mecanismos de ação diversos. Estudos posteriores podem ajudar a elucidar melhor o mecanismo de ação deste composto em *Leishmania amazonensis*.

6 CONCLUSÕES

O composto AMQ 010 apresentou significativo efeito em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, demonstrou baixa toxicidade para macrófagos, apresentando seletividade pela forma intracelular de *L. amazonensis*, quando comparado à célula hospedeira. E foi específico para amastigotas de *L. amazonensis*, o estágio clinicamente relevante do parasito.

Estudos em promastigotas *L. amazonensis* demonstram que o efeito leishmanicida do composto pode estar associado a danos mitocondriais, com despolarização do $\Delta\psi_m$ e aumento na produção de EROs.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sugere o potencial leishmanicida do composto AMQ 010, confirmando o efeito de derivados aminoquinolinas em *Leishmania* sp e abre perspectivas para a síntese de novos compostos com possível atividade leishmanicida.

REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, D. G.; ESCALDA, P. M. F.; COSTA, A. S. V.; MONREAL, M. T. F. D. Leishmaniose Visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p. 194-197, 2010.
- ANTINARELLI, L. M. R. **Atividade leishmanicida de derivados de quinolinas: 4-aminoquinolinas complexadas a esteroide e amodiaquina**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2013.
- ANTINARELLI, L. M. R.; DIAS, R. M. P.; SOUZA, I. O.; LIMA, W. P.; GAMEIRO, J.; DA SILVA, A. D.; COIMBRA, E. S. 4-Aminoquinoline Derivatives as Potential Antileishmanial Agents. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 86, n. 4, p. 704-714, 2015.
- CARMO, A. M. L.; SILVA, F. M.; MACHADO, P. A.; FONTES, A. P.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q.; SILVA, A. D. Synthesis of 4-aminoquinoline analogues and their platinum (II) complexes as new antileishmanial and antitubercular agents. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 65, n. 3, p. 204-209, 2011.
- CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; MANZANO, J. I.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5344-5351, 2010.
- CARVALHO, L.; LUQUE-ORTEGA, J. R.; MARTÍN, C. L.; CASTANYS, S.; RIVAS, L.; GAMARRO, F. The 8-Aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in *Leishmania donovani* Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 09, p. 4204-4210, 2011.
- COIMBRA, E. S.; DA SILVA, A. D.; DIAS, R. M. P.; CORRALES, R. C. N. R.; BISPO, M. de L. F., KAISER, C. R.; DE SOUZA, M. V. N. Amodiaquine analogs. Synthesis and anti-leishmanial activity. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 1, n. 3, p. 106-113, 2011.
- DON, R.; IOSET, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140-146, 2014.
- FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.
- JHA, T. K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C. P.; FELTON, J. M.; SABIN, A. J.; HORTON, J. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral

leishmaniasis in India. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 6, p. 1005-1011, 2005.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CASTRO, S. L. The Double-Edged Sword in Pathogenic Trypanosomatids: The Pivotal Role of Mitochondria in Oxidative Stress and Bioenergetics. **BioMed Research International**, 2014.

MESQUITA, J. T. **Mecanismo de ação de fármacos sintéticos e associações terapêuticas em *Leishmania (L.) infantum***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2013.

MORAES, L. S. **Ação do alcaloide (+)-Filantidina sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira**. 2014. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular) – Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H. G.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for Leishmaniasis and human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305-11347, 2014.

NAKAYAMA, H.; LOISEAU, P. M.; BORRIES, C.; DE ORTIZ, S. T.; SCHININI, A.; SERNA, E.; DE ARIAS, A. R.; FAKHFAKH, M. A.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 4950-4956, 2005.

NANAYAKKARA, N. P. D.; AGER, A. L. Jr.; BARTLETT, M. S.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L.; KHAN, I. A.; Mc CHESNEY, J. D.; WALKER, L. A. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl) amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3, 4-dichlorophenoxy] quinoline succinate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p. 2130-2137, 2008.

PINHEIRO, R. O. Leishmaniose Tegumentar Americana: mecanismos imunológicos, tratamento e profilaxia. **Infarma**, v.16, nº 7-8, p. 79-82, 2013.

PINO D. D. **Tratamentos atuais para leishmaniose: terapias convencionais e alternativas**. 2010. Monografia - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RIBEIRO, J. B. P. **Avaliação *in vivo* da eficácia do tratamento com miltefosina sistêmico associado à terapia fotodinâmica com ftalocianina cloro-alumínio de formulação lipossomal (alclft) contra o parasita *Leishmania (L.) amazonensis***. 2014. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ROY, P.; DAS, S.; AUDDY, R.G.; MUKHERJEE, A. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. **Journal of Cell and Animal Biology**, v. 6, n.6, p. 73-87, 2012.

SANTOS, D. O.; COUTINHO, C. E.; MADEIRA, M. F.; BOTTINO, C. G.; VIEIRA, R. T.; NASCIMENTO, S. B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S. C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R. T.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v. 103, n. 1, p. 1-10, 2008.

SILVA, D. G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 2008.

SILVA, S. S.; MIRANDA, M. M.; COSTA, I. N.; WATANABE, M. A. E.; PAVANELLI, W. R.; FELIPE, I.; SFORCIN, J. M.; COSTA, I. C. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania amazonensis*. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 2, p. 25-34, 2015.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLOS Pathogens**, v.9, n.10, p.e1003594, 2013.

TELES, C. B. G.; MEDEIROS, J. F.; DOS SANTOS, A. P. de A.; DE FREITAS, L. A. R.; KATSURAGAWA, T. H.; CANTANHÊDE, L. M.; FERREIRA, R. de G. M.; CAMARG, L. M. A. Molecular characterization of american cutaneous leishmaniasis in the tri-border area of assis Brasil, Acre state, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.57, n.4, p. 343-347, 2015.

TOMÁS, A. M.; CASTRO, H. Redox Metabolism in Mitochondria of Trypanosomatids. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.19, n.7, p.696-707, 2013.

WHO 2016. Contém informações sobre leishmanioses. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. Acesso em 21/03/2016.