

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA**

**DAVID DE RIBAMAR ANTUNES DA SILVA**

**MECANISMOS DE AÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDAS DA  
ANFOTERICINA B E MILTEFOSINA**

**GOIÂNIA  
2024**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA

## **TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO NO REPOSITÓRIO INSTITUCIONAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio do Repositório Institucional (RI/UFG), regulamentado pela Resolução CEPEC no 1240/2014, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei no 9.610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo dos Trabalhos de Conclusão dos Cursos de Graduação disponibilizado no RI/UFG é de responsabilidade exclusiva dos autores. Ao encaminhar(em) o produto final, o(s) autor(a)(es)(as) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

### **1. Identificação do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação (TCCG)**

Nome completo do autor: David de Ribamar Antunes da Silva

Título do trabalho: Mecanismos de ação das atividades leishmanicidas da anfotericina B e miltefosina

### **2. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador) Concorda com a liberação total do documento [ x ] SIM [ ] NÃO<sup>1</sup>**

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(à)(s) autor(a)(es)(as) e ao(à) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo do TCCG. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

#### **Casos de embargo:**

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro.

**Obs.: Este termo deve ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por **David De Ribamar Antunes Da Silva**, **Discente**, em 08/02/2024, às 11:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 08/02/2024, às 12:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4332965** e o código CRC **901C0AA4**.

---

**DAVID DE RIBAMAR ANTUNES DA SILVA**

**MECANISMOS DE AÇÃO DAS ATIVIDADES LEISHMANICIDAS DA  
ANFOTERICINA B E MILTEFOSINA**

Monografia apresentada como requisito parcial  
de aprovação da disciplina de Trabalho de  
Conclusão de Curso de Física Médica do Ins-  
tituto de Física da Universidade federal de goiás.

Orientador: Antonio Alonso

GOIÂNIA

2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Silva, David de Ribamar Antunes da  
Mecanismos de ação das atividades leishmanicidas da anfotericina B e miltefosina [manuscrito] / David de Ribamar Antunes da Silva. - 2024.  
XLI, 41 f.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso.  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Física (IF), Física Médica, Goiânia, 2024.  
Bibliografia.  
Inclui lista de figuras.

1. miltefosina. 2. anfotericina B. 3. ressonância paramagnética eletrônica. I. Alonso, Antonio, orient. II. Título.

CDU 577.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE FÍSICA

## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos sete dias do mês de fevereiro do ano de 2024 iniciou-se a sessão pública de defesa do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado “**Mecanismos de ação das atividades leishmanicidas da anfotericina B e miltefosina**”, de autoria de **David de Ribamar Antunes da Silva**, do curso de Física Médica, do Instituto de Física da UFG. Os trabalhos foram instalados pelo Prof. Dr. Antonio Alonso (IF/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Sílvio Leão Vieira (IF/UFG) e Prof. Dr. Emerson Nobuyuki Itikawa (IF/UFG). Após a apresentação, a banca examinadora realizou a arguição do estudante. Posteriormente, de forma reservada, a Banca Examinadora atribuiu a nota final de **8,0** (oito vírgula zero), tendo sido o TCC considerado **aprovado**.

Proclamados os resultados, os trabalhos foram encerrados e, para constar, lavrou-se a presente ata que segue assinada pelos Membros da Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Alonso, Professor do Magistério Superior**, em 07/02/2024, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvio Leao Vieira, Coordenador**, em 07/02/2024, às 12:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Emerson Nobuyuki Itikawa, Professor do Magistério Superior**, em 07/02/2024, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **4332938** e o código CRC **5EB40303**.

## **Agradecimentos**

Primeiramente, agradeço a Deus por Ele ter me dado o dom da vida, saúde e competência intelectual para trilhar essa jornada, que não se encerra aqui e que ainda tem muitas etapas pela frente.

Aos meus pais, Antônia Antunes da Silva e Jesus Lopes da Silva, por terem me vida educação apropriada e incentivo para sempre seguir em frente.

Ao meus irmãos Helivando, Ozires. Silvania, Maria Jose e Marilene, por sempre confiar na minha competência e me motiva a seguir em frente nessa jornada.

À toda minha família, amigos e colegas de curso que sempre me apoiaram e acreditaram no meu potencial.

## RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada por parasita do gênero *Leishmania*, seu tratamento é feito por meio de medicamentos, sendo antimoniato de meglumina, anfotericina B (AmB) e miltefosina (MTF) a ordem de escolha segundo orientação da secretaria de saúde. A espectroscopia Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) com marcador de spin foi utilizada para mostrar que os medicamentos MTF e AmB, causam rigidez na membrana do parasita *L. amazonensis*. A rigidez da membrana foi associada à peroxidação lipídica e/ou oxidação de proteínas de membrana, resultantes do aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e não foi observada pelos medicamentos. Testes semelhantes foram feitos para *macrófago J774A.1* não foi observada rigidez de membrana, sugerindo que sua produção de óxido nítrico (NO) pode reduzir o estresse oxidativo. Para a MTF, a rigidez da membrana em *Leishmania* não é resultado de suas interações diretas com a membrana, pois imediatamente após o tratamento, a MTF causa fluidez. Para medições imediatamente após o tratamento, para as quais o período de incubação é insuficiente para ocorrer estresse oxidativo, a AmB também causa rigidez de membrana, mas esse efeito foi observado para uma concentração do medicamento 100 vezes maior. Esse resultado mostra que, para concentrações mais elevadas de AmB, a espectroscopia RPE é capaz de detectar interações diretas de AmB com a membrana do parasita, provavelmente formando os putativos agregados AmB/ergosterol, que causam rigidez da membrana. No *macrófago J774A.1*, os efeitos da fluidez da MTF e da rigidez da AmB também foram observados. Esses efeitos ocorreram para períodos curtos de incubação e nas respectivas concentrações do medicamento que mostraram citotoxicidade. Nossos estudos mostraram que esses medicamentos são ativos na membrana e sugerem que os mecanismos de ação de suas atividades antileishmaniais estão associados aos seus efeitos primários na membrana celular. A alteração da membrana pode causar desequilíbrio iônico, o que pode afetar o potencial de membrana mitocondrial e, assim, aumentar a formação de ROS.

**Palavras-chave:** miltefosina; anfotericina B; ressonância paramagnética eletrônica.

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania*, and its treatment involves the use of medications, with meglumine antimoniate, amphotericin B (AmB), and miltefosine (MTF) being the preferred choices according to health department guidelines. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy with spin labels was employed to demonstrate that the drugs MTF and AmB induce rigidity in the membrane of the *L. amazonensis* parasite. Membrane rigidity was associated with lipid peroxidation and/or oxidation of membrane proteins, resulting from an increase in the formation of reactive oxygen species (ROS) promoted by the medications. Similar tests were conducted on *J774A.1 macrophages*, but membrane rigidity was not observed, suggesting that their production of nitric oxide (NO) may reduce oxidative stress. For MTF, membrane rigidity in *Leishmania* is not the result of its direct interactions with the membrane because immediately after treatment, MTF induces fluidity. For measurements immediately after treatment, where the incubation period is insufficient for oxidative stress to occur, AmB also induces membrane rigidity, but this effect was observed at a drug concentration 100 times higher. This result indicates that for higher concentrations of AmB, EPR spectroscopy can detect direct interactions of AmB with the parasite membrane, probably forming putative AmB/ergosterol aggregates that cause membrane rigidity. In *J774A.1 macrophages*, the effects of MTF-induced fluidity and AmB-induced rigidity were also observed. These effects occurred for short incubation periods and at the respective drug concentrations that showed cytotoxicity. Our studies have shown that these drugs act on the membrane and suggest that the mechanisms of action of their antileishmanial activities are associated with their primary effects on the cell membrane. Membrane alteration can cause ionic imbalance, which may affect mitochondrial membrane potential and, thus, increase ROS formation.

**Keywords:** miltefosine; amphotericin B; electron paramagnetic resonance.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de um espectrômetro de RPE de banda X. Adaptado de[23]. . . . .	18
Figura 2 – Níveis de energia Zeeman em função da intensidade do campo magnético. Em $H > 0$ , ocorre a quebra da degenerescência, resultando em dois estados associados a $M_s = +1/2$ e $M_s = -1/2$ .. . . .	20
Figura 3 – Níveis de energia do elétron desemparelhado na presença de um campo magnético aplicado, de um grupo nitróxido. . . . .	23
Figura 4 – Marcador de spin 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao $5^0$ carbono da cadeia acila. . . . .	25
Figura 5 – Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais $2A_{  }$ e $2A_{\perp}$ . . . . .	26
Figura 6 – Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 24, 48 e 472 h de tratamento com MTF (A) e AmB (B) nas concentrações indicadas. O volume da amostra foi de 2mL com $5 \times 10^7$ parasitas/mL. Os valores do parâmetro RPE $2A_{  }$ (separação hiperfina externa) estão indicados para cada espectro RPE. Este parâmetro é medido diretamente no espectro RPE e é determinado pela separação do campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido. O erro experimental estimado de $2A_{  }$ é de 0,5 G. A intensidade dos espectros está em unidades arbitrárias (eixo Y) e a faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro RPE foi de 100 G (eixo X). . . . .	31
Figura 7 – O parâmetro de $2A_{  }$ para diferentes concentrações de MTF (A) e AmB (B) é apresentado. Este é um parâmetro medido no espectro de RPE, conforme mostrado na Figura 6. . . . .	32
Figura 8 – Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na membrana plasmática de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ou macrófagos, conforme indicado em cada coluna. As células foram tratadas com MTF (A) e AmB (B) nas concentrações indicadas, e os valores do parâmetro $2A_{  }$ são indicados ao final de cada espectro. Os períodos de incubação usados após o tratamento também estão indicados em cada coluna. As três setas azuis indicam as posições de três linhas de ressonância provenientes de marcadores de spin que estão fora da membrana, girando livremente na solução aquosa. Essas linhas estreitas indicadas com setas azuis, representam uma pequena fração de sondas livres e estão presentes em quase todos os espectros. . . . .	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> . . . . .	<b>12</b>
1.1	CONSIDERAÇÕES GERAIS . . . . .	12
1.2	LEISHMANIOSE . . . . .	13
1.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS . . . . .	14
1.4	AGENTE ETIOLÓGICO . . . . .	14
1.5	TRATAMENTO . . . . .	15
<b>2</b>	<b>TÉCNICAS EXPERIMENTAIS</b> . . . . .	<b>17</b>
2.1	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA . . . . .	17
2.2	CONCEITOS BÁSICOS E EFEITO ZEEMAN . . . . .	17
2.3	PROCESSOS DE RELAXAÇÃO . . . . .	21
2.4	FATOR DE LANDÉ . . . . .	22
2.5	INTERAÇÃO NUCLEAR HIPERFINA . . . . .	23
2.6	O MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN E ANISOTROPIA ESPECTRAL . . . . .	25
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> . . . . .	<b>27</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS . . . . .	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS . . . . .	27
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> . . . . .	<b>28</b>
4.1	QUÍMICOS UTILIZADOS . . . . .	28
4.2	CULTIVO DAS CÉLULAS PARASITAS . . . . .	28
4.3	CULTIVO DOS MACRÓFAGOS J774.A1 . . . . .	28
4.4	VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT NOS PARASITAS . . . . .	28
4.5	PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ESPECTROSCOPIA DE RPE . . . . .	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> . . . . .	<b>30</b>
5.1	AS DROGAS MILTEFOSINA E ANFOTERICINA B CAUSAM RIGIDEZ NA MEMBRANA DO PARASITA LEISHMANIA. . . . .	30
5.2	A RIGIDEZ DA MEMBRANA CAUSADA POR MTF E AMB EM LEISHMANIA É ATRIBUÍDA AO ESTRESSE OXIDATIVO. . . . .	30
5.3	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> . . . . .	34
5.4	A RIGIDEZ DA MEMBRANA ESTÁ ASSOCIADA AO AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ERO . . . . .	34
5.5	A PRODUÇÃO AUMENTADA DE ERO PARECE SER UMA CONSEQUÊNCIA DO DESEQUILÍBRIO IÔNICO NA MEMBRANA PLASMÁTICA . . . . .	35

5.6	MTF E AMB NÃO INDUZIRAM RIGIDEZ DE MEMBRANA NO <i>MACRÓ-FAGO J774A.1</i> . . . . .	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> . . . . .	<b>37</b>
6.1	CONCLUSÃO . . . . .	37
6.2	PERSPECTIVAS . . . . .	37
	<b>Bibliografia</b> . . . . .	<b>38</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

A leishmaniose constitui um conjunto de doenças infecciosas ocasionadas por parasitas do gênero *Leishmania*. Diferentes espécies de *Leishmania* desencadeiam três manifestações clínicas predominantes: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose visceral. Enquanto a leishmaniose cutânea, a forma mais comum, é provocada principalmente por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* no Velho Mundo, ou por *L. americana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. panamensis* e *L. guyanensis* no Novo Mundo, a leishmaniose visceral é majoritariamente causada por *L. donovani* na Ásia e na África, e por *L. infantum* na Bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, América do Sul e Central [1].

A leishmaniose é uma doença tropical endêmica negligenciada que se distribui em mais de 90 países, com cerca de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a enfermidade anualmente [1, 2]. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* são consideradas as espécies de maior relevância epidemiológica no Brasil [3]. Embora *L. amazonensis* normalmente resulte em doença cutânea, ocasionalmente pode se manifestar como leishmaniose cutânea difusa, caracterizada pelo crescimento descontrolado de parasitas em lesões difusas na pele [3].

Atualmente, as opções terapêuticas para o tratamento sistêmico da leishmaniose incluem antimoniais pentavalentes, AmB, MTF e isetionato de pentamidina [4]. No entanto, diversas desvantagens limitam a utilização desses medicamentos, tais como custo elevado, alta toxicidade, necessidade de administração prolongada e desenvolvimento de resistência aos medicamentos [5]. Os antimoniais pentavalentes ainda são considerados tratamentos de primeira linha em muitos países em desenvolvimento [4, 6]. Entretanto, devido ao surgimento de resistência em larga escala no estado de Bihar, a AmB é atualmente considerada uma opção de tratamento de primeira linha para a leishmaniose na Índia [6].

Essa perspectiva destaca a imperatividade de buscar novos agentes terapêuticos [7]. Uma compreensão abrangente dos mecanismos de ação dos medicamentos existentes pode facilitar a busca por novos agentes terapêuticos, sejam eles naturais ou sintéticos, com melhor eficácia e menos efeitos colaterais. Apesar dos avanços significativos nos últimos anos para ampliar a compreensão dos mecanismos de ação das atividades leishmanicidas da MTF e da AmB, persistem muitas dúvidas para estabelecer os mecanismos finais.

A AmB é uma molécula anfifílica e zwitteriônica com elevada afinidade pelas membranas biológicas [8]. O modelo mais amplamente aceito para explicar os mecanismos de ação da AmB contra parasitas e fungos é o do canal iônico. Conforme esse modelo, a AmB forma complexos com moléculas de esterol na membrana celular, originando canais iônicos que conduzem à

morte celular. Curiosamente, o vazamento iônico através desses canais resulta em diversas consequências celulares semelhantes às observadas na ação da MTF. Relatos indicam que no parasita *Leishmania*, a AmB provoca a entrada de  $Ca^{2+}$  na célula [9], despolarização do potencial de membrana mitocondrial, formação interna de espécies reativas de oxigênio (ERO) e apoptose [6, 10].

## 1.2 LEISHMANIOSE

As leishmanioses representam antropozoonoses que englobam um amplo espectro clínico e diversidade epidemiológica, constituindo um desafio significativo para a saúde pública, não apenas no Brasil, mas também em diversas partes do mundo. A Organização Mundial da Saúde estima cerca de dois milhões de novos casos anualmente, abrangendo diversas formas clínicas da doença [11].

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, causada por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, afetando pele e mucosas. Primariamente zoonótica, ela afeta animais silvestres, e mais raramente domésticos, incluindo marsupiais, carnívoros e até primatas, sendo o homem um hospedeiro acidental [12]. No Brasil ela foi inicialmente identificada em São Paulo em 1895 por Moreira [11].

A confirmação da presença de formas de leishmanias em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas ocorreu em 1909, quando Indenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamento para a construção de rodovias no interior de São Paulo. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença, e Gaspar Vianna atribuiu ao parasita o nome de *Leishmania brazilienses*. Em 1922, Aragão realizou a primeira demonstração do papel do flebotomíneo na transmissão da LTA, enquanto Forattini, em 1958, identificou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo [11].

No Brasil, as principais espécies de *Leishmania* envolvidas na LTA são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (V.) naiffi*, *Leishmania (V.) shawi*, *Leishmania (V.) lainsoni* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [12]. A primeira é a espécie mais prevalente em humanos, causando lesões cutâneas e mucosas, e está associada à presença de animais domésticos. É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia*, entre outras [13]. A segunda, *L.V. guyanensis*, causa predominantemente lesões cutâneas na margem norte do Rio Amazonas, com os principais vetores sendo *Lu. umbratilis*, *Lu. anduzei* e *Lu. whitmani* [13]. A terceira, *L.V. naiffi*, ocorre na Amazônia, nos Estados do Pará e Amazonas, tendo o tatu como reservatório natural e *Lu. squamiventris*, *Lu. paraensis* e *Lu. Ayrozai* como principais vetores [14]. A quarta, *L.V. shawi*, tem baixa incidência no Amazonas e Pará, com macacos e preguiças como reservatórios, e *Lu. whitmani* como vetor [15]. A quinta, *L.V. lainsoni*, ocorre exclusivamente na Amazônia, com a paca como suspeito de reservatório natural e *Lu. ubiquitalis* como vetor [15]. Por último, *L.L. amazonensis* causa LTA, incluindo leishmaniose cutânea difusa, com roedores e marsupiais como

reservatórios e *Lu. flaviscutellata* e *Lu. olmeca* como principais vetores [15].

Outra forma da doença é a leishmaniose visceral (LV), uma variante mais grave e com alta taxa de letalidade, causada por *L. donovani* ou *L. infantum*, dependendo da área geográfica. *L. infantum* infecta principalmente crianças e indivíduos imunossuprimidos, enquanto *L. donovani* infecta todas as faixas etárias. Estima-se que ocorram 500 mil novos casos de LV e mais de 50 mil mortes pela doença a cada ano [16]. No Brasil, epidemias urbanas foram observadas em várias cidades, com a letalidade aumentando de 3,4% em 1994 para 5,7% em 2009, representando um incremento de 67,6%. A letalidade média nos últimos quatro anos foi de 5,8%, sendo as complicações infecciosas e hemorragias os principais fatores associados à morte na LV [17].

### 1.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A apresentação clínica da LTA revela uma variedade de sintomas, e a intensidade dos sinais também varia consideravelmente. Tradicionalmente, a doença se manifesta predominantemente em duas formas: leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa. Pode ocorrer também uma infecção assintomática, quando não há evidência de manifestações clínicas, sendo identificada por meio de testes sorológicos e Intradermorreação de Montenegro (IDRM). Adicionalmente, existe a variante de Leishmaniose Linfonodal, caracterizada por linfadenopatia localizada na ausência de lesão tegumentar [18].

Na Leishmaniose Cutânea, a ferida característica é geralmente insensível e tende a surgir em áreas expostas da pele. Apresenta uma forma arredondada ou ovalar, variando de alguns milímetros a alguns centímetros. Sua base é avermelhada, infiltrada e possui uma consistência firme, com bordas bem definidas e elevadas. A parte inferior da ferida é avermelhada, com granulações grosseiras. Pode ocorrer uma infecção bacteriana associada, provocando dor local e formação de crostas sobre a base da ferida. Essa variante pode se manifestar de diversas maneiras, incluindo a forma cutânea localizada, que pode aparecer como uma ou várias lesões; a forma cutânea disseminada, caracterizada por múltiplas lesões cutâneas distantes do local das picadas; a forma cutânea difusa, presente em pacientes considerados anérgicos, com uma resposta imune celular deficiente aos antígenos da *Leishmania*; e, por último, a forma de recidiva cutis, que se destaca pela cicatrização espontânea ou mediada por medicamentos na região central da lesão [18].

A forma mucosa da LTA é provocada pela disseminação hematogênica dos parasitas para as mucosas, incluindo as nasais, orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e, de forma excepcional, a traqueia e a árvore respiratória superior [18].

### 1.4 AGENTE ETIOLÓGICO

O protozoário causador da Leishmaniose pertence ao gênero *Leishmania* [19] e está classificado na ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Este grupo compreende protozoários

unicelulares, digenéticos (heteroxenos), encontrados nas formas promastigota e paramastigota, flageladas livres ou aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados, e amastigota, sem flagelo livre, como parasitas intracelulares em hospedeiros vertebrados. A reprodução ocorre por meio de divisão binária simples em ambos os hospedeiros. Dentre os hospedeiros vertebrados, incluem-se uma variedade de mamíferos, incluindo o homem, enquanto os hospedeiros invertebrados são exclusivamente as fêmeas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos. A transmissão ocorre através da picada do inseto infectado no momento da hematofagia [20].

A morfologia dos parasitos do gênero *Leishmania* é semelhante entre as diferentes espécies, podendo ser encontrados na forma amastigota no interior das células fagocitárias ou livres. As formas amastigotas apresentam-se ovais, esféricas ou fusiformes, com um núcleo grande e arredondado, ocupando até um terço do corpo do parasito. Não possuem flagelo livre, e a porção intracitoplasmática raramente é observada. Já as formas flageladas, promastigotas, são encontradas no trato digestivo do hospedeiro invertebrado. São alongadas, com um flagelo longo e livre emergindo da porção anterior do corpo do parasito. O núcleo é arredondado ou oval e está localizado na região mediana ou ligeiramente na porção anterior do corpo [20].

O ciclo biológico da *Leishmania* inicia-se quando hospedeiros vertebrados são infectados por formas promastigotas megacíclicas, que são inoculadas pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo. A internalização da *Leishmania* ocorre por meio da endocitose mediada por receptores na superfície do macrófago. A promastigota transforma-se em amastigota, tornando-se capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo. Quando saturado, o vacúolo se rompe, e as leishmanias extravasadas são internalizadas por outros macrófagos. A infecção para o hospedeiro invertebrado ocorre durante a ingestão das formas amastigotas, que acompanham o sangue ou a linfa intersticial durante o repasto sanguíneo em indivíduo ou animal infectado. As amastigotas e o sangue são envolvidos por uma membrana quitinosa no intestino médio do inseto, onde as amastigotas se transformam em flagelados pequenos, ovoides e pouco móveis. Após três dias, ocorre a transformação em formas promastigotas delgadas e longas. Estas se ligam às microvilosidades intestinais do inseto através do flagelo. Após a digestão do alimento e a excreção, as formas flageladas migram para a porção torácica do intestino médio, onde ocorre a transformação em (1) promastigotas curtas e largas livres na luz intestinal, (2) paramastigotas arredondadas fixadas pela cutícula através de hemidesmossomos e (3) promastigotas metacíclicas, sendo esta a forma virulenta da *Leishmania* [20].

## 1.5 TRATAMENTO

O tratamento da Leishmaniose no Brasil, tanto para a Leishmaniose Tegumentar (LT) quanto para a Leishmaniose Visceral (LV), é realizado de forma ambulatorial ou hospitalar, utilizando medicamentos de administração oral e intravenosa. Os medicamentos empregados incluem o antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), AmB e AmB lipossomal. A escolha entre eles leva

em consideração a faixa etária, a presença de gravidez e comorbidades[17].

Os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são as drogas de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda que a dose desse antimonial seja calculada em  $mgSb^{+5}/kg/dia$ . No Brasil, o antimoniato de N-metilglucamina é o principal representante dessa classe. Ele é indicado para o tratamento de todas as formas clínicas da LT e LV, agindo como leishmanicida especialmente nas formas amastigotas de *Leishmania* [11].

As drogas de segunda escolha são indicadas em casos de pacientes grávidas ou quando não há resposta satisfatória ao tratamento com antimoniais pentavalentes. Nesses casos, as opções incluem AmB e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina), sendo a AmB a única escolha para o tratamento de gestantes [17]. Esses medicamentos são indicados para todas as formas clínicas da LT e LV [11, 17]. A AmB é reconhecida como a droga leishmanicida mais potente comercialmente disponível, agindo nas formas promastigotas e amastigotas do parasita.

## 2 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

### 2.1 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

A técnica de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) teve sua origem em 1945, desenvolvida pelo físico Evgeniy Zavoisky na extinta União Soviética [21]. No contexto biológico, a RPE possibilitou a aplicação de moléculas como cátions metálicos e nitróxidos às amostras. Essas moléculas atuam como sondas, desempenhando o papel de marcadores de spin, e monitoram a dinâmica molecular do sistema. Elas fornecem informações valiosas sobre a mobilidade ou rigidez do sistema, polaridade do meio, torção da cadeia molecular, entre outros aspectos, utilizando uma quantidade relativamente baixa de amostra [22]. Além disso, a redução dos radicais de nitróxido possibilita a determinação da atividade metabólica do sistema em análise.

O espectrômetro de RPE, conforme representado no diagrama de bloco da Figura 1, é composto essencialmente por quatro elementos básicos: a fonte de radiação (Klystron), a amostra irradiada, um eletroímã e um detector que mede a intensidade transmitida da radiação incidente. O processo experimental se inicia com o Klystron, responsável por gerar micro-ondas plano polarizadas. Essas micro-ondas são transmitidas pela guia de onda retangular até o atenuador, que controla a potência. Em seguida, as micro-ondas são direcionadas pelo circulador, redirecionando-as pela guia de onda retangular para a cavidade onde a amostra está localizada. Ao passar pela íris, um dispositivo que ajusta a quantidade de radiação refletida para fora da cavidade, as micro-ondas incidem na amostra. Após a interação com a amostra, a radiação é refletida para fora da cavidade, retornando ao circulador. Neste ponto, as micro-ondas são novamente direcionadas pela guia de onda retangular para o diodo de detecção. A interferência das micro-ondas na corrente que passa pelo diodo permite a avaliação da quantidade absorvida para diferentes valores de campo magnético (a variação do campo magnético é mais conveniente instrumentalmente do que a variação da frequência de micro-ondas). As ondas refletidas após a passagem pelo detector são conduzidas pelo circulador a um absorvedor, onde são completamente eliminadas.

### 2.2 CONCEITOS BÁSICOS E EFEITO ZEEMAN

Quando um elétron está na eletrosfera, ele apresenta dois tipos de momentos magnéticos distintos. O primeiro é o momento angular orbital ( $J$ ), que resulta do movimento orbital do elétron em torno do núcleo atômico. O segundo é o momento magnético devido ao próprio giro do elétron em torno do seu eixo, chamado de spin ( $S$ ). A soma desses dois momentos magnéticos fornece o momento magnético total do elétron. Vale ressaltar que para a técnica de RPE, o momento de Spin tem uma contribuição predominante.

Um dipolo magnético do elétron apresenta energia de interação:

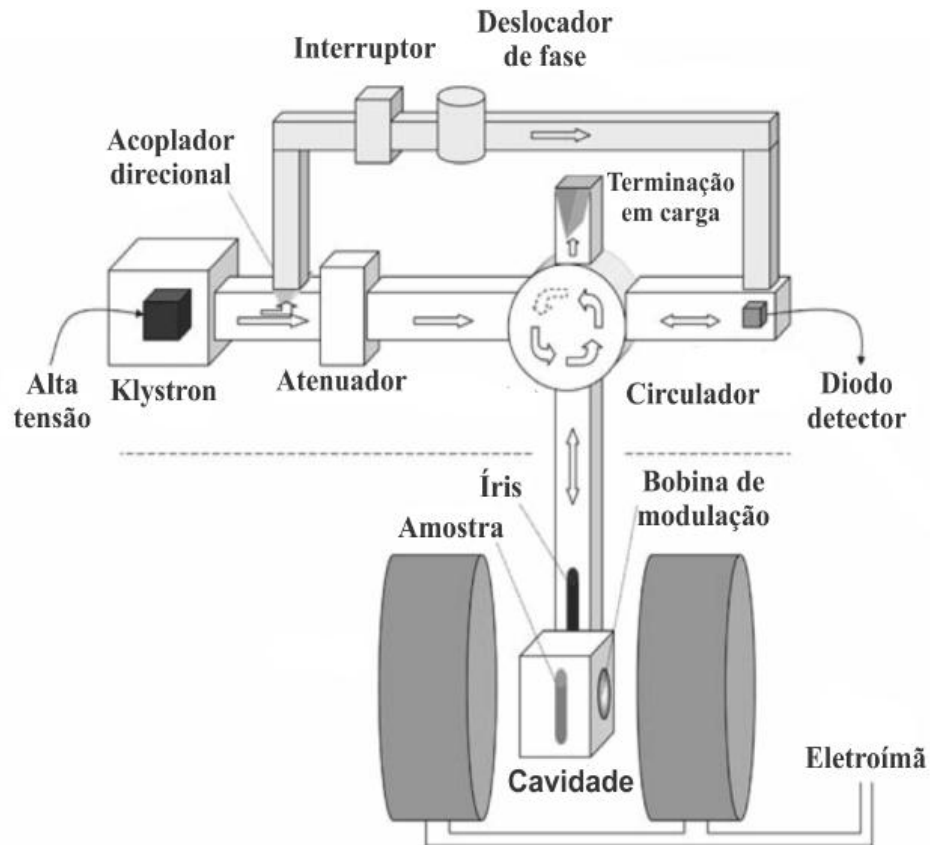


Figura 1 – Representação esquemática de um espectrômetro de RPE de banda X. Adaptado de[23].

$$E = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (2.1)$$

Onde  $E$  é a energia,  $\mu$  o momento magnético e  $B$  o campo magnético externo aplicado. Tal energia pode ser derivada de uma Hamiltoniana na forma:

$$H = -\vec{\mu} \cdot \vec{B} \quad (2.2)$$

Para o campo magnético na direção do eixo  $z$ :

$$H = -\vec{\mu}_z \cdot \vec{B}_0 \quad (2.3)$$

O momento magnético  $\vec{\mu}_z$ , como citado anteriormente, tem uma dependência quase que integral do spin, de modo que podemos expressar uma relação linear entre ambos:

$$\vec{\mu}_z = \gamma \cdot \vec{S}_z \quad (2.4)$$

sendo  $\gamma$  a razão giromagnética, que é proveniente da razão entre o momento magnético e o momento angular. De forma geral, a mesma é dada por:

$$\gamma = \frac{gQ}{2m} \quad (2.5)$$

Onde  $Q$  é a carga,  $m$  a massa da partícula e  $g$  o fator de Landé ( $g = 2.00232$  para o elétron livre). Tal constante descreve a interação spin-órbita entre a molécula e o elétron desemparelhado. Para o elétron, temos que:

$$\gamma = \frac{-ge}{2m} \quad (2.6)$$

sendo  $e$  a carga elementar do elétron e considerando  $Q = -e$ . Agora aplicando a Equação 2.6 na Equação 2.4:

$$\vec{\mu}_z = \frac{-ge}{2m} \cdot \vec{S}_z \quad (2.7)$$

multiplicando o numerador e o denominador por  $\hbar$  e substituindo  $\beta = \frac{e\hbar}{2m}$  temos:

$$\vec{\mu}_z = \frac{-g\beta}{\hbar} \cdot \vec{S}_z \quad (2.8)$$

Sendo  $\beta$  o magnéton de Bohr.

Ainda no eixo  $z$ , consideremos o operador diferencial  $\vec{S}_z$  que possui dois autoestados, sendo estes  $|\alpha\rangle$  e  $|\beta\rangle$ , onde o primeiro representa o spin do elétron para cima e o segundo, o spin do elétron para baixo. Aplicando o operador  $\vec{S}_z$  sobre seus autoestados, temos que:

$$\vec{S}_z |\alpha\rangle = \frac{e\hbar}{2} |\alpha\rangle \uparrow \quad (2.9)$$

$$\vec{S}_z |\beta\rangle = \frac{e\hbar}{2} |\beta\rangle \downarrow \quad (2.10)$$

Podemos aplicar Equação 2.8 na hamiltoniana da Equação 2.3, de modo que obtemos:

$$H = \frac{g\beta B_0}{\hbar} \vec{S}_z \quad (2.11)$$

Ao aplicarmos a hamiltoniana nos autoestados de  $\vec{S}_z$ , temos:

$$H |\alpha\rangle = \frac{g\beta B_0}{2} |\alpha\rangle \quad (2.12)$$

$$H |\beta\rangle = \frac{g\beta B_0}{2} |\beta\rangle \quad (2.13)$$

De modo que a energia pode assumir somente os valores:

$$E = \pm \frac{g\beta B_0}{2} \quad (2.14)$$

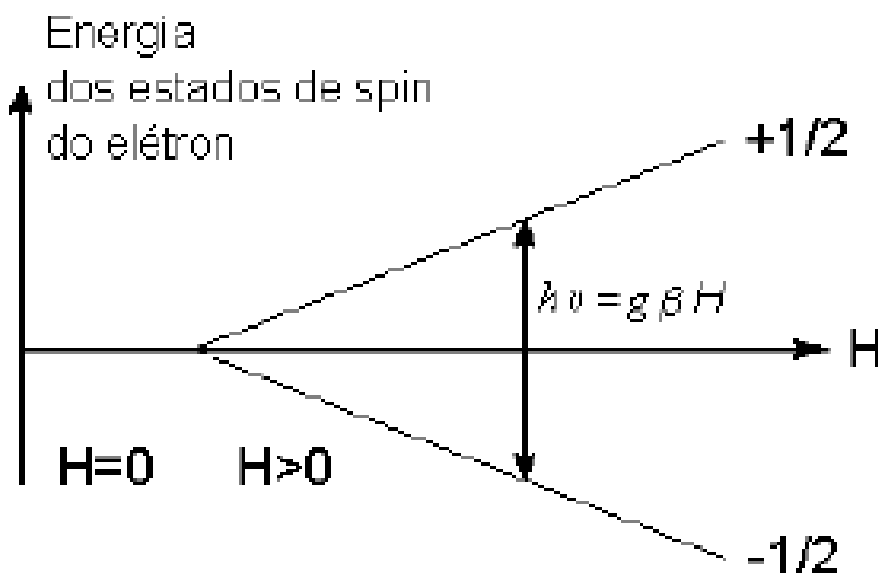


Figura 2 – Níveis de energia Zeeman em função da intensidade do campo magnético. Em  $H > 0$ , ocorre a quebra da degenerescência, resultando em dois estados associados a  $M_s = +1/2$  e  $M_s = -1/2$ .

A magnitude negativa descreve o estado de energia mais baixa, enquanto a positiva representa o estado de energia mais elevada. A energia (E) é influenciada pelo campo magnético externo, e a diferença entre esses valores corresponde à energia de separação entre esses estados. Antes da aplicação de um campo magnético, os autovalores de energia da amostra paramagnética são degenerados. Irradiando a amostra com micro-ondas de frequência fixa, fótons do feixe eletromagnético são absorvidos pela amostra para valores específicos de energia, levando o autoestado  $|\alpha\rangle$  a absorver um fóton com energia  $h\nu = g\beta B_0$ , resultando na transição para o estado  $|\beta\rangle$ . Da mesma forma, o processo inverso ocorre, onde o autoestado  $|\alpha\rangle$  pode emitir um fóton  $h\nu$  irradiado, retornando ao estado  $|\beta\rangle$ . Esse fenômeno é conhecido como efeito Zeeman, responsável por eliminar a degenerescência do sistema, e a energia resultante desse efeito é denominada Energia de Zeeman.

Além de o spin do elétron estar no estado de energia mais baixa, a componente magnética da micro-onda deve ser polarizada perpendicularmente à componente do campo externo. Isso permite a absorção da energia  $h\nu$ , e essa é a função do polarizador no aparelho de RPE. Além disso, o campo precisa ter uma frequência igual à do spin do elétron em torno do eixo z, garantindo a ressonância com o campo oscilante e possibilitando as trocas de energia entre os estados. Essas trocas de energia são essenciais para a leitura no equipamento de RPE. Somado a estas condições, temos a distribuição de Boltzman:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{-\Delta E}{kT}} \quad (2.15)$$

Aqui  $N_\alpha$  e  $N_\beta$  são os números de Spins do auto estado de maior e menor energia respectivamente,  $k$  a constante de Boltzman e  $T$  a temperatura absoluta do sistema. Aplicando a Equação 2.14 na Equação 2.15, temos que:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{-g_e\beta_e B_0}{kT}} \quad (2.16)$$

Expandindo numa série de Taylor em primeira ordem, obtemos:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = 1 - \left[ \frac{-g_e\beta_e B_0}{kT} \right] \quad (2.17)$$

No estado de equilíbrio térmico, os autoestados de menor energia são mais populados em relação aos de maior energia. Essa assimetria na distribuição de populações entre os estados de energia é uma condição crucial para a ocorrência do fenômeno conhecido como Efeito Zeeman. Se as populações dos estados de menor e maior energia fossem iguais, não haveria a ocorrência do fenômeno de ressonância. Nesse cenário, o número de spins excitados seria equivalente ao número de spins em estados de emissão induzida. Isso resultaria na ausência de absorção ou emissão líquida de energia, anulando qualquer sinal de ressonância que seria necessário para a leitura do espectro [22].

### 2.3 PROCESSOS DE RELAXAÇÃO

A equação 2.17 indica que o estado  $|\beta\rangle$  tem uma população de spins maior do que o estado  $|\alpha\rangle$ . Com a aplicação de um campo externo, o estado  $|\beta\rangle$  absorve um fóton de energia e passa por uma transição para o estado  $|\alpha\rangle$ , que possui uma energia mais elevada. Esse processo continua até que as populações dos estados  $|\beta\rangle$  e  $|\alpha\rangle$  se igualem, cessando o Efeito Zeeman e o fenômeno de ressonância, resultando no desaparecimento do sinal no espectro.

Entretanto, devido à interação do spin do elétron com a vizinhança e ao movimento aleatório dos átomos, ocorre a troca de energia dentro do sistema. Isso aumenta novamente o número de spins no estado de menor energia, possibilitando o reinício do Efeito Zeeman. Esse processo é conhecido como relaxamento e ocorre de duas maneiras distintas: Relaxamento Spin-Rede (longitudinal) e Relaxamento Spin-Spin (transversal) [24].

O relaxamento longitudinal acontece quando o spin de maior energia cede energia aos átomos vizinhos (rede) na forma de calor, retornando ao estado  $|\beta\rangle$ . O tempo característico para esse processo é chamado de tempo de relaxação spin-rede ( $T_1$ ), que representa a meia-vida do spin de maior energia. Partindo do princípio da incerteza de Heisenberg, podemos relacionar  $T_1$  com a energia do sistema e obter:

$$\Delta E \cdot T_1 \sim \hbar \quad (2.18)$$

Aqui  $\Delta E$  é a incerteza da energia,  $T_1$  o tempo de relaxamento e  $\hbar$  a constante de Planck. Substituindo  $E = h\nu$ , temos:

$$\Delta\nu \sim \frac{1}{T_1} \quad (2.19)$$

Onde  $\Delta\nu$  é a incerteza da frequência. Tomando a equação Eq. (2.8), em termos de fótons:

$$\hbar \cdot \Delta\nu \sim g\beta e\Delta B \quad (2.20)$$

Tirando o valor da incerteza da frequência e aplicando em Eq. (2.18):

$$\Delta B \sim \hbar \frac{\Delta\nu}{g\beta e T_1} \quad (2.21)$$

Sendo  $\Delta B$  a variação do campo magnético externo e representa as linhas de ressonância do espectro. Para um tempo  $T_1$  pequeno, haverá um aumento na largura das linhas de ressonância, estas linhas se tornarão tão largas e não será possível observar as transições de RPE. Para  $T_1$  longo,  $\Delta B$  tende a zero, significando que o sistema passará do estado  $|\beta\rangle$  para o estado  $|\alpha\rangle$ , não ocorrendo o inverso, saturando o processo e extinguindo o efeito Zeeman [24].

Devido a distribuição na sua direção variar exponencialmente no tempo, a orientação do Spin contribui para o relaxamento via Spin-Spin, não reduzindo a saturação, mas contribuindo para o alargamento da linha.

$$\Delta\nu \sim \frac{1}{T_2} \quad (2.22)$$

Aqui  $T_2$  é o tempo de relaxação Spin-Spin. Quanto menor seu valor, maior será o alargamento da linha. Como  $\nu$  representa a frequência de precessão, e depende da intensidade e distribuição dos campos locais em torno dos centros paramagnéticos, pois a largura de linha depende dos movimentos de precessão dos spins em torno do campo magnético [25].

## 2.4 FATOR DE LANDÉ

O fator  $g$  (fator de Landé) é uma constante relacionada ao elétron livre, que descreve interação spin-órbita da molécula ao qual o elétron desemparelhado está interagindo. Com a transições de energia, os elétrons transitam pela estrutura molecular, produzindo um campo magnético local, interagindo com o campo externo, variando o valor de  $g$ , que é descrito na forma:

$$g = \frac{h\nu}{\beta H_r} \quad (2.23)$$

Com  $H_r$  é o campo magnético ressonante,  $\beta$  é o magnéton de Bohr, e  $g$  é o fator de Landé.

## 2.5 INTERAÇÃO NUCLEAR HIPERFINA

A interação nuclear hiperfina se dá quando o elétron desemparelhado interage com o momento magnético do núcleo, gerando um desdobramento das linhas espectrais. Tal interação é dada pela soma vetorial dos campos local e externo, resultando no campo efetivo:

$$H_{efet} = H_{ext} + H_{local} \quad (2.24)$$

Devemos levar em consideração o número quântico  $l$ , com este variando de  $0, \frac{1}{2}, 1, \dots$ , onde para o spin nuclear  $M_I$ , temos  $(2l+1)$  valores possíveis para o  $H_{local}$ . Desta forma, a ressonância será observada em valores de  $(2l + 1)$  e o espectro será separado em  $(2l + 1)$  linhas, por consequência das regras de seleção  $\Delta M_s = \pm 1$  e  $\Delta M_l = 0, 1$ . A separação das linhas de desdobramento é o desdobramento hiperfino e está representado na Figura 3.

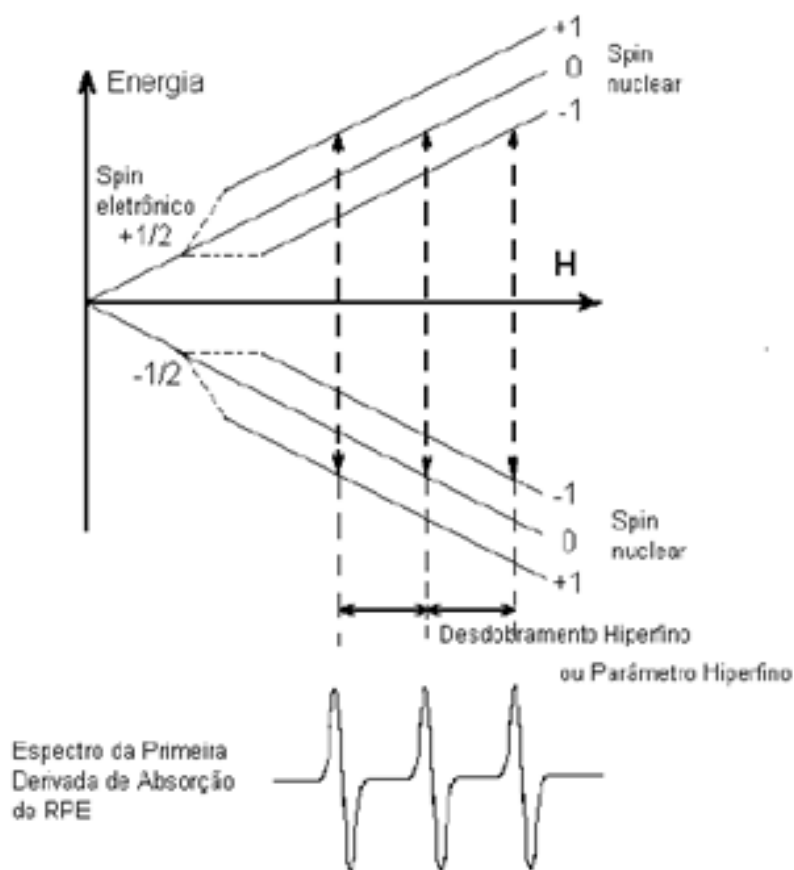


Figura 3 – Níveis de energia do elétron desemparelhado na presença de um campo magnético aplicado, de um nitróxido.

O fenômeno se dá por conta da contribuição do elétron dos orbitais, p, d, f. Aqui o elétron está próximo ao núcleo, onde o momento de dipolo magnético do elétron ( $\mu_e = g\lambda_e S$ ) e o momento magnético do núcleo ( $\mu_n = g\beta I$ ), estão separados por uma distância  $r$ .

Nesse caso núcleo gera um campo local que se comporta como um dipolo magnético puntiforme. E há uma dependência do ângulo que é formado entre a linha que liga os dipolos e o campo externo aplicado. Portanto a interação dipolo-dipolo é anisotrópica, pois depende da orientação do  $H_{local}$  [26]. A Hamiltoniana deste sistema é descrita por:

$$\hat{H}_D = -g_e\beta_e g_n\beta_n \left[ \frac{\hat{S}\hat{I}}{r^3} - \frac{3(\hat{S} \cdot \vec{r})(\hat{I} \cdot \vec{r})}{r^5} \right] \quad (2.25)$$

Onde  $g$   $\beta$  é o fator de Landé e o  $\beta$  magnéton de Bohr respectivamente,  $r$  é a distância entre os dipolos,  $\hat{S}$  é o operador momento de Spin e  $\hat{I}$  o operador momento nuclear. A quantidade  $r$  pode ser expandida em termos cartesianos, resultando na forma:

$$\hat{H}_D = \hat{I} \cdot g_e\beta_e g_n\beta_n \begin{bmatrix} \langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \rangle \end{bmatrix} \cdot \hat{S} \quad (2.26)$$

$$\hat{H}_D = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{S} \quad (2.27)$$

Cada elemento da matriz, representa a média da função de onda do elétron desemparelhado.  $\overleftrightarrow{T}$  é o tensor de segunda ordem dado por:

$$\overleftrightarrow{T} = g_e\beta_e g_n\beta_n \begin{bmatrix} \langle \frac{3x^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xy}{r^5} \rangle & \langle \frac{3y^2-r^2}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle \\ \langle \frac{3xz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3yz}{r^5} \rangle & \langle \frac{3z^2-r^2}{r^5} \rangle \end{bmatrix} \quad (2.28)$$

Na diagonal:

$$T_{ii} = g_e\beta_e g_n\beta_n \langle \frac{3i^2 - r^2}{r^5} \rangle \quad (2.29)$$

Nas demais colunas:

$$T_{ij} = g_e\beta_e g_n\beta_n \langle \frac{3ij}{r^5} \rangle \quad (2.30)$$

A outra contribuição para a interação hiperfina ocorre com os elétron desemparelhado no orbital s. Devido s simetria esférica, neste orbital a interação dipolo-dipolo tenha média nula. Entretanto, o elétron deste orbital pode interagir com o núcleo. Para quantificar esta interação, utiliza-se a interação de Fermi, a qual é caracterizada por ser isotrópica. A Hamiltoniana é escrita na forma:

$$\hat{H}_{iso} = \frac{8\pi}{3} g_e \beta_e g_n \beta_n |\Psi(0)|^2 \hat{I} \cdot \hat{S} \quad (2.31)$$

$$\hat{H}_{iso} = a \hat{I} \cdot \hat{S} \quad (2.32)$$

Sendo  $a$  a constante de desdobramento hiperfino e  $|\Psi(0)|^2$  a probabilidade de encontrar o elétron na posição do núcleo. Com isso, podemos escrever o hamiltoniano da interação hiperfina de forma geral, com as interações de todos os orbitais:

$$\hat{H}_{iso} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{T} \cdot \hat{S} + a \hat{I} \cdot \hat{S} = \hat{I} \cdot \overleftrightarrow{A} \cdot \hat{S} \quad (2.33)$$

O tensor  $\overleftrightarrow{A} = (\overleftrightarrow{T} + a)$  é definido como o tensor hiperfino.[27]

## 2.6 O MÉTODO DO MARCADOR DE SPIN E ANISOTROPIA ESPECTRAL

Materiais biológicos são geralmente diamagnéticos, o que significa que não possuem elétrons desemparelhados, tornando-os inapropriados para a aplicação da RPE. Para superar essa limitação, foi desenvolvido o conceito de marcadores de spin, ou Spin Labels, por Onishi e McConnell em 1965. Essas moléculas são compostas por um radical livre que se liga a sítios específicos da molécula e por elementos químicos paramagnéticos, essenciais para a aplicação da técnica de RPE.

Os marcador de spin possibilitam a obtenção de dados sobre a localização do marcador em um determinado momento, incluindo informações sobre polaridade, dinâmica e orientação molecular, anisotropia do movimento molecular, entre outros aspectos. Vale ressaltar que o marcador de spin não reage com a amostra; ele é incorporado em seu meio biológico. Em biofísica, os marcadores de spin derivados de nitróxido são amplamente utilizados devido à sua estabilidade em diferentes condições, como variações de pH, forças iônicas e variações de temperatura em meios biológicos, conforme discutido por Swartz em 1972 [22]. Esses marcadores são valiosos para estudar a dinâmica e a estrutura molecular em sistemas biológicos através da RPE.

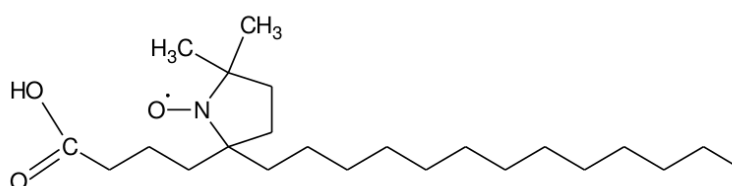


Figura 4 – Marcador de spin 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5<sup>o</sup> carbono da cadeia acila.

O 5-doxil estearato (5-Doxyl Stearic Acid), também conhecido como 5-DSA representado na parte inferior da Figura 4. Neste marcador, os radicais R ligam-se às regiões lipídicas, e o átomo de Nitrogênio possui número quântico magnético  $I = 1$ , fazendo com que seu spin nuclear apresente três orientações possíveis  $l = -1, 0, +1$ . Com isto, por conta do fenômeno de desdobramento hiperfino, o espectro fornece em solução, um triplete com intensidades próximas e iguais distâncias entre as linhas conforme ilustra a parte superior da Figura 3.

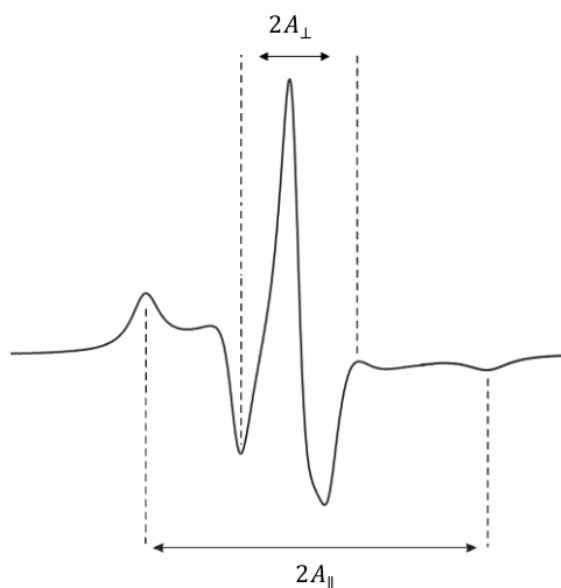


Figura 5 – Espectro de RPE do marcador de spin 5-DSA obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ .

Se o marcador consegue se movimentar rapidamente, o espectro formado será o de solução, o tensor da interação dipolo-dipolo possui traço nulo, apresentando apenas interação de Fermi que é constante no tempo e independe do movimento do marcador não sendo possível mais observar entre os valores  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ . mas quando o marcador possui movimento lento, exibindo um espectro de pó. Aqui as contribuições das diferentes orientações da interação dipolar fazem com que a média temporal não seja mais efetiva, logo o tensor interação dipolo-dipolo não mais possui traço nulo [28]. Com tudo, o movimento do grupo nitróxido não é relevante, mas sim o movimento da molécula a qual ele se encontra ligado. Nas membranas biológicas, o eixo do marcador pode assumir qualquer direção em relação à orientação do campo magnético externo, cujos valores máximos de desdobramentos ocorrem quando uma determinada população de spins possuírem as cadeias carbônicas paralelas ao campo. Quando tais cadeias estiverem dispostas de forma perpendicular a tal campo, o desdobramento será mínimo. Onde os fatores  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ , refletem a anisotropia dos fatores  $g$  e  $A$ . coordenadas do grupo nitróxido representado na Figura 5.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Nosso objetivo é avaliar a rigidez de membrana para diferentes concentrações dos fármacos e comparar os resultados de RPE com os dados de atividade antiproliferativa destes fármacos em leishmania.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por espectroscopia de RPE do marcador de spin os efeitos da AmB e MTF na membrana plasmática de promastigotas de *Leishmania amazonensis* e também em macrófagos após 24, 48 e 72 h de tratamento;
- Usar o teste de MTT para determinar as concentrações dos compostos capazes de reduzir a população dos parasitos em 50% ( $IC_{50}$ );
- Usar o teste de MTT para determinar as concentrações citotóxicas dos compostos capazes de reduzir a população dos macrófagos em 50% ( $CC_{50}$ );
- Discutir os mecanismos de ação das atividades leishmanicidas dos fármacos MTF e AmB.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 QUÍMICOS UTILIZADOS

Os surfactantes, marcadores de spin ácido 5-doxil-esteárico (5-DAS), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5- difenil-2H-tetrazólio (MTT), azul de metileno e os meios de cultura Grace e RPMI 1640 foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os tampões e meios de cultura foram utilizados com o maior grau de pureza possível e preparados com água Mili-Q.

### 4.2 CULTIVO DAS CÉLULAS PARASITAS

Foi usado nos experimentos a cepa *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa), na forma promastigota, que foi cultivada a 20 °C em placas de 24 poços contendo 2 mL de meio Grace suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado pelo calor, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. e foram obtidos do Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)). E foram expandidas retirando toda a solução contida em um poço e colocado em tubo falcon, completando o volume com meio Grace 20% até alcançar 50 ml. E armazenado na estufa à 26 °C durante 6 ou 7 dias, para alcançar o maior número formas metacíclicas das leishmanias.

### 4.3 CULTIVO DOS MACRÓFAGOS J774.A1

Os Macrófagos foram cultivados em garrafas de 100 ml preenchidas num volume de 10 ml com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, 100 U/ml penicilina, 100 mM de bicarbonato de sódio e 100 µg/ml estreptomicina. Depois de preparadas, as mesmas foram mantidas à temperatura de 37 °C, sendo realizada a troca de meio RPMI 1640 a cada três dias. Os Macrófagos foram obtidos do Leishbank (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)). E foram expandidas em garrafas de mesma capacidade e usando o mesmo volume de meio RPMI, por 15 dias após o início do cultivo das células, sendo necessária apenas uma troca de meio para continuar o cultivo na garrafa inicial.

### 4.4 VIABILIDADE CELULAR PELO TESTE DE MTT NOS PARASITAS

O MTT é um sal de tetrazólio de coloração amarelada e sensível à luminosidade [29]. Sua função é embasada na ação mitocondrial, o processo de respiração celular dos parasitas reduz o MTT, por meio da ação da desidrogenase, transformando-o em outro composto de coloração roxa, conhecido como Formazan. Quanto mais intensa for a coloração roxa, maior

será a viabilidade celular naquele local. O teste MTT iniciou com a contagem de células que é feito medindo a coluna das mesmas em um tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno para determinar a concentração de parasitas, em seguida foi colocado 100  $\mu L$  em cada poço de uma placa de 96 poços, o Meio Grace a 10% de SFB, a primeira coluna foi adicionada a molécula e completada com o mesmo meio usado anteriormente até chegar a um volume de 200  $\mu L$ , nessa coluna as concentrações serão máximas, em foi retirado 100  $\mu L$  e adicionado a segunda coluna e homogenizado, foi retirado 100  $\mu L$  e adicionado a terceira coluna, e esse processo foi repetido até a ultima coluna reduzindo a concentração do medicamento pela metade a cada procedimento, também adicionada em todos os paços da placa 100  $\mu L$  para a concentração de 10 *parasitas/mL*, diluídos em meio Grace a 10% de SFB. Após está etapa, a placa foi levada à estufa na temperatura de 26 °C durante um período de 24 h. Ao fim desse tempo cada poço recebeu 20  $\mu L$  de MTT, retornando a placa a estufa às mesmas configurações durante 4 h, tempo necessário para o MTT reagir completamente. Então cada poço recebeu 50 de SDS, para diluir os cristais de Formazan formados e, finalmente, foi determinado a concentração do  $IC_{50}$  e  $cC_{50}$  analisando a transição dos poços roxo (100% vivos) e amarelos (100% mortos).

#### 4.5 PREPARAÇÃO E MARCAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A ESPECTROSCOPIA DE RPE

Tanto os macrófagos quanto as promastigotas de *L. amazonensis* foram primeiramente diluídas em meio Grace suplementado com 10% de PBS (tampão fosfato-salino, do inglês: phosphate buffered saline) em placas de 24 poços para uma concentração final de parasita de  $5 \times 10^7 / mL$  e de macrófago de  $5 \times 10^6 / mL$  tratados com diferentes concentrações de AmB e MTF. O volume final de cada amostra foi de 2 mL. Após incubação a 26 °C por 24 h, as amostras foram transferidas para tubos eppendorfs e centrifugadas a 25.000 RPM para retirada do meio de cultura. O sobrenadante foi retirado e os parasitas foram ressuspensos em PBS. Após nova centrifugação o sobrenadante foi retirado deixando junto com os parasitas precipitados um volume de aproximadamente 50  $\mu L$ .

As amostras foram marcada aplicando uma quantidade de 0,25  $\mu L$  de uma solução etanólica contendo o marcador de spin 5-DSA diluído a 2 mg/mL em cada amostra de 50 . Para a medição de RPE, a amostra foi transferida para um tubo capilar de 1 mm de diâmetro interno. O capilar de vidro foi selado de um dos lados, usando chama, e em seguida foi centrifugado a 25000 RPM por 2 min para decantação dos parasitas ou macrófagos no fundo do tubo capilar. A região do capilar contendo as células foi posicionada bem no centro da cavidade de ressonância para realizar as medidas de RPE. E foi utilizado um espectrômetro de RPE EMX-Plus da Bruker (Rheinstetten, Alemanha) para realizar as medições de RPE. Os espectros foram adquiridos usando as seguintes configurações do instrumento: potência de micro-ondas, 10 mW; frequência de modulação, 100 kHz; amplitude de modulação, 1,0 G; varredura de campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s; e temperatura da amostra, 25°C.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 AS DROGAS MILTEFOSINA E ANFOTERICINA B CAUSAM RIGIDEZ NA MEMBRANA DO PARASITA LEISHMANIA.

A Figura 6 ilustra espectros de RPE de 5-DSA na membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* para células não tratadas e aquelas tratadas com diferentes concentrações de MTF e AmB. Como o erro experimental estimado do parâmetro  $2A_{\parallel}$  é apenas  $0,5 G$ , observa-se que após  $24 h$  a membrana tornou-se mais rígida, mesmo para concentrações de drogas tão baixas quanto  $5 \mu M$  MTF e  $0,05 \mu M$  AmB, que correspondem a concentrações aproximadamente pela metade dos valores relatados para essas duas drogas [8, 30]. Os dados de RPE também mostram que, para períodos de incubação de  $48$  e  $72 h$ , a rigidez observada na membrana aumenta ainda mais, atingindo aumentos no parâmetro  $2A_{\parallel}$  de até  $\sim 7G$ , indicativos de mudanças dramáticas na célula. O parâmetro  $2A_{\parallel}$  (separação hiperfina externa) está indicado para cada espectro de RPE, sendo medido diretamente no espectro e dado pela separação do campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido. O erro experimental estimado de  $2A_{\parallel}$  é de  $0,5 G$ . A intensidade dos espectros está em unidades arbitrárias (eixo Y), e a faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro de RPE foi de  $100 G$  (eixo X).

Na Figura 7, estão apresentados gráficos dos valores obtidos para  $2A_{\parallel}$  em diferentes concentrações de drogas e períodos de incubação. Esses gráficos mostram de forma mais evidente que os efeitos de rigidez na membrana aumentam ainda mais para períodos de incubação de  $48$  e  $72 h$ .

### 5.2 A RIGIDEZ DA MEMBRANA CAUSADA POR MTF E AMB EM LEISHMANIA É ATRIBUÍDA AO ESTRESSE OXIDATIVO.

Em estudos anteriores, foi demonstrado que o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com MTF e AmB causa alterações na fluidez da membrana. No entanto, os tratamentos foram realizados em PBS e por curtos períodos de incubação, como  $1$  ou  $2 h$ . MTF causa aumentos notáveis na fluidez, atuando principalmente no componente proteico da membrana plasmática [31, 32], enquanto AmB causa aumentos pronunciados na rigidez da membrana [8, 33].

No painel A da Figura 8A, são mostrados espectros de RPE para Leishmania tratada com MTF, obtidos imediatamente após o tratamento, com aumento na fluidez da membrana observado a partir de uma concentração de  $5 \mu M$ . Como MTF inicialmente cria um efeito de fluidez na membrana e, após  $24 h$ , reverte para um efeito de rigidez, sugere-se que essa rigidez seja causada pela peroxidação lipídica e/ou oxidação de proteínas de membrana.

O painel B da Figura 8B mostra que os efeitos de rigidez do AmB observados imediatamente após o tratamento do parasita Leishmania ocorrem em concentrações aproximadamente

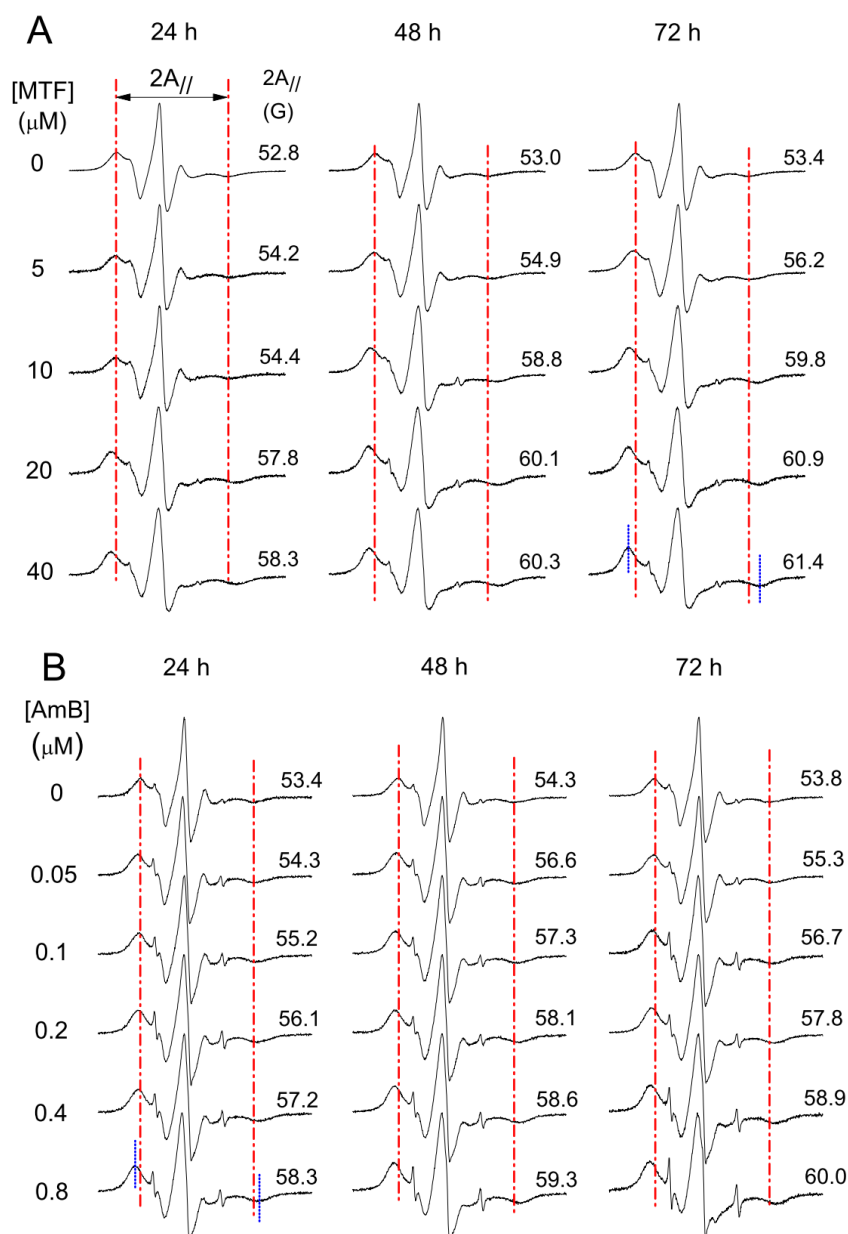


Figura 6 – Espectros de RPE representativos do marcador de spin 5-DSA inserido na membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* após 24, 48 e 472 h de tratamento com MTF (A) e AmB (B) nas concentrações indicadas. O volume da amostra foi de 2mL com  $5 \times 10^7$  parasitas/mL. Os valores do parâmetro RPE  $2A_{||}$  (separação hiperfina externa) estão indicados para cada espectro RPE. Este parâmetro é medido diretamente no espectro RPE e é determinado pela separação do campo magnético entre o primeiro pico e o último pico invertido. O erro experimental estimado de  $2A_{||}$  é de 0,5 G. A intensidade dos espectros está em unidades arbitrárias (eixo Y) e a faixa total de varredura do campo magnético em cada espectro RPE foi de 100 G (eixo X).

100 vezes maiores do que aquelas observadas durante 24 h de tratamento em meio de cultura. A rigidez da membrana observada logo após o tratamento é causada pela presença física da droga, que hipoteticamente forma partículas dentro da membrana, os complexos esterol/AmB que formam canais iônicos.

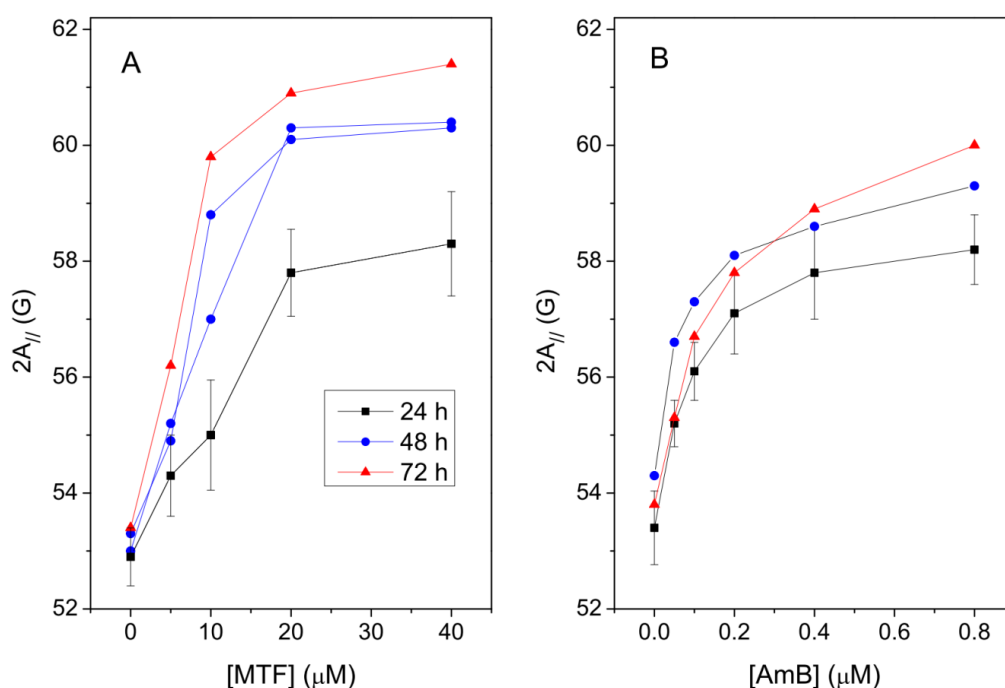


Figura 7 – O parâmetro de  $2A_{||}$  para diferentes concentrações de MTF (A) e AmB (B) é apresentado. Este é um parâmetro medido no espectro de RPE, conforme mostrado na Figura 6.

No caso dos *macrófagos J774.A1* em meio de cultura e períodos de incubação de apenas 5 minutos, o MTF não aumentou a fluidez para todas as amostras. No entanto, a rigidez da membrana não foi observada após 24 h de tratamento, mesmo para concentrações tão altas quanto  $600 \mu\text{M}$  (o painel A da Figura 8). Nessa concentração, observa-se um aumento em componentes livres.

Sondas foram observadas na amostra, indicadas pela presença de três linhas de ressonância estreitas (setas azuis), sugerindo que esta concentração de MTF causa lise no macrófago e que houve uma pequena perda de membrana.

O AmB mostrou efeitos de rigidez na membrana do macrófago após 48 h de tratamento, mas efeitos semelhantes também foram observados logo após o tratamento e nas mesmas concentrações de AmB, tanto em macrófagos quanto em *Leishmania* (Figura 8B). O fato de esses efeitos de rigidez na membrana do macrófago também serem observados logo após o tratamento e nas mesmas concentrações de AmB sugere que, para o macrófago, a rigidez da membrana não é gerada pelo estresse oxidativo, pois isso levaria um certo período de tempo para ocorrer. Assim, nossa interpretação é que a rigidez observada na membrana do macrófago é causada exclusivamente pelas interações do AmB com a membrana. Além disso, somente em concentrações muito altas de AmB é observada rigidez na membrana de *Leishmania* quando o período de incubação é apenas 5 min. Os efeitos do estresse oxidativo do AmB na membrana de *Leishmania* observados após 24 h de tratamento ocorrem em concentrações muito mais baixas da droga (o painel B da Figura 6).

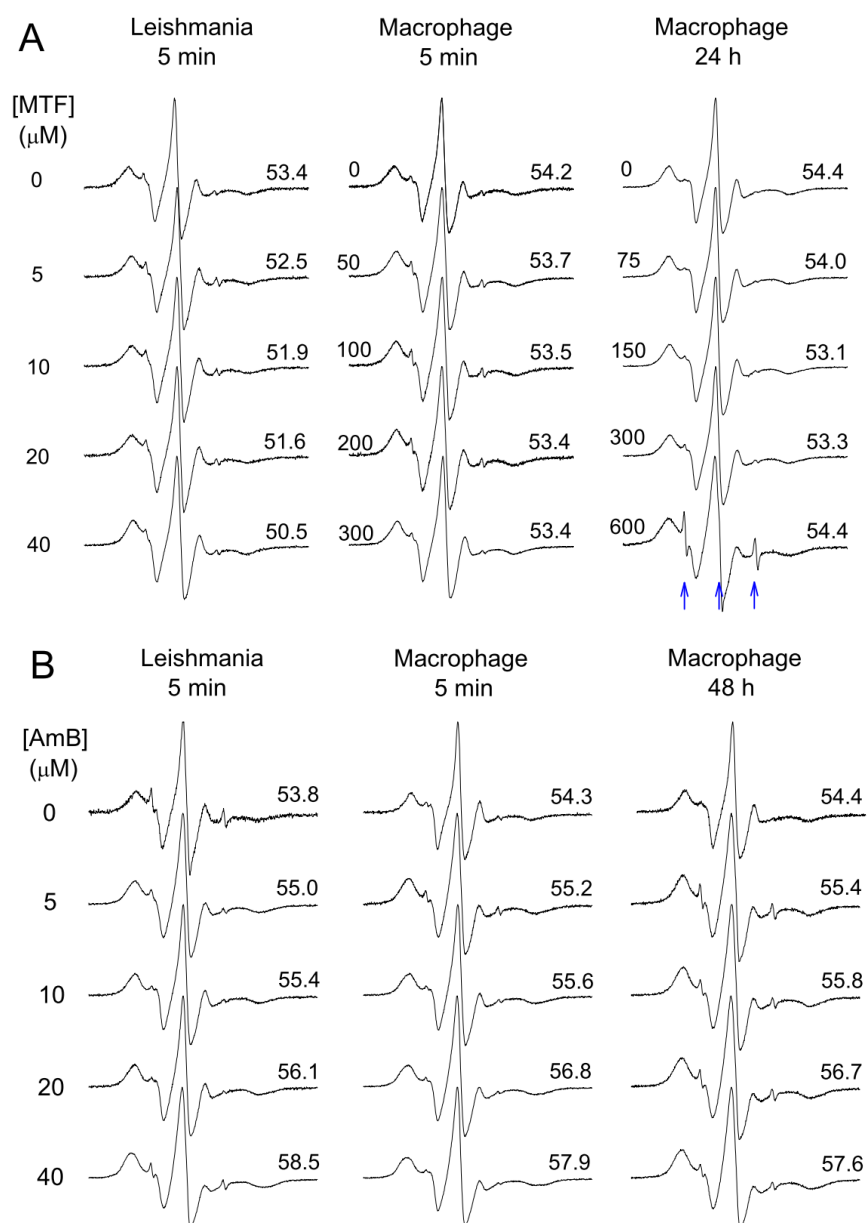


Figura 8 – Espectros representativos de RPE do marcador de spin 5-DSA incorporado na membrana plasmática de promastigotas de *L. amazonensis* ou macrófagos, conforme indicado em cada coluna. As células foram tratadas com MTF (A) e AmB (B) nas concentrações indicadas, e os valores do parâmetro  $2A_{||}$  são indicados ao final de cada espectro. Os períodos de incubação usados após o tratamento também estão indicados em cada coluna. As três setas azuis indicam as posições de três linhas de ressonância provenientes de marcadores de spin que estão fora da membrana, girando livremente na solução aquosa. Essas linhas estreitas indicadas com setas azuis, representam uma pequena fração de sondas livres e estão presentes em quase todos os espectros.

Curiosamente, as concentrações relatadas de AmB que são citotóxicas para os macrófagos são próximas a  $5 \mu M$  [8], e esta é uma concentração na qual o AmB causa forte rigidez na membrana (o painel B da Figura 8B). Assim, é provável que os efeitos de rigidez causados pela presença física do AmB na membrana do macrófago sejam suficientes para gerar os efeitos citotóxicos observados. Também no caso do MTF, as concentrações que aumentam a fluidez da membrana do macrófago são semelhantes às que apresentam atividade citotóxica. A concentração citotóxica para 50% das células ( $CC_{50}$ ) é aproximadamente  $50 \mu M$  para MTF em macrófagos J774A.1 [8, 34], e esta é a concentração aproximada de MTF que aumenta a fluidez da membrana celular (o painel A da Figura 8).

### 5.3 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA CONTRA PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

Embora as atividades de MTF e AmB contra *L. amazonensis* e macrófagos J774A.1 já tenham sido relatadas, novas medições foram realizadas neste estudo para obter uma comparação sob as mesmas condições dos experimentos de RPE. A Tabela 1 mostra os valores de  $IC_{50}$  (concentração inibitória para 50% dos parasitas) e  $CC_{50}$  (concentração citotóxica para 50% dos macrófagos) para um período de incubação de 24 h e os respectivos índices de seletividade (SI).

Teste MTF para parasita protozoário <i>L. amazonensis</i> e citotoxicidade em células J774A.1					
Amostra	J774A.1	<i>L. amazonensis</i>			
		Promastigotas		Amastigotas	
		$CC_{50} \pm DP(\mu M)$	$IC_{50} \pm SD(\mu M)$	SI	$IC_{50} \pm DP(\mu M)$
MTF	$54.2 \pm 5.2$	$10.7 \pm 1.2$	5.0	$8.0 \pm 2.1$	6.8
AmB	$4.2 \pm 1.2$	$0.1 \pm 0.1$	42.0	$0.2 \pm 3.1$	21.0

Tabela 1 – Atividade antiproliferativa contra o parasita protozoário *L. amazonensis* e citotoxicidade em células J774A.1 onde  $CC_{50}$  = concentração citotóxica para 50% das células.  $IC_{50}$  = concentração inibitória para 50% dos parasitas. DP = desvio padrão. SI = índice de seletividade ( $CC_{50}/IC_{50}$ ).

Para MTF em *L. amazonensis*, foram encontrados valores de  $IC_{50}$  de  $12 \mu M$  [30] e  $21 \mu M$  para promastigotas, e  $13 \mu M$  [30] e  $2 \mu M$  para amastigotas [35]. No caso do AmB, os valores de  $IC_{50}$  foram  $0,8 \mu M$  em promastigotas [35] e  $0,1 \mu M$  em amastigotas [8]. Para os macrófagos, foram relatados valores de  $CC_{50}$  de  $55 \mu M$  para MTF e  $4 \mu M$  para AmB [35, 36].

### 5.4 A RIGIDEZ DA MEMBRANA ESTÁ ASSOCIADA AO AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ERO

É bem conhecido que a produção aumentada de ERO causa lipoperoxidação, resultando na formação de aldeídos reativos, como malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). O 4-HNE é um dos alcenais lipídicos mais bioativos e bem estudados [37, 38]. Sendo um composto anfílico, o 4-HNE tende a se concentrar em biomembranas, onde modifica covalentemente

a fosfatidiletanolamina (PE) para formar diferentes adutos 4-HNE-PE, o que resulta no aumento da permeabilidade de íons de sódio na membrana [37]. Além disso, o 4-HNE também pode reagir com proteínas de membrana, como transportadores, canais iônicos e receptores [39], especialmente devido à sua capacidade de ligação covalente a resíduos de Cisteína (Cys), Lisina (Lys) e Histidina (His) [39, 40]. Interessantemente, foi recentemente demonstrado que promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com a forma pura de 4-HNE sofreram rigidez na membrana plasmática, produzindo espectros de RPE de 5-DSA muito semelhantes aos encontrados aqui para parasitas tratados com MTF e AmB [41].

O alto grau de rigidez da membrana causado pelos dois medicamentos estudados no parasita *Leishmania* sugere a formação de ligações cruzadas entre as proteínas de membrana. Espectros de RPE de 5-DSA indicando níveis tão elevados de rigidez foram observados em eritrócitos oxidados com peróxido de hidrogênio e uso de azida como inibidor de catalase [42]. Após o tratamento de eritrócitos com  $200\mu M$  de  $H_2O_2$ , foram observados valores de até  $60G$  para o parâmetro  $2A_{||}$  [42]. No caso de eritrócitos oxidados com peróxido de hidrogênio, foi demonstrada a formação de ligações cruzadas entre hemoglobina e proteínas esqueléticas de eritrócitos humanos [43]. A espectroscopia de RPE com rótulos de spin mostrou ser uma ferramenta adequada para detectar lipoperoxidação e oxidação de proteínas em membranas biológicas [44]. Em membranas celulares, aumentos no parâmetro  $2A_{||}$  de até  $\sim 2G$  foram observados após a peroxidação lipídica [45, 46]. No entanto, para aumentos em  $2A_{||}$  de até  $\sim 6G$ , como os observados neste trabalho, a ocorrência de ligações cruzadas entre proteínas de membrana é muito provável [42].

## 5.5 A PRODUÇÃO AUMENTADA DE ERO PARECE SER UMA CONSEQUÊNCIA DO DESEQUILÍBRIO IÔNICO NA MEMBRANA PLASMÁTICA

Dignos de nota são os estudos sobre a atividade antileishmanial da ivermectina. É bem conhecido que a ivermectina ativa os canais de cloreto sensíveis ao glutamato no parasita, resultando em aumento do influxo de íons de cloreto e hiperpolarização da membrana plasmática [47, 48]. Com um valor de  $IC_{50}$  de  $\sim 4\mu M$  em *Leishmania infantum*, a ivermectina também causou despolarização do potencial da membrana mitocondrial e aumento nos níveis de ERO nos parasitas [1]. Outro estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a ivermectina se acumula em alta concentração na membrana plasmática do parasita promastigota *L. amazonensis* e que, após  $24h$  de tratamento, ela leva à rigidez da membrana, produzindo espectros de RPE de 5-DSA semelhantes aos encontrados aqui para tratamentos com MTF e AmB [49]. Esses resultados sugerem que MTF, assim como a ivermectina e a AmB, causam um desequilíbrio iônico na membrana plasmática do parasita *Leishmania*.

MTF é uma molécula anfifílica e zwitteriônica que, assim como detergentes iônicos, possui interações importantes com proteínas de membrana [50]. Além de suas possíveis interações com canais iônicos, suas interações na interface lipídio-proteína da membrana podem gerar

desordem na organização dos lipídios, promovendo a formação de poros e vazamento de eletrólitos. O desequilíbrio no potencial da membrana celular causado por MTF poderia afetar o potencial da membrana mitocondrial devido à interdependência entre esses dois potenciais. Nesse sentido, foi demonstrado que há um aumento abrupto na concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  em *L. donovani* após a adição de MTF [51].

#### 5.6 MTF E AMB NÃO INDUZIRAM RIGIDEZ DE MEMBRANA NO MACRÓFAGO J774A.1

Ao contrário do caso do parasita promastigota *L. amazonensis*, a rigidez da membrana não foi demonstrada ocorrer em macrófagos J774A.1 tratados com MTF ou AmB por 24 ou 48 horas. Como é bem sabido, os macrófagos são bons produtores de óxido nítrico (NO), que é utilizado para reduzir infecções. Foi demonstrado que o NO não apenas desempenha um papel na atividade antimicrobiana do macrófago, mas também pode restringir a entrada de outros fagócitos mononucleares nos tecidos infectados, o que permitiria a proliferação do patógeno [52]. O NO foi relatado por inibir a peroxidação lipídica por um mecanismo de quebra de cadeia antioxidante, onde reage rapidamente com intermediários LOO. e LO. para formar as espécies não radicais LOONO e LONO [53, 54]. Além disso, o NO pode reagir rapidamente com ânion superóxido para formar peroxinitrito. Essa reação pode resultar em uma diminuição na formação de ERO; no entanto, o peroxinitrito é um oxidante potente e versátil que pode reagir com ácidos graxos insaturados e, portanto, causar a iniciação da peroxidação lipídica [55, 56].

## 6 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

### 6.1 CONCLUSÃO

Os dados da espectroscopia RPE com marcadores de spin indicaram que tanto a MTF quanto a AmB induzem rigidez na membrana de *L. amazonensis* nas mesmas condições experimentais dos ensaios antiproliferativos, sendo observada rigidez nas mesmas concentrações de medicamento que inibem o crescimento do parasita. A rigidez da membrana foi atribuída ao estresse oxidativo gerado na célula a partir do aumento na formação interna de espécies reativas de oxigênio (ERO) promovido pelos medicamentos. No entanto, a rigidez da membrana induzida por estresse oxidativo não foi observada no macrófago *J774A.1*. Em vez disso, descobriu-se que a citotoxicidade ocorre no macrófago nas mesmas concentrações em que a MTF aumenta a fluidez e a AmB causa rigidez na membrana celular, indicando baixa toxicidade nas concentrações de  $IC_{50}$  nas duas drogas testada. Para medidas RPE logo após o tratamento de Leishmania, a MTF induz fluidez da membrana em vez de rigidez, e a concentração necessária é semelhante ao seu valor de  $IC_{50}$ . E, no caso da AmB, a rigidez da membrana é observada imediatamente após o tratamento, mas a uma concentração aproximadamente 100 vezes maior do que a que causa rigidez após 24h de tratamento. Nossa interpretação é que os mecanismos de ação das atividades antileishmaniais desses dois medicamentos estão associados aos seus efeitos primários na membrana celular, resultando em desequilíbrios iônicos.

### 6.2 PERSPECTIVAS

Este estudo marcou um avanço significativo na compreensão dos intrincados aspectos da membrana em promastigotas de *L. amazonensis* interagindo com as moléculas de MFT e AmB, bem como nos macrófagos. Os resultados obtidos são promissores e representam um passo importante na busca por novas moléculas com potencial terapêutico.

Na área da física médica, que é minha área de interesse, essas metodologias podem ser aplicadas para investigar os mecanismos de ação das radiações ionizantes em células cancerígenas. Isso sugere a possibilidade de estender essas abordagens analíticas para compreender melhor como agentes terapêuticos, como a radiação, afetam as propriedades da membrana celular em contextos relevantes para o tratamento do câncer. O conhecimento adquirido nessas investigações pode contribuir significativamente para o avanço da pesquisa em física médica e terapias contra o câncer.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Costa-da-Silva, A. C.; Nascimento, D. d. O.; Ferreira, J. R.; Guimarães-Pinto, K.; Freire-de-Lima, L.; Morrot, A.; Decote-Ricardo, D.; Filardy, A. A.; Freire-de-Lima, C. G. *Tropical medicine and infectious disease* **2022**, *7*, 54.
- (2) Torres-Guerrero, E.; Quintanilla-Cedillo, M. R.; Ruiz-Esmenjaud, J.; Arenas, R. *F1000Research* **2017**, *6*.
- (3) Christensen, S. M.; Belew, A. T.; El-Sayed, N. M.; Tafuri, W. L.; Silveira, F. T.; Mosser, D. M. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **2019**, *13*, e0007152.
- (4) Frézard, F.; Aguiar, M. M.; Ferreira, L. A.; Ramos, G. S.; Santos, T. T.; Borges, G. S.; Vallejos, V. M.; De Morais, H. L. *Pharmaceutics* **2022**, *15*, 99.
- (5) Sundar, S.; Chakravarty, J.; Meena, L. P. *Expert Opinion on Orphan Drugs* **2019**, *7*, 1–10.
- (6) Kumari, S.; Kumar, V.; Tiwari, R. K.; Ravidas, V.; Pandey, K.; Kumar, A. *Acta Tropica* **2022**, 106661.
- (7) Mann, S.; Frasca, K.; Scherrer, S.; Henao-Martinez, A. F.; Newman, S.; Ramanan, P.; Suarez, J. A. *Current tropical medicine reports* **2021**, *8*, 121–132.
- (8) Alonso, L.; Mendanha, S. A.; Gomes, R. S.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **2021**, *163*, 105859.
- (9) Sawaya, B. P.; Weihprecht, H.; Campbell, W.; Lorenz, J.; Webb, R. C.; Briggs, J.; Schnermann, J. et al. *The Journal of clinical investigation* **1991**, *87*, 2097–2107.
- (10) Sokol-Anderson, M. L.; Brajtburg, J.; Medoff, G. *Journal of Infectious Diseases* **1986**, *154*, 76–83.
- (11) SAÚDE., S. D. V. E. *Brasilia: Editora do Ministerio da Saude* **2007**.
- (12) Gontijo, B.; Carvalho, M. d. L. R. d. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **2003**, *36*, 71–80.
- (13) Lainson, R.; Shaw, J. J. et al., *Evolution, classification and geographical distribution*. Academic Press: 1987.
- (14) Shaw, J. et al. *Contributions to the knowledge of Diptera: a collection of articles on Diptera commemorating the life and work of Graham B. Fairchild*. **1999**, 503–517.
- (15) Shaw, J.; Lainson, R. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1975**, *69*, 323–335.
- (16) Chappuis, F.; Sundar, S.; Hailu, A.; Ghalib, H.; Rijal, S.; Peeling, R. W.; Alvar, J.; Boelaert, M. *Nature reviews microbiology* **2007**, *5*, 873–882.
- (17) SAÚDE., S. D. V. E. *Brasilia: Editora do Ministerio da Saude* **2011**.

- (18) Brasil; Brasil; da Saúde, M.; de Vigilância em Saúde, S.; de Vigilância Epidemiológica, D. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial, 2006.
- (19) Ross, R. *British medical journal* **1903**, 2, 1261.
- (20) Neves, D.; Melo, A.; Genaro, O.; Linardi, P. *Rio de Janeiro: Livraria Atheneu* **2016**.
- (21) Abragam, A.; Bleaney, B., *Electron paramagnetic resonance of transition ions*; Clarendon P.: 1970.
- (22) Swartz, H. M.; Bolton, J. R.; Borg, D. C. *(No Title)* **1972**.
- (23) Hagen, W. R., *Biomolecular EPR spectroscopy*; CRC press: 2008.
- (24) Brustolon, M.; Giamello, E., *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioners Toolkit*; John Wiley & Sons: 2009.
- (25) Perussi, J.; Ruggiero, A.; Tabak, M. *Quimica nova* **1985**, 8, 313–24.
- (26) Atkins, P. W.; De Paula, J., *Atkins quimica fisica*; 544 ATK; Editorial Médica Panamericana: 2008.
- (27) Coderch, L.; Fonollosa, J.; Pera, M.; Estelrich, J.; Maza, A.; Parra, J. *Journal of Controlled Release - J CONTROL RELEASE* **2000**, 68, 85–95.
- (28) Bleaney, B.; Abragam, A. *(No Title)* **1970**.
- (29) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Thomson Brooks/Cole, USA* **2007**.
- (30) Fernandes, K. S.; de Souza, P. E. N.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **2017**, 1859, 1–9.
- (31) Moreira, R. A.; Mendanha Neto, S. A.; Fernandes, K. S.; Matos, G. G. d.; Alonso, L.; Dorta, M. C. L.; Alonso, A. **2014**.
- (32) Alonso, L.; Cardoso, É. J. S.; Gomes, R. S.; Mendanha, S. A.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, 183, 110421.
- (33) Alonso, L.; Mendanha, S. A.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *The Journal of Physical Chemistry B* **2020**, 124, 10157–10165.
- (34) Borges, E. N.; Alonso, L.; Silveira, M. B.; Balbinot, R. B.; Nakamura, C. V.; da Rocha, A. L. B.; Arruda, E. L.; dos Santos, G. F.; Vaz, B. G.; Gomides, C. D. et al. *Journal of Molecular Structure* **2023**, 1292, 136123.
- (35) Scariot, D. B.; Britta, E. A.; Moreira, A. L.; Falzirolli, H.; Silva, C. C.; Ueda-Nakamura, T.; Dias-Filho, B. P.; Nakamura, C. V. *Frontiers in microbiology* **2017**, 8, 255.
- (36) Veronica, J.; Chandrasekaran, S.; Dayakar, A.; Devender, M.; Prajapati, V. K.; Sundar, S.; Maurya, R. *The FEBS Journal* **2019**, 286, 3488–3503.
- (37) Jovanović, O.; Škulj, S.; Pohl, E. E.; Vazdar, M. *Free Radical Biology and Medicine* **2019**, 143, 433–440.

- (38) Tounsi, N.; Djerdjouri, B.; Bouzid, C.; Bentabak, K. *Journal of Applied Biomedicine* **2019**, *17*.
- (39) Poli, G.; Schaur, R. J.; Siems, W. a.; Leonarduzzi, G. *Medicinal research reviews* **2008**, *28*, 569–631.
- (40) Jovanovic, O.; Pashkovskaya, A. A.; Annibal, A.; Vazdar, M.; Burchardt, N.; Sansone, A.; Gille, L.; Fedorova, M.; Ferreri, C.; Pohl, E. E. *Free Radical Biology and Medicine* **2015**, *89*, 1067–1076.
- (41) Alonso, L.; Menegatti, R.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *Toxicology in Vitro* **2022**, *79*, 105294.
- (42) Mendanha, S.; Anjos, J. L. V. d.; Silva, A. H. d. M.; Alonso, A. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **2012**, *45*, 473–481.
- (43) Snyder, L.; Fortier, N.; Trainor, J.; Jacobs, J.; Leb, L.; Lubin, B.; Chiu, D.; Shohet, S.; Mohandas, N. et al. *The Journal of clinical investigation* **1985**, *76*, 1971–1977.
- (44) Juan, C. A.; Pérez de la Lastra, J. M.; Plou, F. J.; Pérez-Lebeña, E. *International Journal of Molecular Sciences* **2021**, *22*, 4642.
- (45) Alonso, A.; Queiroz, C. S.; Magalhães, A. C. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* **1997**, *1323*, 75–84.
- (46) Chen, L.; Yang, X.; Jiao, H.; Zhao, B. *Toxicological sciences* **2002**, *69*, 149–156.
- (47) Kane, N. S.; Hirschberg, B.; Qian, S.; Hunt, D.; Thomas, B.; Brochu, R.; Ludmerer, S. W.; Zheng, Y.; Smith, M.; Arena, J. P. et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2000**, *97*, 13949–13954.
- (48) Priel, A.; Silberberg, S. D. *The Journal of general physiology* **2004**, *123*, 281–293.
- (49) Mesa-Arango, A. C.; Trevijano-Contador, N.; Román, E.; Sánchez-Fresneda, R.; Casas, C.; Herrero, E.; Argüelles, J. C.; Pla, J.; Cuenca-Estrella, M.; Zaragoza, O. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2014**, *58*, 6627–6638.
- (50) Alonso, L.; Cardoso, É. J. S.; Gomes, R. S.; Mendanha, S. A.; Dorta, M. L.; Alonso, A. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2019**, *183*, 110421.
- (51) Pinto-Martinez, A. K.; Rodriguez-Durán, J.; Serrano-Martin, X.; Hernandez-Rodriguez, V.; Benaim, G. *Antimicrobial agents and chemotherapy* **2018**, *62*, 10–1128.
- (52) Formaglio, P.; Alabdullah, M.; Siokis, A.; Handschuh, J.; Sauerland, I.; Fu, Y.; Krone, A.; Gintschel, P.; Stettin, J.; Heyde, S. et al. *Immunity* **2021**, *54*, 2724–2739.
- (53) Rubbo, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Telleri, R.; Kalyanaraman, B.; Barnes, S.; Kirk, M.; Freeman, B. A. *Journal of Biological Chemistry* **1994**, *269*, 26066–26075.
- (54) Girotti, A. W. *Photochemistry and Photobiology* **2021**, *97*, 653–663.
- (55) Wink, D. A.; Miranda, K. M.; Espey, M. G.; Pluta, R. M.; Hewett, S. J.; Colton, C.; Vitek, M.; Feelisch, M.; Grisham, M. B. *Antioxidants and redox signaling* **2001**, *3*, 203–213.

- (56) Pryor, W. A.; Squadrito, G. L. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **1995**, 268, L699–L722.