

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS**  
**INSTITUTO DE FÍSICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA**

**Estudo das Interações da Miltefosina com  
Membranas de *L. (Leishmania) amazonensis* e  
Macrófagos Peritoneais**

**KELLY DE SOUZA FERNANDES**

**GOIÂNIA**  
**2016**

**KELLY DE SOUZA FERNANDES**

**Estudo das Interações da Miltefosina com  
Membranas de *L. (Leishmania) amazonensis* e  
Macrófagos Peritoneais**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação do Instituto de Física da  
Universidade Federal de Goiás como requisito  
para obtenção do título de Doutora em Física.*

**Orientador: Prof. Dr. Antonio Alonso  
Co-orientadora: Profa. Dra. Miriam C. L. Dorta**

**GOIÂNIA**

**2016**

*Aos meus pais, Jany Fernandes e Eni Batista de Souza Fernandes, e ao meu amado, Marcus Carrião dos Santos.*

## Agradecimentos

- ✓ À minha mãe Eni Batista de Souza Fernandes e ao meu pai Jany Fernandes, pelo amor, paciência, confiança e por permitirem que eu seguisse o meu caminho da forma que escolhi;
- ✓ Ao Marcus Carrião dos Santos, meu amado companheiro e amigo, pelo carinho, confiança, paciência, conselhos, ajuda e incentivos, sem os quais eu não teria chegado até o fim;
- ✓ Ao professor Dr. Antonio Alonso pela oportunidade, paciência e por todos os ensinamentos científicos durante a realização deste trabalho;
- ✓ À professora Dr. Míriam Dorta, por nos receber tão bem em seu laboratório e nos deixar à vontade para a realização deste trabalho. Por toda a dedicação, paciência, carinho e ensinamentos, e principalmente pela confiança depositada em mim, a qual me ajudou a seguir em frente;
- ✓ À minha grande amiga Grazielle Guimarães, por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e confiança, os quais permitiram que este trabalho fosse realizado. Pela inestimável ajuda, carinho e amizade que, com certeza, foram fundamentais para continuar esta caminhada;
- ✓ Aos demais amigos do laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses do Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública, em especial a técnica Natália Brandão, pela amizade, confiança e grande ajuda na realização deste trabalho;
- ✓ Aos meus amigos do Laboratório de Biofísica, hoje professores, Dr. Sebastião Antônio Mendanha Neto e Dr. Rodrigo Alves Moreira, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho;
- ✓ A todos os professores do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (IF-UFG), por terem me proporcionado desenvolvimento e crescimento intelectual durante o curso de pós-graduação;
- ✓ Aos meus amigos do IF-UFG, pelo apoio e amizade;
- ✓ A todos os meus familiares e amigos, os quais, mesmo distantes, sempre me apoiaram e incentivaram a seguir em frente;
- ✓ Ao professor Dr. Paulo Souza, do IF-UNB, por ceder o laboratório de Ressonância Eletrônica e pela grande ajuda com as medidas de RPE;

- ✓ A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado;
- ✓ Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro;
- ✓ A Universidade Federal de Goiás (UFG) e ao Instituto de Física pelas oportunidades;

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

# Sumário

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b> .....	<b>x</b>
<b>Lista de Tabelas</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>xviii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xx</b>
<b>1 Introdução</b> .....	<b>21</b>
1.1 Considerações Gerais .....	21
1.2 Leishmaniose Tegumentar (LT).....	24
1.2.1 Manifestações clínicas.....	25
1.2.2 Agente etiológico .....	27
1.2.3 Diagnóstico.....	27
1.2.4 Tratamento .....	28
1.2.5 Combate.....	28
1.2.6 Ciclo de transmissão .....	29
1.3 Morfologia dos parasitos.....	30
1.4 Superfície celular da <i>Leishmania</i> .....	32
1.5 Macrófagos, suas funções e componentes.....	35
1.6 O parasito e sua interação com os macrófagos do hospedeiro.....	38
1.7 Miltefosina .....	41
<b>2 Objetivos</b> .....	<b>46</b>
2.1 Objetivos gerais.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
<b>3 Técnicas Experimentais</b> .....	<b>47</b>
3.1 Espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis (EAM) .....	47
3.1.1 Fundamentos da EAM.....	47
3.1.2 O espectrofotômetro .....	50
3.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE).....	52
3.2.1 Introdução .....	52
3.2.2 Princípios Básicos .....	52
3.2.3 RPE de onda contínua (RPE-OC).....	55
3.2.4 Relaxação e forma de linha do espectro.....	56
3.2.5 Interação Nuclear Hiperfina .....	59

3.2.6	O método de marcadores de spin.....	61
3.2.7	O espectrômetro de RPE.....	67
<b>4</b>	<b>Materiais e Métodos.....</b>	<b>70</b>
4.1	Reagentes Químicos .....	70
4.2	Parasitos .....	70
4.3	Obtenção e cultivo das amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	70
4.4	Curva de crescimento das amastigotas axênicas .....	71
4.5	Obtenção das células peritoneais .....	71
4.6	Preparação e marcação das amostras e tratamento com a MT .....	72
4.7	Lise e ruptura celular .....	74
4.8	Condições de operação do espectrômetro de RPE .....	75
4.9	Viabilidade celular pelo teste de MTT .....	75
4.10	Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano.....	76
4.11	Infecção dos macrófagos.....	77
4.12	Análise estatística.....	77
<b>5</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>78</b>
5.1	Protocolo para obtenção e manutenção das amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	78
5.2	Efeitos da MT nas membranas de <i>Leishmania</i> e macrófago analisados por RPE	80
5.2.1	Marcador de spin 5 – DSA.....	80
5.2.2	Marcador de spin MAL-6 .....	85
5.3	Lise celular .....	90
5.4	Viabilidade das <i>L. (L.) amazonensis</i> e macrófagos peritoneais pelo azul de tripano.....	96
5.5	Avaliação da citotoxicidade celular pelo teste de MTT .....	102
5.6	Ação da MT em macrófagos peritoneais infectados com parasitos <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	116
<b>6</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>129</b>
<b>8</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>131</b>
<b>9</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>132</b>
<b>Apêndice .....</b>		<b>146</b>
Artigos Publicados.....		146

## Lista de Abreviaturas

5-DSA - 5-DOXIL ácido esteárico

BCA - Ácido bicinconínico

DPPC - 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina

EAM UV/Vis - Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta/Visível

GP63 - Metaloprotease 60 kDa

GPI - Glicosilfosfatidilinositol

IC<sub>50</sub> - Concentração de inibição da proliferação de 50% de células

*L.(L.) amazonensis* - *L. (Leishmania) amazonensis*

LPG - Lipofosfoglicana

LT - Leishmaniose Tegumentar

LV - Leishmaniose Visceral

MAL-6 - 4-Maleimido-TEMPO

MT - Miltefosina

MTT - (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina

OMS - Organização Mundial de Saúde

PBS - Tampão Fosfato Salino

PPGs - Proteofosfoglicanas

RPE - Ressonância Paramagnética Eletrônica

RPE-OC - RPE de onda contínua

SFB - Soro Fetal Bovino

## Lista de Figuras

- Figura 1: Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea localizada de LT. (A) - mostra uma lesão única, exulcerada e fundo granuloso, com base eritematosa e infiltrada; (B) - lesões exulceradas, múltiplas, base eritematosa infiltrada, recoberta por crostas..... 25
- Figura 2: Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea disseminada de LT. Apresentam múltiplas lesões pequenas, pápulo-tuberosas, exulceradas. .... 26
- Figura 3: Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea difusa de LT. Em (A) o paciente estava com 6 anos de idade. A lesão se iniciou no primeiro ano de vida dele, apresentando lesão infiltrada em base de pirâmide nasal. Em (B), a mesma lesão após 17 anos de evolução, caracterizando a evolução crônica e a refratariedade a diversos esquemas terapêuticos. .... 26
- Figura 4: Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma mucosa de LT. As duas imagens apresentam a forma mucosa tardia, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial. .... 26
- Figura 5: Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*. Adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx). .... 30
- Figura 6: Diferentes formas evolutivas da *Leishmania*. A – Forma amastigota, que se desenvolve no vacúolo digestivo de macrófagos. B - Forma promastigota, predominante no intestino de insetos contaminados. .... 31
- Figura 7: Representação esquemática da superfície celular da *Leishmania*. A superfície celular das promastigotas apresenta várias classes de macromoléculas incluindo LPGs de alto peso molecular, glicoprotéínas (GP63) e PPGs ancorados a GPI. Abaixo dessas macromoléculas se encontra uma densa camada de GPIs livres. Nas amastigotas a expressão de macromoléculas ancoradas a GPI diminui, enquanto que o nível de expressão das GPIs livres é mantido. Figura adaptada de [45]..... 34
- Figura 8: Estrutura molecular da MT..... 42

Figura 9: Ligação e internalização da MT em parasitos *Leishmania*. Etapas sequenciais na acumulação da MT: A - ligação da MT no folheto externo da membrana plasmática. MT é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório do fármaco; B - a fração de MT que se liga à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade “flip-flop”. Esse maquinário de translocação inclui, no mínimo, duas proteínas da membrana, LdMT e LdRos3. Adaptado de [94]...... 44

Figura 10: Arranjo dos componentes básicos de um espectrofotômetro para medidas de absorvância. Adaptado de [111]. ..... 50

Figura 11: Sistema esquemático de um espectrofotômetro de feixe duplo. A radiação proveniente do filtro ou monocromador é dividida em dois feixes que passam, simultaneamente, pela célula de referência e da amostra antes de chegar aos dois detectores casados. Figura adaptada de [111]. ..... 51

Figura 12: O efeito Zeeman do spin eletrônico. Na ausência de campo magnético ( $B_0 = 0$ ) os estados de spin “up” e “down”, apresentam a mesma energia ( $E = 0$ ). Na presença do campo magnético estático ( $B_0 \neq 0$ ), há a quebra da degenerescência em dois níveis de energia distintos. A diferença de energia entre os níveis é proporcional à intensidade do campo magnético. Adaptado de [117]. ..... 54

Figura 13: Curva de absorção de sua primeira derivada..... 58

Figura 14: Estrutura molecular geral do radical nitróxido.  $R_1$  e  $R_2$  representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin. .... 62

Figura 15: Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido (N-O) na presença de um campo magnético aplicado. O desdobramento dos níveis de energia é causado pela interação entre o momento magnético eletrônico e nuclear do átomo de nitrogênio. .... 62

Figura 16: (A) Espectro de absorção do radical nitróxido; (B) Primeira derivada da curva de absorção.  $g$  define a posição da linha central e  $a$  a constante de desdobramento hiperfino..... 63

Figura 17: Sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando os ângulos formados entre a direção do campo magnético externo  $B$  e os eixos de coordenadas do nitróxido. .... 64

Figura 18: Espectro de RPE de um marcador de spin lipídico obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais  $2A_{//}$  e  $2A_{\perp}$ .  
..... 66

Figura 19: Marcador de spin lipídico 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5º carbono da cadeia acil e o marcador de proteína MAL-6.  
..... 67

Figura 20: Efeito do campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 KHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático B é modulado entre os limites  $B_a$  e  $B_b$ , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites  $i_a$  e  $i_b$ . O diagrama mostra o sinal de 100 KHz registrado e retificado em função de B. Adaptado de [113].  
..... 69

Figura 21: Desenho esquemático de um espectrômetro de RPE típico de banda X. Adaptado de [128].  
..... 69

Figura 22: Amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). Promastigotas cultivadas a 26°C em meio Grace completo foram coletadas na fase estacionária de crescimento e colocadas novamente em cultura em meio Grace - 20% de SFB, pH 5,5 a 32 °C. As imagens foram obtidas no sétimo (A) e décimo (B) dias de cultura por coloração panótico através de um microscópio óptico.  
..... 79

Figura 23: Curva de crescimento *in vitro* das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). Os parasitos foram cultivados em meio Grace completo a 32°C, iniciando-se a cultura com  $5 \times 10^6$  parasitos/mL. A quantificação das leishmânias foi realizada pela contagem diária (12 dias) em hematocítômetro utilizando um microscópio óptico. Os dados representam as médias e desvios padrões de seis curvas independentes. .... 80

Figura 24: (A) - Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT; (B) – Valor do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador 5-DSA em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em tampão fosfato salino (PBS), foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. Todas as amostras são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $0,89 \times 10^9$  MT/parasito com  $P < 0,01$ .  
..... 81

Figura 25: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de macrófagos tratadas e não tratadas com MT. (B) - Parâmetro  $2A_{//}$  do marcador 5-DSA em função da concentração de MT. As amostras já

marcadas, nas concentrações de  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações iguais ou maiores a  $1,26 \times 10^{10}$  MT/macrófago são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $4,23 \times 10^{10}$  MT/macrófago com  $P < 0,01$ . ..... 82

Figura 26: Interação da MT com membranas de *L. (L.) amazonensis* nas formas amastigota e promastigota e membranas de macrófagos peritoneais. A interação foi avaliada através do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador de spin lipídico 5-D<sub>5</sub>. Em (A) a concentração de MT foi calculada em número de moléculas por célula e em (B) em concentração molar (mM)..... 84

Figura 27: (A) Espectro de RPE a 25 °C do marcador de spin MAL-6 ligado aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana da *L. (L.) amazonensis*. (B) As componentes espectrais fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas obtidas a partir da simulação pelo programa NLLS [136], a qual foi feita usando um modelo de duas componentes espectrais. Os parâmetros, desdobramento hiperfino isotrópico ( $2a_0$ ) e  $2A_{//}$  estão indicados em (A). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G..... 85

Figura 28: Modelo molecular esquemático ilustrando o marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente ao grupo sulfidrilas da proteína. O radical nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (W). Os dois átomos de oxigênio do anel maleimido também podem formar ligações de hidrogênio com a cadeia polipeptídica, como indicado na figura [136]. ..... 86

Figura 29: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT; (B) – Parâmetro  $2A_{//}$  do marcador MAL-6 em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações maiores ou iguais a  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,01$ ..... 87

Figura 30: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana de macrófagos tratadas e não tratadas com MT; (B) – Parâmetro  $2A_{//}$  do marcador MAL-6 em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações maiores ou iguais a  $1,26$

$\times 10^{10}$  MT/macrófago são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $4,23 \times 10^{10}$  MT/macrófago com  $P < 0,01$ . ..... 89

Figura 31: Interação da MT com membranas de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e com membranas de macrófagos. A interação foi avaliada através do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador de spin MAL-6, o qual se liga covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana. Em (A) a concentração de MT está expressa em MT/célula e em (B) em concentração molar..... 90

Figura 32: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente a grupos sulfidrilas das proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras de membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT. (B) - Porcentagem de lise celular (quadrados fechados) e fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante das amostras de *L. (L.) amazonensis* (quadrados abertos) em função da concentração de MT. A concentração de células utilizada foi de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em PBS. As medições de lise foram feitas pelo conteúdo de proteína no sobrenadante das amostras através da reação do ácido bicinconínico (BCA). O sinal de RPE é proporcional à quantidade de fragmentos de membrana no sobrenadante das amostras. .... 91

Figura 33: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalente a grupos sulfidrilas das proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras de membrana das células peritoneais tratadas e não tratadas com MT. (B) - Porcentagem de lise celular (triângulos fechados) e fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante das amostras de células peritoneais (triângulos abertos) em função da concentração de MT. A concentração de células utilizada foi de  $7 \times 10^7$  células/mL em PBS. As medições de lise foram feitas pela quantificação de proteína no sobrenadante das amostras através da reação do ácido bicinconínico (BCA). O sinal de RPE é proporcional à quantidade de fragmentos de membrana no sobrenadante das amostras. .... 93

Figura 34: Porcentagem de lise celular em função da concentração de MT das amostras de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e dos macrófagos peritoneais. Em (A) a concentração de MT foi dada em número de MT/célula e em (B) em concentração molar..... 94

Figura 35: Fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante de amostras de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e de macrófagos peritoneais, em função da concentração de MT. Em (A) a concentração de MT foi dada em número de MT/célula e em (B) em concentração molar..... 95

Figura 36: Contagem de células viáveis nas amostras de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (A) e nas amostras de macrófagos peritoneais (B) pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram tratadas com as concentrações requeridas de MT e a contagem realizada após 5 minutos do tratamento. As concentrações celulares utilizadas foram de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL e  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em meio completo com 10% de SFB. 96

Figura 37: Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano. As *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e os macrófagos peritoneais foram tratados com as concentrações requeridas de MT. A contagem das células viáveis foi feita após 5 minutos do tratamento. Em (A) a concentração de MT foi calculada em MT/célula e em (B) em concentração molar..... 97

Figura 38: Imagens obtidas das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* a partir de uma câmera acoplada a um microscópio óptico. Os parasitos foram tratados com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada. .... 99

Figura 39: Imagens obtidas de macrófagos peritoneais usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com  $0,63 \times 10^{10}$  MT/macrófago e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada. .... 100

Figura 40: Imagens obtidas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. Os parasitos foram tratados com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada. .... 101

Figura 41: Histogramas de distribuição das dimensões das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (A), macrófagos (B) e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (C). A análise foi realizada em 100 células de cada espécie. O ajuste foi feito utilizando distribuições do tipo Log-normal..... 106

Figura 42: Dados experimentais e curvas teóricas calculadas a partir da equação 5.3 para a concentração de MT na suspensão ( $c_{sus}$ ) que provoca a morte de 50% das amastigotas (A), dos macrófagos (B) e das promastigotas (C), em função de  $V_w/V_m$  na suspensão. Os pontos e curvas na cor preta são das amostras em meio contendo 10% de SFB e na cor vermelha em meio sem SFB. .... 107

Figura 43: Concentração de MT expressa em  $\mu\text{M}$  versus a concentração celular dada em células/mL. No painel (A) os dados e curvas teóricas são referentes

aos parasitos amastigotas, no painel (B) aos macrófagos e no painel (C) aos promastigotas. Os pontos e curvas na cor preta são das amostras em meio contendo 10% de SFB e na cor vermelha em meio sem SFB. .... 110

Figura 44: Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). As amostras, nas concentrações de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL em meio Grace completo sem SFB, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e incubadas por 1 hora a 32°C. Em seguida, foram marcadas e então transferidas a capilares para as medidas de RPE. .... 115

Figura 45: Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 2 horas a 37°C em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As duas primeiras fotografias referem-se à amostra não tratada. As células foram coradas utilizando a coloração panótico. .... 118

Figura 46: Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 2 horas a 37°C em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico. .... 119

Figura 47: Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 10 min a 37°C em meio RPMI sem SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico. .... 120

Figura 48: Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 30 min a 37°C em meio RPMI sem SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico. .... 121

## Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeito da MT contra amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (teste do MTT)..... 103

Tabela 2: Parâmetros biofísicos relacionados à ação da MT nas membranas das amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e eritrócitos. .... 111

Tabela 3: Comparação entre as concentrações estimadas do IC<sub>50</sub> da MT para as concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/ml e  $7 \times 10^7$  macrófagos/ml com as concentrações de MT que provocaram alterações significativas com  $P < 0,05$  na dinâmica das membranas avaliadas por RPE, lise e viabilidade celular. ... 113

## Resumo

A Miltefosina (MT) é um alquilfosfolípido originalmente desenvolvido para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos. Atualmente é utilizada no tratamento da leishmaniose, uma doença infecto-parasitária causada pelo protozoário do gênero *Leishmania*, sendo o primeiro fármaco de uso oral aprovado para tal fim. No entanto, seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de um marcador de spin lipídico (5-DOXIL estearato) e outro específico de grupo tiol (4-maleimido-TEMPO) na membrana de amastigotas axênicas de *L. (Leishmania) amazonensis* e de macrófagos extraídos de peritônio de camundongos BALB/c, mostrou que a MT causa um aumento significativo na dinâmica destas membranas para concentrações similares àquelas que inibem o crescimento do parasito ou que são citotóxicas ao macrófago. Embora essas alterações possam ser detectadas usando um marcador de spin lipídico, nossos resultados experimentais indicaram que a MT interage predominantemente com a componente proteica da membrana. Utilizando um método para incorporação rápida da MT na membrana, esses efeitos foram medidos imediatamente após o tratamento. Ensaio de citotoxicidade, estimada via contagem microscópica de células vivas e mortas, indicaram que ~80% dos parasitos e dos macrófagos estão mortos na concentração de MT no qual a espectroscopia de RPE detectou uma mudança significativa na dinâmica da membrana. A viabilidade celular, quantificada pela redução do sal MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina), mostrou que a concentração de MT que inibe 50% da proliferação celular ( $IC_{50}$ ) depende da concentração celular usada no ensaio. Esta dependência foi analisada utilizando uma equação teórica envolvendo parâmetros biofísicos tais como o coeficiente de partição membrana-água e concentrações de MT na membrana e no meio aquoso. Os dados mostraram que as células mais sensíveis à MT são respectivamente: eritrócitos, formas promastigotas e amastigotas da *Leishmania* e macrófagos. O valor do  $IC_{50}$  da MT para  $4 \times 10^7$  parasitos/mL foi de 24,35  $\mu$ M. Para esta mesma concentração de células, foi detectada uma alteração significativa na fluidez lipídica da membrana dos parasitos com 15

$\mu\text{M}$  de MT. Os espectros de RPE do marcador de spin ligados a proteínas da membrana foram consistentes com as conformações mais expandidas e dinâmicas das proteínas expostas no solvente, sugerindo uma ação semelhante à de detergente, com uma possível formação de estruturas tipo micelas em volta das cadeias polipeptídicas.

## Abstract

Miltefosine (MT) is a alkylphospholipid originally developed for treatment of breast cancer and other solid tumors. It is currently used in the treatment of leishmaniasis, an infectious parasitic disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, being the first oral drug adopted for this purpose. However, its mechanism of action remains unclear. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of a spin-labeled lipid (5-DOXIL stearate) and a thiol-specific spin label (4-maleimido-TEMPO) in the membrane of axenic amastigotes of *L.(Leishmania) amazonensis* and peritoneal macrophages from Balb/c mice showed that MT causes significant increase in membrane dynamics at similar concentrations that inhibit parasite growth or are cytotoxic to macrophage. Although these alterations can be detected using a spin-labeled lipid, our experimental results indicated that MT interacts predominantly with the protein component of the membrane. Using a method for the rapid incorporation of MT into the membrane, these effects were measured immediately after treatment. Cytotoxicity, estimated via microscopic counting of living and dead cells, indicated ~80% parasites and macrophages death at the concentration of MT at which EPR spectroscopy detected a significant change in membrane dynamics. Cell viability, analyzed using the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide tetrazolium) reduction assay, showed that 50% inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of MT depends on the cell concentration used in the assay. This dependence was analyzed using a theoretical equation involving biophysical parameters such as the partition coefficient of water-membrane and MT concentrations on the membrane and in the aqueous medium. The data showed that cells more sensitive to MT are respectively: erythrocytes, *Leishmania* promastigotes and *Leishmania* amastigotes and macrophage. The IC<sub>50</sub> value of MT for  $4 \times 10^7$  parasites/mL was 24,35  $\mu$ M. For the same cell concentration, a significant alteration was detected in the membrane lipid fluidity of parasites to 15  $\mu$ M of MT. The EPR spectra of spin-labeled membrane-bound proteins were consistent with more expanded and solvent exposed protein conformations, suggesting a detergent-like action, with a possible formation of micelle-like structures around polypeptide chains.

# 1 Introdução

## 1.1 Considerações Gerais

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública. Representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica [1]. São causadas pelos parasitos protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*. As doenças são transmitidas aos seres humanos pela picada de insetos hematófagos fêmeas de flebotomíneos infectados e apresentam principalmente três formas clínicas: i) visceral, a qual leva a um comprometimento do fígado, baço e medula óssea - forma mais séria da doença; ii) cutânea, que acomete a pele - forma mais comum e iii) mucocutânea, compromete pele e mucosas. Desta forma, existem 2 tipos de leishmaniose, a Leishmaniose Tegumentar (LT) responsável pelas formas cutânea e mucocutânea e Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como Calazar, responsável pela forma visceralizante [1].

A leishmaniose afeta principalmente as populações pobres da África, Ásia e América Latina, estando associada à desnutrição, deslocamento da população, condições precárias de habitação e a indivíduos imunocomprometidos. Além das questões ambientais como desmatamento, construção de barragens, sistemas de irrigação e urbanização [2].

Uma análise recente mostrou que mais de 98 países e territórios são endêmicos para leishmaniose. Estima-se que 1,3 milhão de novos casos, sendo 0,2 a 0,4 milhão de LV e 0,7 a 1,2 milhão LT, ocorrem a cada ano em todo o mundo e 20.000 a 30.000 casos resultam em morte. Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. A LT é distribuída de forma mais ampla, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em três regiões epidemiológicas: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia ocidental. Os dez países com a maior quantidade de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e, juntos, representam de 70 a 75% da incidência global de LT [2].

Existem aproximadamente 25 compostos que apresentam efeito leishmanicida, mas somente alguns deles são tidos como fármacos e usados por humanos, sendo estas, na sua maioria, parenterais [3]. A Miltefosina (MT) foi o primeiro fármaco oral aprovado para uso no tratamento de LV e LT, sendo liberada para uso humano na Índia, Alemanha e Colômbia [4] e mais recentemente nos Estados Unidos [5]. Este fármaco mostrou altas taxas de cura no tratamento das leishmanioses, tanto LV [6] como LT [7, 8].

A MT foi originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer de mama e outros tumores sólidos [9]. Portanto, é utilizada clinicamente para o tratamento de metástase cutânea associada ao câncer de mama e linfoma cutâneo [10]. Embora muitos estudos tivessem sido conduzidos para identificar os mecanismos de ação da MT contra células tumorais [10] e parasitos [11], estes mecanismos ainda não são bem compreendidos. No entanto, devido sua estrutura química, a MT possui uma alta afinidade por membranas, e por isso, tem-se pensado que os primeiros alvos moleculares deste fármaco se encontram em nível da membrana plasmática [10,12].

A espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) de vários marcadores de spin de ácidos graxos foi recentemente utilizada para demonstrar que a adição da MT nas concentrações de até 25% mol em vesículas de 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC) submetidas a um rigoroso processo de extrusão, não altera a dinâmica dos lipídios das vesículas [13]. Além disso, foi mostrado que a MT causa um aumento considerável na fluidez dos lipídios das membranas de estrato córneo, camada mais externa da pele, quando medida diretamente no tecido. O mesmo não acontece nas membranas modelo de estrato córneo, vesículas preparadas com lipídeos comerciais que representam as três principais classes de lipídios desta membrana, ceramida de cérebro bovino, ácido beénico e colesterol na razão, molar de 2:1:1. Neste sistema, a MT provoca apenas uma alteração discreta na fluidez dos lipídios [13]. Estudos mostraram que a MT também causa um aumento drástico na fluidez dos lipídios e proteínas das membranas “ghosts” e membranas resistentes a detergentes, ambas de eritrócitos [14]. O mesmo acontece nas membranas plasmáticas de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (*L.(L.) amazonensis*). Neste caso, a MT aumenta a dinâmica da membrana dos parasitos nas mesmas concentrações que inibe o

seu crescimento e causa lise celular. Um método eficiente de incorporação da MT na membrana das leishmânias foi desenvolvido, permitindo a detecção dos efeitos provocados por ela sem nenhum período de incubação [15].

Nota-se que estes estudos investigam a interação da MT com membranas modelos (lipídicas) e celulares, inclusive com as membranas dos parasitos responsáveis por causar a leishmaniose. Porém, esses últimos foram feitos com parasitos na forma promastigota, e essa forma, apesar de estar diretamente ligada à doença, não é a forma presente no hospedeiro vertebrado, após a infecção. Ao picar um hospedeiro vertebrado, a fêmea do flebotomíneo infectada injeta neste, formas promastigotas metacíclicas. Essas formas infectarão rapidamente as células do sistema fagocítico mononucleares (macrófagos), diferenciando-se em formas amastigotas [16]. As amastigotas sobrevivem e se replicam por divisão binária no ambiente ácido do fagolisossomo. À medida que vão se multiplicando, as células infectadas são lisadas e as formas amastigotas são liberadas a fim de parasitar novas células [17]. Embora a infecção inicial possa não resultar em sintomas clínicos, o parasitismo intracelular da *Leishmania* no organismo pode persistir em um curso crônico localizado ou difundido para tecido mucocutâneo ou órgãos viscerais, resultando na doença propriamente dita.

No presente estudo, com o objetivo de conhecer melhor o mecanismo de ação da MT, será demonstrado o seu efeito sobre as membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos extraídos do peritônio de camundongo Balb/c utilizando a espectroscopia de RPE de dois marcadores de spin, 5-DOXIL ácido esteárico (5-DSA) e 4-Maleimido-TEMPO (MAL-6). Além disso, será analisada a lise e a viabilidade celular tanto dos parasitos como dos macrófagos tratados com as mesmas concentrações de MT utilizadas nos experimentos de RPE. A viabilidade será analisada por dois métodos - contagem de células vivas e mortas utilizando o azul de tripano e pelo teste do MTT ((3-4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5 difenil brometo de tetrazolina). E para finalizar, serão observados, através de imagens obtidas com microscópio óptico, macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com MT, a fim de investigar se a ação da MT é primeiramente nos macrófagos, ou se, de alguma forma, a MT atravessa-os e atinge os parasitos, matando-os ali dentro, sem destruir essas células hospedeiras. É importante ressaltar que a doença

diretamente relacionada a este trabalho é a LT, devido à espécie de parasito utilizada, *L. (L.) amazonensis*.

## 1.2 Leishmaniose Tegumentar (LT)

A LT é um conjunto de enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, da família *Trypanosomatidae*, do gênero *Leishmania*. É uma doença infecciosa crônica, não contagiosa, caracterizada pelo comprometimento cutâneo, mucoso e, em raras situações, linfonodal de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais, do Velho e Novo Mundo, e eventualmente o homem. Nas Américas, são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de insetos denominados flebotomíneos, pertencentes à Ordem Díptera, Família *Psychodidae*, Subfamília *Phlebotominae* dos gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*. A infecção caracteriza-se pelo parasitismo das células fagocitárias de mamíferos, especialmente de macrófagos [18].

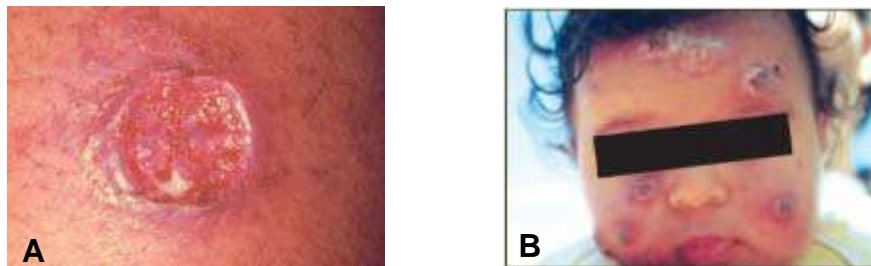
Estudos epidemiológicos mostram que anualmente mais de 1,5 milhões de pessoas são infectadas e cerca de 350 milhões de pessoas no mundo correm o risco de contrair a doença [19]. A LT constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia) e, por causa dos altos índices de mortalidade e morbidade, é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo [1,2]. No Brasil, a doença é considerada de notificação compulsória, estando presente em todos os estados brasileiros, principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, com incidência anual de mais de 23.000 novos casos [20].

Não só no Brasil, assim como em outros países do Novo Mundo, a LT constitui problema de Saúde Pública. Sua importância reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição geográfica, mas também na possibilidade de assumir formas que podem determinar lesões destrutivas, desfigurantes e também incapacitantes, com grande repercussão no campo psicossocial do indivíduo [21].

### 1.2.1 Manifestações clínicas

Na LT, a infecção pode se manifestar de três formas comuns: a leishmaniose cutânea (localizada ou disseminada), leishmaniose mucocutânea e a leishmaniose cutânea difusa. Estas podem apresentar uma variedade de manifestações clínicas diferentes [22], as quais são determinadas pelas características do hospedeiro, da espécie da leishmânia envolvida e da resposta imune do indivíduo infectado [23].

A leishmaniose cutânea localizada pode ocorrer como lesão única ou múltipla (Figura 1), na mesma região da picada do vetor ou nos pontos das picadas infectantes. A lesão é geralmente ulcerosa, com tendência à cura espontânea [18].



**Figura 1: Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea localizada de LT. (A) - mostra uma lesão única, exulcerada e fundo granuloso, com base eritematosa e infiltrada; (B) - lesões exulceradas, múltiplas, base eritematosa infiltrada, recoberta por crostas.**

A forma cutânea disseminada ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito. As lesões (Figura 2) são numerosas e distantes do local da picada, distribuindo-se por diversas áreas do corpo; em geral, são pequenas e ulceradas, podem ter diversos tamanhos [18].

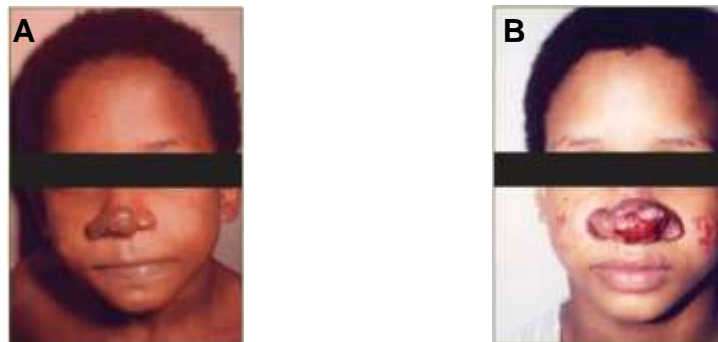
A leishmaniose cutânea difusa constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorrem em pacientes com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia-se de maneira insidiosa, com lesão única e má resposta ao tratamento (Figura 3); evolui de forma lenta, com formação de placas infiltradas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrendo grandes extensões cutâneas [18].

A forma mucosa ou mucocutânea da LT (Figura 4) é geralmente causada por disseminação hematogênica dos parasitos para as mucosas

nasais, orofaringe, palato, lábios, língua, laringe e, excepcionalmente, traqueia e árvore respiratória superior. É, na maioria das vezes, secundária às lesões cutâneas, surgindo geralmente meses ou anos após a resolução das lesões de pele [24].



**Figura 2:** Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea disseminada de LT. Apresentam múltiplas lesões pequenas, pápulo-tuberosas, exulceradas.



**Figura 3:** Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma cutânea difusa de LT. Em (A) o paciente estava com 6 anos de idade. A lesão se iniciou no primeiro ano de vida dele, apresentando lesão infiltrada em base de pirâmide nasal. Em (B), a mesma lesão após 17 anos de evolução, caracterizando a evolução crônica e a refratariedade a diversos esquemas terapêuticos.



**Figura 4:** Fotografias extraídas do Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana [18] da forma mucosa de LT. As duas imagens apresentam a forma mucosa tardia, com infecção secundária e destruição parcial da região nasolabial.

### 1.2.2 Agente etiológico

No Brasil, há diferentes espécies de *Leishmania* que são responsáveis pela LT, as três mais importantes são as *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* [18]. A *Leishmania (Viannia) guyanensis* causa predominantemente lesões ulceradas cutâneas únicas ou múltiplas, sendo esta última uma consequência de picadas simultâneas de vários flebótomos infectados ou metástases linfáticas secundárias. É muito raro o comprometimento mucoso por esta espécie [1]. Os parasitos se encontram no norte da Bacia Amazônica (Amapá, Roraima, Amazonas e Pará) e, estendendo-se pelas Guianas, é encontrada principalmente em florestas de terra firme [24].

A *Leishmania (Viannia) braziliensis* causa lesões cutâneas e mucosas metastáticas [18]. Foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LT [1]. Tem ampla distribuição, do sul do Pará ao Nordeste, atingindo também o centro sul do país e algumas áreas da Amazônia Oriental.

A *L. (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas em indivíduos com deficiência imunológica inata [18]. Os parasitos estão presentes nas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás), provavelmente associada a ciclos enzoóticos de matas residuais [24].

### 1.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da leishmaniose é feito com base nos resultados de exames laboratoriais, em conjunto com exames clínicos e dados epidemiológicos. Contudo, o diagnóstico definitivo requer exames parasitológicos, imunológicos e moleculares. Os exames parasitológicos tem como finalidade a demonstração do parasito obtido pela visualização das formas amastigotas em esfregações ou impressões por aposição, seja de

biópsias, escarificações ou de aspirado de lesão. Os exames imunológicos incluem a intradermoreação de Montenegro (IDRM) e teste sorológico (imunofluorescência indireta). E os exames moleculares incluem a reação em cadeia da polimerase (PCR) [24,25].

#### **1.2.4 Tratamento**

O primeiro fármaco que se mostrou eficaz contra *Leishmania* foi a ureastibamina (composto antimonial). Sua atividade leishmanicida contra *Leishmania donovani* foi descoberta em 1922 por Brahmchari da Índia. Esta descoberta salvou milhões de vidas de Indianos e levou o Prof. Brahmchari a indicação ao Prêmio Nobel em 1929. Mais tarde, o refinamento e o desenvolvimento de antimoniais pentavalentes reduziram os efeitos colaterais, e esses compostos são, ainda hoje, os mais utilizados no tratamento de todas as formas de *Leishmania* [3]. Porém, a resistência a esse tipo de fármaco tem aumentado em algumas partes do mundo (particularmente no nordeste da Índia) e tornando-os rapidamente obsoletos [26]. Embora bastante eficazes, os antimoniais pentavalentes apresentam algumas limitações ao seu uso como administração venosa, toxicidade elevada, tempo de cicatrização prolongado, ocorrência frequente de efeitos colaterais e alto custo [27]. Como medicamentos de segunda escolha estão a pentamidina e a anfotericina B, mas estes fármacos não são muito utilizados devido a sua toxicidade e custo [28]. A MT foi o primeiro fármaco oral a tratar com sucesso as formas mucosas e cutâneas de LT. Fármacos orais são muito convenientes, pois eliminam a necessidade de internação diminuindo os custos relacionados a esta e possibilitando a continuidade do tratamento em casa [8,29].

#### **1.2.5 Combate**

Em virtude das características epidemiológicas da LT, as estratégias de controle devem ser flexíveis, distintas e adequadas a cada região ou foco em particular [24]. Mas no geral, o controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor e no controle de animais

reservatórios de parasitos em áreas peri-domiciliares, bem como no tratamento dos indivíduos infectados [30].

### 1.2.6 Ciclo de transmissão

O ciclo de transmissão da LT (Figura 5) apresenta características específicas de cada região endêmica, pois depende das espécies dos parasitos, vetores, reservatórios e hospedeiros envolvidos [1].

O ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania* é heteroxênico, isto é, alternando-se entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. De acordo com a fase do ciclo de vida, o parasito pode apresentar duas formas evolutivas: promastigotas, formas alongadas e com flagelos, encontradas no tubo digestivo dos vetores invertebrados; e amastigotas, formas arredondadas e sem flagelo aparente, encontradas no interior de células do sistema fagocítico de hospedeiros vertebrados [31].

Ao picar um hospedeiro vertebrado infectado, no momento do repasto sanguíneo, a fêmea do vetor ingere células parasitadas com formas amastigotas contidas no tecido do hospedeiro vertebrado [31]. No intestino do vetor, as células se rompem e as formas amastigotas liberadas se diferenciam em formas promastigotas procíclicas (forma não infectante), que por processos sucessivos de divisão, multiplicam-se. Após um período de 4 a 7 dias, os parasitos cessam a divisão e se diferenciam em promastigotas metacíclicas (formas infectantes), que perdem a capacidade de se fixarem à parede do intestino do inseto e migram para as glândulas salivares [25]. Durante um novo repasto sanguíneo, a fêmea infectada irá regurgitar as formas promastigotas, juntamente com sua saliva, dentro da pele do hospedeiro vertebrado. Neste hospedeiro, essas formas infectarão rapidamente células do sistema fagocítico, diferenciando-se em formas desprovidas de flagelo, as amastigotas [16]. Estas formas sobrevivem e se replicam por divisão binária no ambiente ácido do fagolisossomo [31]. À medida que vão se multiplicando, as células infectadas são lisadas e as amastigotas liberadas podem parasitar novas células [17]. A evolução da infecção dependerá do perfil imunogenético humano, fortemente associado à resposta imune celular, e da virulência da espécie de *Leishmania*

infectante [32]. Nesse sentido, a patogenia da doença será definida em consequência do tipo de interação entre a espécie de *Leishmania* e o perfil imunogenético do hospedeiro (*Leishmania*/macrófagos), da qual resultarão as diferentes formas clínicas da LT [33].

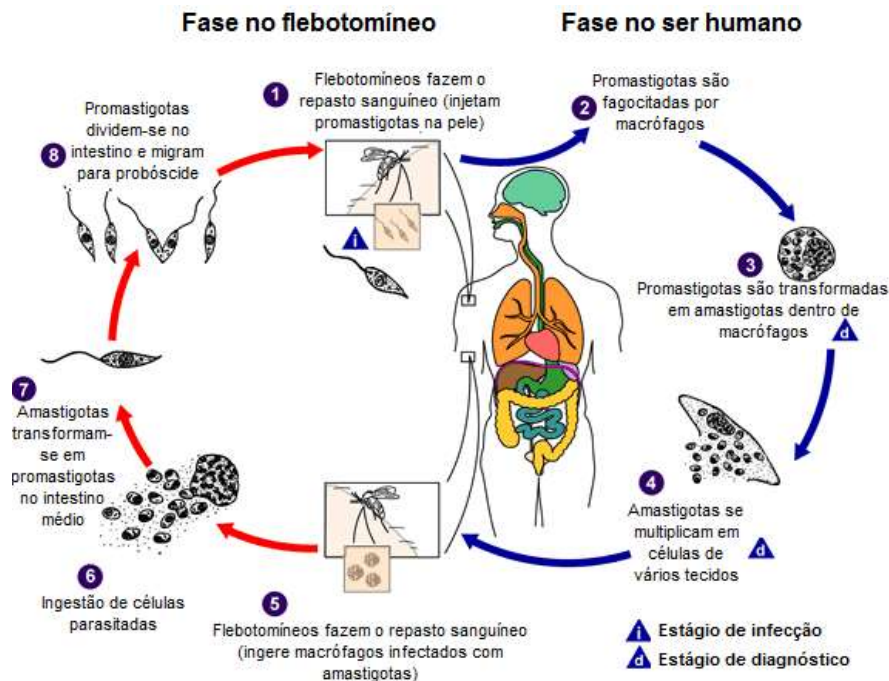


Figura 5: Ciclo biológico dos protozoários do gênero *Leishmania*. Adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

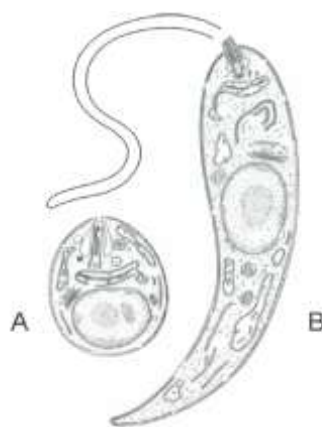
### 1.3 Morfologia dos parasitos

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem características morfológicas e moleculares diferentes de acordo com seu hospedeiro [34]. As formas flageladas conhecidas como promastigotas são encontradas no intestino do vetor invertebrado. Estas formas são alongadas com flagelo livre e longo, o qual emerge do corpo do parasito na sua porção anterior. No citoplasma encontram-se pequenos vacúolos. O núcleo é arredondado ou oval, e está situado na região mediana ou ligeiramente na porção anterior do corpo. O cinetoplasto, em forma de bastão, localiza-se na posição mediana entre a extremidade anterior e o núcleo. O tamanho das promastigotas é variável, inclusive dentro de uma mesma espécie, seja no tubo digestivo do inseto vetor ou em cultura, medindo entre 16,0 a 40,0  $\mu\text{m}$  de comprimento x 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$

de largura, incluindo o flagelo que frequentemente é maior que o corpo [35]. As formas promastigotas apresentam duas populações distintas: as procíclicas, fase em que há um crescimento exponencial do número de parasitos no interior do intestino, e as metacíclicas, fase estacionária de crescimento [36]. As promastigotas metacíclicas são as formas infectantes para os hospedeiros vertebrados, possuem o diâmetro do corpo nos menores limites apresentados pelos promastigotas e flagelo muito longo, cerca de duas vezes o comprimento do corpo. Possuem mobilidade intensa e são encontrados livres nas porções anteriores do trato digestivo do inseto, podendo migrar para a probóscide, e assim infectar um novo hospedeiro vertebrado [35].

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas metacíclicas infectarão as células do sistema fagocítico onde serão transformadas em amastigotas. Estas apresentam formas ovais ou esféricas. No citoplasma se encontra um núcleo grande e arredondado e o cinetoplasto em forma de um pequeno bastonete, além de vacúolos. Não apresentam flagelos livres, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, uma pequena invaginação da superfície do parasito. O tamanho varia de acordo com a espécie, medindo entre 1,5 a 3,0 x 3,0 a 6,5  $\mu\text{m}$  [35].

As promastigotas se diferenciam das amastigotas (Figura 6) essencialmente pelo prolongamento do flagelo, que se exterioriza para além da bolsa flagelar. Estruturas de membrana, núcleo, cinetoplasto e organelas citoplasmáticas (aparelho de Golgi, vacúolos, retículo endoplasmático, entre outros) são semelhantes [35].



**Figura 6: Diferentes formas evolutivas da *Leishmania*. A – Forma amastigota, que se desenvolve no vacúolo digestivo de macrófagos. B - Forma promastigota, predominante no intestino de insetos contaminados.**

## 1.4 Superfície celular da *Leishmania*

Para que qualquer fármaco entre na célula, é preciso que este atravesse a membrana plasmática. Assim, qualquer modificação na sua composição e estrutura pode interferir nas interações fármaco-membrana. Para a compreensão dos mecanismos de ação dos fármacos que possui grande afinidade por membranas celulares, como a MT, por exemplo, é muito importante que se conheça a composição das membranas.

As membranas celulares são estruturas flexíveis de matéria condensada que envolve todas as células e delimitam suas organelas [37]. São essenciais para a vida de todos os seres vivos estando envolvidas em uma variedade de processos celulares, tais como a adesão celular, condutividade iônica e sinalização celular. Além disso, as membranas biológicas são seletivamente permeáveis a íons e moléculas orgânicas e servem também como uma superfície de fixação tanto extra como intracelular [38].

As membranas biológicas são constituídas principalmente por lipídios e proteínas apresentando uma pequena quantidade de carboidratos. O modelo que melhor representa a organização estrutural das biomembranas é o conhecido como “mosaico fluido” desenvolvido por Singer e Nicholson em 1972 [39]. Segundo este modelo, as membranas são compostas por uma bicamada lipídica fluida onde estão depositados os carboidratos e as proteínas. Algumas destas proteínas ficam aderidas à superfície da membrana (proteínas periféricas e ancoradas a lipídios), enquanto outras estão totalmente mergulhadas entre a bicamada, atravessando a membrana de lado a lado (proteína integral).

A estrutura básica das membranas celulares é a bicamada lipídica, a qual é composta por fosfolipídios e esfingolipídios [38]. Além desses, a membrana contém o colesterol, um composto orgânico que impacta crucialmente a viscosidade da membrana. As interações hidrofóbicas entre o esqueleto esterol do colesterol e a cadeia acil dos fosfolipídios reduzem a deformidade da bicamada lipídica bem como a permeabilidade da membrana para pequenas moléculas hidrofílicas [40]. As proteínas são a chave para as principais funções das membranas e são responsáveis pelo contato célula-

célula, reconhecimento de superfície, contato do citoesqueleto, sinalização, atividade enzimática e transporte de substâncias através da membrana [38].

Em qualquer organismo parasita, a membrana plasmática representa a principal interface entre os vários mecanismos de defesa do hospedeiro e o invasor, e deve ser adaptada a essa situação altamente especializada. Na *Leishmania*, por exemplo, a qual divide sua existência entre o ambiente hidrolítico neutro-alcálico do intestino médio dos insetos e o ambiente hidrolítico ácido dos fagolisossomos dos mamíferos, as especializações da membrana devem ser ainda mais radicais. A membrana plasmática destes protozoários envolve toda a célula, incluindo o flagelo, e é suportada por um citoesqueleto microtubular extensivo ligado à superfície interna da membrana através de uma matriz regular de proteína associadas a microtúbulos [41].

Os principais lipídios que constituem as membranas celulares dos protozoários do gênero *Leishmania* são os fosfolípidos, correspondendo a aproximadamente 70% dos lipídios totais [42]. Neste grupo se encontram as fosfatidilcolinas (30 a 40%), fosfatidiletanolamina (~10%) e os fosfatidilinosítois (~10%) [43]. O restante está dividido entre lipídios neutros, dos quais aproximadamente 60% correspondem a esteróis e os glicolipídios [44].

Embora as proteínas e lipídios de membrana desempenhem um importante papel na sobrevivência do parasito, eles não estão sós na superfície da *Leishmania*. Esta, nas diferentes formas evolutivas, apresenta em sua superfície uma variedade de moléculas importantes (Figura 7) para a relação dos parasitos com seus hospedeiros, determinando a virulência, a infecciosidade, sobrevivência e patogênese [35]. Exemplos dessas moléculas são proteínas ancoradas à membrana plasmática via glicosilfosfatidilinositol (GPI) e glicolipídios de GPI livres, os quais formam uma camada de proteção na superfície do parasito, e intermediam interações essenciais entre o parasito e o hospedeiro [45].

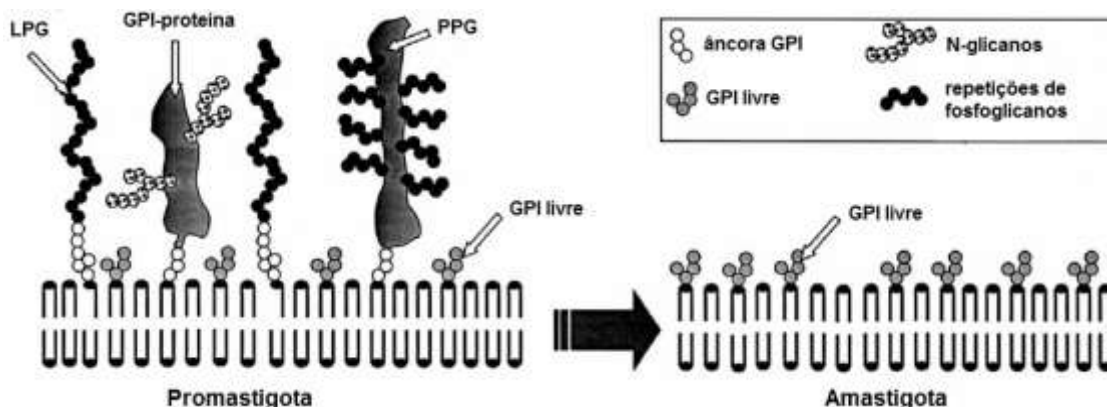


Figura 7: Representação esquemática da superfície celular da *Leishmania*. A superfície celular das promastigotas apresenta várias classes de macromoléculas incluindo LPGs de alto peso molecular, glicoproteínas (GP63) e PPGs ancorados a GPI. Abaixo dessas macromoléculas se encontra uma densa camada de GPIs livres. Nas amastigotas a expressão de macromoléculas ancoradas a GPI diminui, enquanto que o nível de expressão das GPIs livres é mantido. Figura adaptada de [45].

A glicoproteína ancorada por GPI predominante em todas as promastigotas de *Leishmania* é a metaloprotease 60 kDa denominada GP63. Cada promastigota é coberta com aproximadamente  $5 \times 10^5$  cópias de GP63, o que representa aproximadamente 1% do total de proteína celular [45]. A GP63 contém zinco e é capaz de hidrolisar vários polipeptídeos desnaturados [46].

Outra classe de moléculas ancoradas via GPI à superfície celular das leishmânias são as proteofosfoglicanas (PPGs). Essas são menos abundantes que a GP63, mas são componentes importantes da camada superficial (imediatamente acima da membrana) das promastigotas denominada glicocálix [45]. As PPGs contêm um grande esqueleto de polipeptídios, o qual é extensivamente modificado por uma variedade de cadeias fosfoglicanas complexas [47].

A macromolécula mais abundante na superfície das promastigotas de *Leishmania* é a lipofosfoglicana (LPG) contendo aproximadamente  $6 \times 10^6$  cópias/células. Sua estrutura molecular consiste de 4 domínios: (i) uma âncora de 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol; (ii) uma porção central composta por um heptassacarídeo fosforilado (iii) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados e (iv) uma pequena estrutura de oligossacarídios, conhecida como “capa” [46]. A âncora lipídica e a parte central das LPGs são idênticas para todas as espécies de *Leishmania*. O esqueleto principal das unidades de repetição também é conservado, o que difere as LPGs das diversas espécies

existentes é a presença de açúcares adicionais, os quais são ramificações da coluna central dos fosfosacáridos. Além disso, pode haver pequenas variações na estrutura “capa” [11,21].

As GPIs livres são numericamente mais abundantes (~10 x) que todas as principais macromoléculas ancoradas por GPI e constitui uma quantidade de carboidrato celular similar a LPG [48]. Esses glicolipídios também compõe o glicocálix.

Os níveis de expressão tanto da LPG como das glicoproteínas ancoradas por GPI são reguladas na diferenciação das promastigotas metacíclicas em amastigotas. O número de cópias dessas classes de moléculas expressas por amastigotas intracelulares é significativamente menor do que o número de cópias expressas em promastigotas [49,50]. Já a expressão dos GPIs livres permanece alta em ambos os estágios de desenvolvimentos.

## **1.5 Macrófagos, suas funções e componentes**

Os macrófagos se originam na medula óssea a partir de células tronco hematopoiéticas pluripotentes auto-renováveis, das quais se originam também outros componentes sanguíneos como eritrócitos e plaquetas [51]. São as principais células diferenciadas do sistema fagocítico mononuclear, o qual compreende monoblastos e pro-monócitos da medula óssea, monócitos do sangue periférico e macrófagos teciduais [52]. Os progenitores da medula óssea se diferenciam em monócitos, os quais migram para o sangue periférico e circulam pelo organismo. Ao deixarem a corrente sanguínea se instalam nos tecidos onde completam seu processo de diferenciação, tornando-se macrófagos. Presente nos órgãos linfoides, fígado, pulmões, trato gastrointestinal, sistema nervoso central, cavidades serosas, ossos, pele e sinóvia, os macrófagos apresentam grande heterogeneidade estrutural e funcional, participando de uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos [52].

Os macrófagos são células geralmente grandes, com formato irregular medindo entre 25 – 50 µm de diâmetro. Apresentam, muitas vezes, um núcleo

redondo ou em forma de rim excentricamente posicionado com um ou dois nucléolos proeminentes e cromatina nuclear finamente dispersa. No citoplasma contêm um complexo Golgi justanuclear e vários grânulos finos e grandes. Vacúolos citoplasmáticos também são vistos com frequência, próximo a periferia da célula, refletindo a pinocitose ativa dos macrófagos. Microscopia de contraste de fase revela grandes células com uma propensão a aderir e espalhar sobre superfícies de vidro, deixando as organelas celulares concentradas na região central da célula e com uma intensa irregularidade na superfície das membranas [52,53].

Os macrófagos podem ser residentes ou ativados. Os residentes são encontrados em quase todos os tecidos do corpo, onde assumem funções e fenótipos específicos. Estas células funcionam como sensores na inflamação e regeneradores de tecidos, onde há um aumento no reconhecimento de suas interações com outras células residentes em cada órgão [54]. Macrófagos teciduais são considerados sentinelas imunes devido a sua localização estratégica e sua habilidade em iniciar e modular respostas imunes durante a infecção patogênica ou lesão do tecido e contribuir para a manutenção da homeostase dos tecidos [55].

As células se tornam ativadas após contato com patógenos ou moléculas proveniente desses, e com moléculas produzidas pelo sistema imune em resposta aos invasores [54]. O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies [56].

Sabe-se que os macrófagos desenvolvem diversas e importantes funções, sendo uma das principais, a defesa do hospedeiro através da ingestão e morte de micro-organismos. Eles destroem os micro-organismo invasores usando um arsenal de mecanismos antimicrobianos que envolve a geração enzimática de espécies reativas de oxigênio e espécies de nitrogênio, a digestão proteolítica [57], degradação enzimática, limitação de nutrientes e peptídios antimicrobiais [58]. A ingestão das partículas é via fagocitose. Os macrófagos são hábeis para reconhecer patógenos e agentes não infecciosos, utilizando para isso uma variedade de receptores de reconhecimento, incluindo

lecitinas, receptores “toll-like”, e receptores para N-formil metionina contendo peptídeos. A remoção de micro-organismos via fagocitose é realizada sem induzir uma forte resposta pró-inflamatória [58].

Em adição à ingestão de micro-organismos, os macrófagos estão envolvidos na eliminação de células apoptóticas como forma de limpeza após infecção ou lesão do tecido estéril. Além de secretar algumas proteínas conhecidas como citocinas, as quais se ligam a receptores de sinalização de outras células e assim instrui essas células a uma resposta de forma a contribuir para a defesa do hospedeiro. Outra importante função dos macrófagos é promover a reparação de tecidos danificados, estimulando o crescimento de novos vasos sanguíneos (angiogênese) e a síntese da matriz extracelular rica em colágeno (fibrose) [57].

A superfície dos macrófagos é coberta por irregularidades e microvilosidades e pequenas bolhas (saliência) de superfície. Microtúbulos e microfilamentos são proeminentes em macrófagos e formam um citoesqueleto bem organizado e tri-dimensional o qual envolve o núcleo e estende por todo o citoplasma até a periferia celular. Microfilamentos de actina imediatamente abaixo da membrana celular são responsáveis pela irregularidade proeminente, locomoção e formação dos pseudópodes, bem como influenciar eventos endocitóticos e estabelecer a polaridade de migração em resposta a estímulos quimiotáticos [52,59].

A membrana plasmática dos macrófagos contém uma grande variedade de proteínas, glicoproteínas, e glicolípídeos primordiais para sua regulação e funções efetoras. São mais de 30 receptores específicos documentados até agora [60], dos quais muitos estão envolvidos na imunidade inata e adquirida, garantindo assim grande habilidade e versatilidade de respostas frente à patógenos e às diversas condições do organismo. São os receptores que alteram e determinam o controle das atividades dos macrófagos como diferenciação, reconhecimento, endocitose, migração e secreção de moléculas envolvidas na modulação da ativação celular e da resposta imune [52].

Macrófagos expressam diversos receptores da superfície celular, os quais podem discriminar numerosos componentes bacterianos como carboidratos bacterianos, lipídios bacterianos bem como outras estruturas encontradas tipicamente em superfícies de patógenos [61]. Diversas funções

dos macrófagos dependem de sua composição lipídica, tais como recepção de sinais e transdução, fagocitose, e síntese de lipídios oxidados e outros mediadores inflamatórios [62].

A cavidade peritoneal de camundongos contém normalmente uma grande população de células residentes, cerca da metade das quais são fagócitos mononucleares imaturos e células linfoides restantes. Tais células constituem uma única fonte de fagócitos, não necessitando de um estímulo inflamatório peritoneal prévio. Eles servem como uma excelente população para experimentos de cultura *in vitro* em que as concomitantes morfológicas e bioquímicas das funções dos macrófagos foram avaliadas [63]. Porém, a injeção de partículas de Bio-Gel de poliacrilamida, tioglicolato ou amido induz uma resposta inflamatória caracterizada pela presença precoce de neutrófilos, e após 3-5 dias o peritônio se torna um microambiente com fácil isolamento de macrófagos ativados [64]. A grande semelhança entre os macrófagos de camundongos e humanos faz dos macrófagos peritoneais um excelente sistema modelo para elucidar os mecanismos que regulam o metabolismo e função dos macrófagos humanos [65].

## **1.6 O parasito e sua interação com os macrófagos do hospedeiro**

A infecção humana pelas espécies de *Leishmania* que causam a LT tem seu início logo após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas do parasito na pele. Quando os parasitas são introduzidos no hospedeiro mamífero, as formas promastigotas metacíclicas encontram um ambiente constituído por componentes sanguíneos, células e plasma, extravasados para o tecido durante o repasto sanguíneo do inseto. Imediatamente após este contato, há o início da resposta imune natural contra os parasitos. Sabe-se que as formas metacíclicas inoculadas no hospedeiro são hábeis para evadir o sistema imune natural sendo então fagocitadas pelas células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente o macrófago. Em outras palavras, as formas promastigotas metacíclicas infectantes, que resistem aos mecanismos microbicidas, são fagocitadas pelos macrófagos, nos quais, transformam-se em

formas amastigotas dentro dos vacúolos parasitóforos. E neste microambiente passam a multiplicar-se por divisão binária [20,32].

Antes da infecção causada pela *Leishmania* no macrófago, ocorre uma série de eventos que precedem a entrada das promastigotas metacíclicas infectantes nas células hospedeiras, os quais estão diretamente relacionados ao sucesso ou não da infecção [32]. As interações moleculares na interface celular do hospedeiro-parasita são muito importantes tanto para a fixação dos protozoários aos macrófagos, como sua sobrevivência intracelular, diferenciação e crescimento [66].

O sistema de complemento é uma das primeiras linhas de defesa contra a invasão microbiana e é composto por proteínas solúveis que podem facilitar o processo da fagocitose. No caso da promastigota, esse tipo de efeito é explorado de forma ainda mais complexa [17]. A resistência ao complemento das formas metacíclicas se dá, em parte, devido a LPG, uma vez que nesta forma do parasito, há um aumento no número de subunidades e uma modificação nos seus componentes de açúcares, os quais dão uma aparência estruturalmente mais espessa à superfície da *Leishmania* [67]. Assim, os efeitos prejudiciais à infecção provocados pela ativação do complemento são evitados pelos parasitos, mas efeitos benéficos são explorados, como a opsonização (adesão de opsoninas à superfície do patógeno) e a quimiotaxia (atração por ação de um gradiente químico), processos que facilitam a fagocitose. Assim, as promastigotas de *Leishmania* garantem seu sucesso ao entrar nos fagócitos mononucleares [17].

Vencido o primeiro obstáculo, o próximo passo das promastigotas metacíclicas é sua adesão ao macrófago. Este é um passo fundamental para a invasão da célula hospedeira. Estudos demonstram que não há uma orientação especial das formas promastigotas durante a sua entrada nos fagócitos mononucleares [68]. Numerosos receptores têm sido implicados na interação *Leishmania*-macrófagos como proteínas da membrana, receptores da superfície do parasito (LPG e GP63) e dos macrófagos e fatores derivados do soro [25,69,70]. Portanto, o complemento também é uma importante opsonina na mediação da adesão da *Leishmania* aos macrófagos. A opsonização dos parasitos afeta, não somente sua fixação, mas também seu destino intracelular após a fagocitose [71].

Já a fixação das formas amastigotas aos macrófagos independe do soro e a adição deste não melhora sua ligação. Observações indicam que a adesão das amastigotas envolve outros receptores dos macrófagos diferentes dos descritos para as promastigotas. Outra diferença entre as duas formas da *Leishmania* é a especificidade da adesão celular. Enquanto que as promastigotas se ligam primeiramente, se não exclusivamente, a fagócitos mononucleares, amastigotas se fixa rapidamente em qualquer célula aderente. Estas se ligam a heparina a qual auxilia na adesão a proteoglicanas de heparan sulfato da superfície celular [70]. As proteoglicanas são expressas por muitas células mamíferas aderentes, inclusive macrófagos [72].

Existem outros fatores do soro que também podem influenciar a fixação dos parasitos aos macrófagos. Wyler *et al.* demonstraram que tanto as promastigotas como as amastigotas da *L. (L.) amazonensis* usam fibronectina para facilitar a sua adesão aos monócitos [73]. Possivelmente, os receptores de fibronectina medeiam uma parte da adesão das promastigotas aos macrófagos através da ligação a GP63 da *Leishmania* [70]. A LPG também desenvolve papéis importantes na ligação de promastigostas em macrófagos [74]. Além de evitar a lise mediada pelo complemento, interage com receptores que permitem a adesão das promastigotas ao macrófago. Esse reconhecimento é realizado via receptores manose-fucose, ligando resíduos de manose presentes na LPG [75]. A LPG também protege os parasitos dos danos oxidativos [76] e da digestão dentro do fagolisossoma [77].

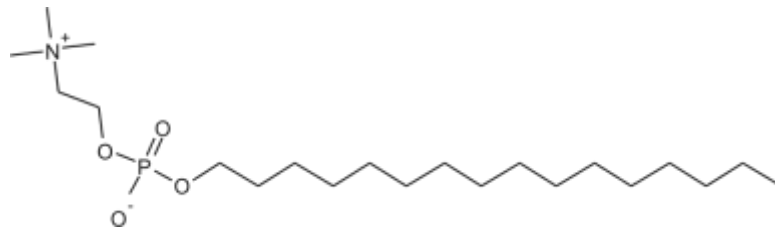
Depois da adesão, a fagocitose é processo rápido, acompanhado pela ativação de mecanismos microbicidas do macrófago, resultando na produção de peróxido e superóxido de hidrogênio, os quais são altamente tóxicos para os parasitos [78]. A fagocitose requer uma interação sequencial e circunferencial entre receptores especializados na superfície da célula fagocítica e ligantes complementares na superfície da partícula fagocitada [68]. Após a fagocitose, o parasito transforma-se em amastigota dentro do vacúolo parasitóforo, o qual se funde com grânulos lisossomais para formar os fagolisossomos, onde as formas amastigotas deverão se multiplicar. Entretanto, nesse microambiente o parasito vai enfrentar vários mecanismos microbicidas, tais como, produtos do metabolismo do oxigênio, baixo pH e proteínas catiônicas. Assim, considerando que a forma amastigota é capaz de superar os mecanismos microbicidas do

macrófago, a sua sobrevivência dependerá então da capacidade de resistir, também, aos mecanismos da resposta imune celular [32].

## 1.7 Miltefosina

A simultânea, mas independente, descoberta das atividades antiprotozoário e antineoplásica da MT e de alquilfosfocolinas relacionadas ocorreu no início de 1980 [79]. Coincidentemente, o composto foi sintetizado por dois diferentes grupos de pesquisa: Bill Pendergast e Joseph Chan em 1982 na fundação Burroughs Wellcome nos EUA [79] e Hansjoerg Eibl no Instituto Max-Planck (Alemanha) [80]. Em 1984 a MT juntamente com outras alquilfosfocolinas e uma alquilfosfoetanolamina, foram selecionadas para um “screening” contra parasitos *Leishmania* e Tripanossomas, realizado em Beckenham, Reino Unido [79]. Apesar da excelente atividade da MT contra os parasitos tripanossomatídeos, foi dada prioridade ao desenvolvimento do fármaco como um tratamento local de metástases cutâneas de câncer de mama levando-se, eventualmente, a aprovação de uma formulação tópica do medicamento (Miltex) [11,81].

A MT pertence à classe das alquilfosfocolinas, as quais são ésteres de fosfocolina de alcoóis alifáticos de cadeia longa. As alquilfosfocolinas estão estruturalmente relacionadas ao grupo dos alquil-lisofosfolipídeos, análogos sintéticos de lisofosfatidilcolina ou lisolecitina sem o esqueleto de glicerol [11]. O nome químico da MT é hexadecil 2-(trimetil azanium) fosfato de etila, também conhecido como hexadecilfosfocolina (Figura 8). Sua fórmula empírica é  $C_{21}H_{46}NO_4P$  e o peso molecular igual a 407,57 g/mol. É um composto anfifílico e zwitteriônico devido ao grupo amino quartenário carregado positivamente (carregado permanentemente) e ao grupo fosforil carregado negativamente. O composto cristalino é um pó higroscópico e se dissolve facilmente em solventes aquosos e orgânicos [11].



**Figura 8: Estrutura molecular da MT.**

Em março de 2002 a MT foi aprovada como primeiro fármaco de administração oral para o tratamento da LV na Índia [82]. Em seguida foi aprovada para uso, também no tratamento de LV, no Nepal e para, LV e LT, na Argentina, Bangladesh, Bolívia, Colômbia, Equador, Alemanha, Guatemala, Honduras, México, Paquistão, Paraguai e Peru [83]. Além disso, a MT foi designada como um “medicamento órfão” (que tratam doenças pouco frequentes) para o tratamento de LV tanto pela European Medicines Agency em 2002 como pela US Food and Drug Administration em 2006. Recentemente, foi adicionada, também, à lista modelo de medicamentos essenciais da OMS [84]. A dose recomendada atualmente de MT como monoterapia das LT e LV é de 2,5 mg/kg/dia durante o total de 28 dias [11].

A atividade leishmanicida da MT foi demonstrada *in vitro* e *in vivo* tanto para as formas promastigotas quanto para as formas amastigotas de várias espécies de *Leishmania* [9,85,86]. Diversas hipóteses para o mecanismo de ação leishmanicida deste fármaco surgiram nos últimos anos, no entanto nenhum foi identificado definitivamente. A multiplicidade de propostas de mecanismos potenciais e estudos contraditórios podem ser indicações de que a MT apresenta mais de um sítio molecular de ação [11]. Por exemplo, danos a membrana flagelar, inibição da síntese de fosfatidilcolina e interferência com o metabolismo alquilfosfolípido e biosíntese de glicosilfosfatidilinositol, modulação da homeostase de cálcio tão bem como a indução da apoptose, tem sido implicados como possíveis mecanismos de ação [87,88].

O acúmulo intracelular do fármaco nos parasitos *Leishmania* é um pré-requisito para todas as ações da MT já descritas. Este acúmulo ocorre em três etapas diferentes (Figura 9):

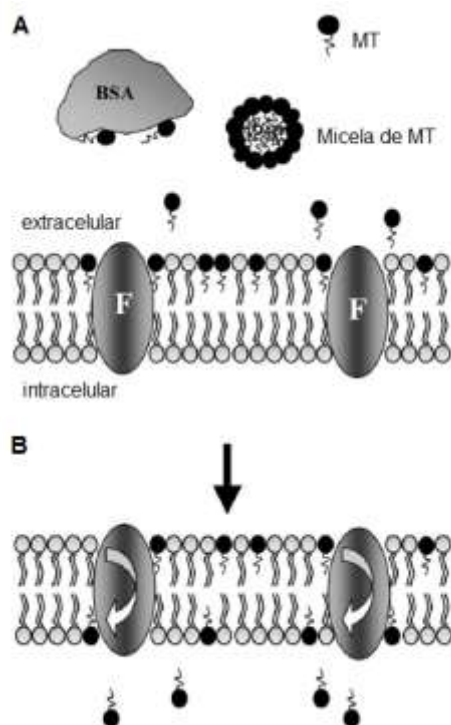
i) *Ligação da MT no folheto externo da membrana plasmática.* Sob condições normais de cultura, MT se liga à albumina, a qual age como um

reservatório para o fármaco [89]. Devido a sua característica anfifílica, a MT é capaz de formar micelas em água e se ligar às monocamadas lipídicas, estabelecendo um equilíbrio entre a fração que se liga à albumina e a fração que se liga às membranas celulares [90]. Esse equilíbrio depende basicamente da concentração do fármaco, da quantidade de albumina (ou porcentagem de soro no meio de cultura) e o número de células (e membranas plasmáticas) presente [89,91];

ii) *Internalização do fármaco*. Apesar de as moléculas fosfolipídicas difundirem-se rapidamente na monocamada lipídica, seu movimento “flip-flop” na bicamada lipídica é geralmente muito lento [92]. Existem dois possíveis mecanismos para a internalização da MT: a) Endocitose dos monômeros de MT integrados na membrana plasmática como membros da vesícula endocítica. Os parasitos *Leishmania* possuem uma alta atividade endocítica, a qual é restrita a uma área especializada da bolsa flagelar [93]. No entanto, essa via de internalização é importante somente em circunstâncias na qual a quantidade de fármaco ligado à membrana é extremamente alta [89]; b) Os monômeros de MT são translocados através da membrana por ação de proteínas flipase específicas. Esse é o mecanismo de internalização da MT mais importante, o qual depende de energia (ATP) e de duas proteínas (transportador LdMT e sua subunidade beta LdRos3) que provavelmente formam um complexo de translocação na membrana plasmática [91];

iii) *Alvo e metabolismo intracelulares*. Os monômeros da MT na face interna da membrana podem se desprender desta e estabelecer um equilíbrio com as membranas das organelas citoplasmáticas por formar suspensão de micelas em água. Contudo, nada se conhece, ainda, sobre a distribuição intracelular da MT e seu acúmulo em organelas [94]. Também tem sido suposta a ação da MT dentro da célula. Estudos de microscopia eletrônica da *Leishmania* após sua incubação com baixas concentrações de MT mostrou a capacidade deste fármaco em romper as membranas das organelas intracelulares em um efeito tipo detergente [95]. Além disso, o metabolismo da MT no interior da célula da *Leishmania* é muito lento ou mesmo negligenciável [91], enquanto que a capacidade de internalização do fármaco é muito alta. Por fim, mecanismos de eliminação do fármaco, como exocitose ou atividade

flipase por translocadores proteicos, podem reduzir a concentração de MT dentro das células dos parasitos [96].



**Figura 9: Ligação e internalização da MT em parasitos *Leishmania*. Etapas sequenciais na acumulação da MT: A - ligação da MT no folheto externo da membrana plasmática. MT é recrutada pelas moléculas de albumina (BSA), a qual atua como reservatório do fármaco; B - a fração de MT que se liga à membrana plasmática é internalizada por meio da maquinaria de proteínas flipases (F) presentes na bicamada lipídica e pela atividade “flip-flop”. Esse maquinário de translocação inclui, no mínimo, duas proteínas da membrana, LdMT e LdRos3. Adaptado de [94].**

Sabe-se, então, que a MT interfere primeiramente nas membranas celulares sem interagir com o DNA, e pode modular a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolípidios e a transdução do sinal proliferativo [97]. Devido a sua estrutura química, se insere facilmente nas membranas biológicas resistindo à degradação catabólica. O nível de particionamento das moléculas de MT dentro das bicamadas lipídicas depende do grau de insaturação da cadeia alquil-fosfolipídicas e da quantidade de colesterol [98]. Este fármaco interage com a membrana celular e rapidamente alcança outras membranas subcelulares, sendo capaz de afetar o metabolismo celular em diferentes níveis [99,100]. As enzimas envolvidas no metabolismo lipídico estão localizadas principalmente nas membranas do retículo endoplasmático e, portanto, este também poderia ser um alvo para ação da MT [98].

A *Leishmania* apresenta alto nível de éteres lipídicos e esses são encontrados principalmente na glicoproteína e glicolipídios ancorada por GPI presentes na superfície dos parasitos. Lux *et al.* observaram que a MT age na enzima chave envolvida no metabolismo desses ésteres lipídicos, inibindo a enzima 1-acil-2-lisoglicero-3-fosdocolina aciltransferase de maneira dose dependente [97,101]. Antes disso, esses mesmos autores [101] mostraram que a síntese de LPG e gp63 é inibida em parasitos tratados com este fármaco.

Estudos sobre a ação da MT na *Leishmania* determinaram também que a mitocôndria, especificamente a inibição do citocromo c oxidase mitocondrial, é um importante alvo da MT [102]. Essa inibição acontece paralelamente a alterações no consumo de oxigênio e despolarização mitocondrial, tão bem como a um declínio significativo no nível de ATP intracelular dos parasitos [89].

Em estudos *in vitro*, foi demonstrado que a MT estimula células T ativando os macrófagos, o que resulta na liberação de citocinas, incluindo interferon gama (IFN $\gamma$ ), levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio microbicidas [97]. Entretanto, mesmo em camundongos imunodeficientes, a MT apresentou atividade leishmanicida, sugerindo que sua atividade não esteja relacionada com uma resposta imune dependente da célula T [103] ou mecanismos mediados por macrófagos ativados [97].

As principais preocupações para o uso disseminado da MT incluem o seu potencial teratogênico [104] e sua elevada meia vida (150-200 h), a qual pode facilitar a emergência de parasitas resistentes, devido à permanência de níveis sub-terapêuticos da droga na corrente sanguínea por algumas semanas após o tratamento [105]. Os eventos adversos observados nos estudos clínicos da MT para o tratamento da leishmaniose em geral são brandos e toleráveis, sendo representados principalmente por desconforto gastrointestinal transitório como vômito e diarreia, e aumento dos níveis das transaminases hepáticas e da creatinina [6,106]. O conhecimento mais concreto do mecanismo de ação da MT poderá facilitar o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose.

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivos gerais

Estudar a ação da MT em formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa), macrófagos extraídos do peritônio de camundongo Balb/c, e também em macrófagos infectados pelos parasitos, a fim de encontrar o mecanismo de ação da MT.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estudar a ação da MT nos lipídios e proteínas da membrana plasmática de *Leishmania* e macrófagos através da espectroscopia de RPE de dois marcadores de spin, 5-DSA e MAL-6;
- Analisar a lise e a viabilidade celular tanto dos parasitos como dos macrófagos tratados com as mesmas concentrações de MT utilizadas nos experimentos de RPE;
- Estudar a citotoxicidade da MT nas duas espécies de células alvo pelo teste do MTT, com o objetivo de encontrar a concentração de MT na membrana que mata 50% (IC<sub>50</sub>) das células presentes na solução;
- Abordar os aspectos biofísicos envolvidos nos ensaios de MTT, levando em conta a concentração de célula usada no experimento, a fim de determinar as concentrações de MT no meio aquoso e na membrana celular, bem como o coeficiente de partição membrana-água para as células estudadas. Com estes parâmetros biofísicos, comparar as sensibilidades das células à MT, as afinidades das membranas celulares pela MT e as concentrações de MT na membrana celular que levam à citotoxicidade celular.
- Observar, através de imagens obtidas com microscópio óptico, macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com MT, a fim de investigar se a ação da MT é primeiramente sobre os macrófagos ou se a MT pode penetrar nas células hospedeiras e matar os parasitos sem destruí-las.

## 3 Técnicas Experimentais

### 3.1 Espectrofotometria de absorção molecular no UV/Vis (EAM)

#### 3.1.1 Fundamentos da EAM

A Espectrofotometria de absorção na região do Ultravioleta/Visível (EAM UV/Vis) é uma técnica analítica amplamente utilizada há mais de 50 anos. Este é um dos métodos mais empregados para análise quantitativa e qualitativa de muitas espécies moleculares orgânicas, inorgânicas e bioquímicas, devido a sua robustez, custo relativamente baixo e pelo grande número de aplicações desenvolvidas [107].

A técnica de EAM UV/Vis é baseada na propriedade das espécies iônicas ou moleculares de absorverem determinados comprimentos de onda da radiação UV/Vis (190 a 800 nm). No processo de absorção da radiação, a energia dos fótons é transferida para as moléculas do meio em análise provocando transições eletrônicas associadas a transições vibracionais e rotacionais. Tendo em vista que os níveis de energia das moléculas são quantizados, apenas aqueles comprimentos de onda cujos fótons têm energia idêntica à de uma transição permitida são absorvidos. Assim, a absorção de energia pode ser considerada como um processo específico relacionado com a estrutura da espécie absorvente, a qual determina a energia envolvida na transição, e com a probabilidade de que esta ocorra [108].

A intensidade da absorção não é diretamente mensurável, mas ela determina a atenuação da radiação que incide na amostra e que pode ser medida e relacionada com a concentração da espécie absorvente [108]. A atenuação da radiação é consequência de sucessivos processos de absorção, reflexões nas paredes da cubeta onde está contido a amostra e fenômenos de dispersão. Considerando apenas os processos de absorção, a intensidade do feixe que é transmitido através da amostra relaciona-se com a do feixe incidente nesta pela lei de Beer [109].

A lei de Beer, conhecida também como lei de Lambert-Beer, é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético [110]. Esta lei diz, quantitativamente, como a grandeza da atenuação depende da concentração das moléculas absorventes e do comprimento do caminho sobre o qual ocorre a absorção. Quando um feixe de radiação monocromática atravessa uma solução contendo um analito absorvente, uma parte da energia radiante é absorvida, e a parte restante atravessa o meio. Para uma solução contendo certa concentração de analito, a atenuação será maior quanto mais longo for o caminho óptico, pois maior será a quantidade de centros absorventes presentes no percurso. Além disso, a atenuação também aumenta proporcionalmente a concentração de moléculas absorventes presentes na solução [111].

Em virtude das interações entre fótons e as partículas absorventes, a potência radiante do feixe (quantidade de energia transportada por segundo através de uma unidade de seção transversal) atenua de  $P_0$  a  $P$ . A razão entre a potência da radiação transmitida ( $P$ ) e a potência da radiação incidente ( $P_0$ ) é denominada transmitância ( $T$ ), equação, que representa, portanto, a fração da potência da radiação incidente que é transmitida pela solução [108]. A transmitância é frequentemente expressa como uma porcentagem denominada porcentagem de transmitância e é dada por:

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (3.1)$$

Para um meio totalmente absorvente a transmitância é nula ( $P = 0$ ), enquanto que para um meio completamente transparente, é unitária ( $P = P_0$ ). Embora a transmitância seja uma grandeza cujo significado é intuitivo, é comumente substituída pela absorbância. A absorbância  $A$  de uma solução corresponde ao logaritmo decimal do inverso da transmitância. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda tem-se:

$$A = -\text{Log}T = \text{Log} \frac{P_0}{P} = \epsilon bc, \quad (3.2)$$

onde  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar do analito,  $b$  é o comprimento do percurso óptico e  $c$  é a concentração da substância absorvente. O coeficiente de extinção molar é característico de uma substância, e indica qual a quantidade de luz que é absorvida num determinado comprimento de onda. É expresso em  $M^{-1}cm^{-1}$ , tornando o produto  $\varepsilon bc$  adimensional. Esta equação apresenta a vantagem de variar linearmente com a concentração, percurso óptico e coeficiente de absorção molar.

Normalmente, os valores para a transmitância ou absorbância não podem ser adquiridos da forma como foram definidos nas equações 3.1 e 3.2, devido às perdas por reflexão ou espalhamento que podem ocorrer nas paredes das cubetas onde está contida a amostra. Estas perdas podem ser substanciais. Por exemplo, cerca de 8,5% de um feixe de luz amarela é perdido por reflexão quando este passa por uma cubeta de vidro. A luz também pode ser espalhada em todas as direções a partir da superfície de moléculas grandes ou de partículas presentes no solvente, e esse espalhamento pode provocar uma atenuação adicional do feixe quando este passar pela amostra. Para compensar esses efeitos, a potência do feixe transmitido através da célula contendo a solução do analito, é comparada com a potência que atravessa uma cubeta idêntica contendo somente o solvente ou o branco dos reagentes. A absorbância ou transmitância experimental, que se aproxima muito dos valores reais, são então obtidos com as seguintes equações [107]:

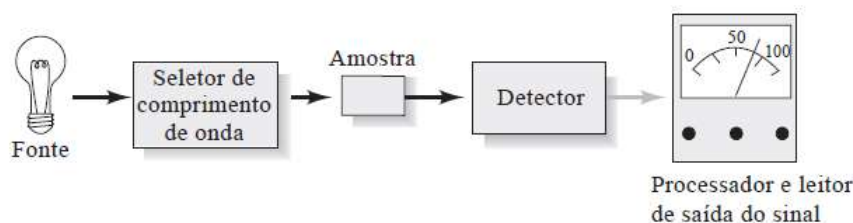
$$T = \frac{P_{solução}}{P_{solvente}} \approx \frac{P}{P_0} \quad (3.3)$$

$$A = \text{Log} \frac{P_{solvente}}{P_{solução}} \approx \text{Log} \frac{P_0}{P} \quad (3.4)$$

A obediência estrita à lei de Beer é observada apenas com radiação verdadeiramente monocromática. Infelizmente o uso da radiação restrita a um único comprimento de onda quase nunca é prático, porque dispositivos que isolam partes do espectro de uma fonte contínua produzem uma banda mais ou menos simétrica de comprimentos de onda em torno daquele desejado [107].

### 3.1.2 O espectrofotômetro

Os equipamentos de medida de absorvância (ou transmitância) designam-se por espectrofotômetros. Um espectrofotômetro de absorção no UV/Vis é constituído basicamente por uma fonte estável de radiação contínua, um seletor de comprimentos de onda (monocromadores), porta amostra, detector de radiação e uma unidade de processamento e de leitura do sinal [109]. A Figura 10 ilustra uma configuração do arranjo destes componentes, destinadas a efetuar medidas espectroscópicas ópticas. Para o propósito de medidas de absorção molecular, necessita-se de uma fonte contínua cuja potência não varie bruscamente em uma faixa considerável de comprimento de onda [107].



**Figura 10: Arranjo dos componentes básicos de um espectrofotômetro para medidas de absorvância. Adaptado de [111].**

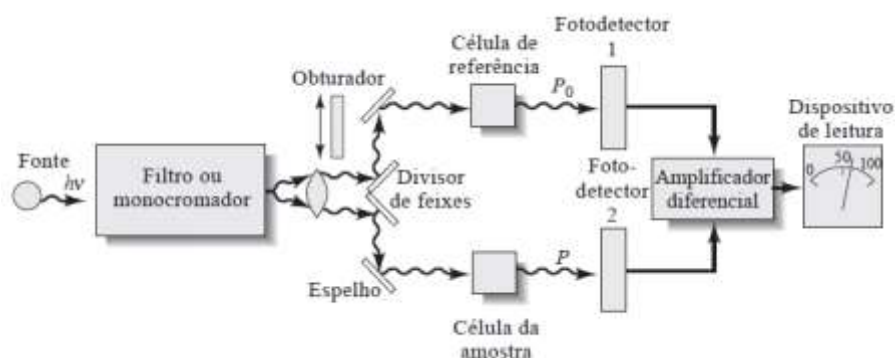
A fonte de luz é geralmente uma lâmpada de deutério, a qual emite radiação eletromagnética na região ultravioleta do espectro. Uma segunda fonte de luz, uma lâmpada de tungstênio, é usada para comprimentos de onda na região visível do espectro [112]. A troca entre as lâmpadas de deutério e tungstênio é feita em torno de 360 nm, de forma que esteja usando sempre a fonte mais intensa.

O monocromador é uma rede de difração e sua função é selecionar uma estreita faixa de comprimentos de onda do feixe incidente. Um sistema de fendas é utilizado para focar o feixe de luz de comprimento de onda desejado na célula da amostra. A luz passa pela amostra e chega ao detector, onde a intensidade da luz transmitida ( $P$ ) é registrada. O detector é geralmente um tubo fotomultiplicador, embora em instrumentos modernos fotodiodos também sejam utilizados [112]. Um processador de sinal é um dispositivo eletrônico que amplifica o sinal elétrico proveniente do detector. Este também pode alterar

o sinal da corrente contínua para corrente alternada (ou de forma reversa), variar a fase do sinal e filtrá-lo para remover os componentes indesejados [111].

O porta amostra é constituído por uma cubeta, comumente chamada de célula. Este deve ser obrigatoriamente construído de material transparente a radiação eletromagnética na região espectral de interesse. Para medidas na região visível, cubetas compostas de vidros ou plásticos podem ser utilizadas. Porém, nas medidas realizadas na região UV, estes materiais não são apropriados, por absorverem no UV. Como alternativa, tem-se as cubetas feitas de quartzo ou sílica fundida que não absorve radiação UV e nem visível [112].

Muitos espectrofotômetros modernos são baseados em um projeto de feixe duplo [107]. A luz proveniente da fonte de radiação é dividida em dois feixes: o feixe da amostra e o feixe da referência [112]. Um dos feixes passa através da solução de referência até um fotodetector e o outro atravessa, simultaneamente, a amostra até o segundo fotodetector casado. As duas saídas são amplificadas e sua razão (ou logaritmo da razão) é determinada eletronicamente e exibida em um dispositivo de leitura [111]. Quando não há amostra no feixe de referência, a luz detectada é igual a intensidade da luz que passa pela amostra ( $P_0$ ) [112]. A Figura 11 mostra detalhes da construção de um espectrofotômetro de feixe duplo UV/Vis típico. São instrumentos apropriados para trabalhos quantitativos, nos quais a aquisição do espectro todo nem sempre é necessária [107].



**Figura 11: Sistema esquemático de um espectrofotômetro de feixe duplo. A radiação proveniente do filtro ou monocromador é dividida em dois feixes que passam, simultaneamente, pela célula de referência e da amostra antes de chegar aos dois detectores casados. Figura adaptada de [111].**

Para a realização deste trabalho foi utilizado o espectrofotômetro de feixe duplo da PG Instruments, modelo T80+, alocado no Laboratório de

Biofísica do Instituto de Física e uma leitora de Elisa da Thermo Labsystems, modelo Multiskan, alocada no Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública (IPTSP), ambos da Universidade Federal de Goiás (UFG).

## **3.2 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE)**

### **3.2.1 Introdução**

A espectroscopia de RPE, também conhecida como Ressonância de Spin Eletrônico (RSE), é uma técnica física que permite detectar e caracterizar moléculas com elétrons desemparelhados sem alterar ou destruir as moléculas [113]. Foi descoberta em 1944 por Evgeniy K. Zavoisky em Kazan na antiga União Soviética [114]. Desde então, tem se mostrado uma eficiente técnica para o estudo de diversos sistemas físicos, químicos e biológicos.

A espectroscopia de RPE se baseia na absorção ressonante da radiação eletromagnética na região de frequência de micro-ondas, por materiais paramagnéticos colocados na presença de um campo magnético estático e um campo de modulação. É uma forma de espectroscopia muito útil ao estudo de estruturas e dinâmicas moleculares [115]. Radicais livres e compostos biológicos como membranas lipídicas e proteínas contendo elementos de transição são tipos de moléculas com elétrons desemparelhados bastante investigados por RPE em pesquisas biológicas [113].

### **3.2.2 Princípios Básicos**

A espectroscopia de RPE, como todas as outras formas de espectroscopia, monitora a absorção de energia da radiação eletromagnética (micro-onda) quando as moléculas mudam seu estado de energia. As micro-ondas são campos elétricos e magnéticos oscilantes e perpendiculares entre si. Em várias formas de espectroscopia é a componente do campo elétrico que interage com o material para causar a mudança no estado energético. No entanto na espectroscopia de RPE é a componente magnética da radiação que

interage com moléculas, mais especificamente, com o momento magnético permanente criado pelo elétron [116].

Assim, a absorção de ressonância magnética é observada em espécies que apresentam um momento magnético resultante que permita a interação com o campo magnético. As partículas elementares tais como o elétron, apresentam um momento angular intrínseco chamado de spin [117]. Os spins eletrônicos são quantizados, e apresentam somente duas orientações permitidas em relação ao campo magnético aplicado, cada uma correspondendo a estados de energia distintos. A absorção de energia corresponde a transições entre esses níveis de energia [115], os quais diferem somente na orientação do momento angular, não na sua magnitude. O vetor momento angular de spin eletrônico é indicado por  $S$  [117]. O tratamento mais simples do experimento de RPE é feito em termos do centro paramagnético com spin  $S = 1/2$ , e, na prática, esta abrange uma grande quantidade de experimentos.

Associado ao momento angular de spin ( $S$ ) está o momento magnético  $\mu$ . Estas duas grandezas físicas são colineares e antiparalelas. O momento  $\mu$  pode ser descrito pela seguinte equação:

$$\mu = -g\beta S \quad 3.5$$

onde  $\beta$  é o magnéton de Bohr igual a  $e\hbar/2mc = 9,27 \times 10^{-21}$  erg/G ( $e$  e  $m$  são a carga e a massa do elétron, respectivamente) e  $g$  é uma constante adimensional chamada de fator- $g$  do elétron ( $g = 2,00232$  para o elétron livre) [118]. O fator- $g$  especifica a posição da absorção espectral de uma espécie paramagnética particular sendo característica desta espécie [115]. Na maioria dos sistemas biológicos, o valor de  $g$  é anisotrópico e depende da orientação da espécie em relação ao campo magnético aplicado [119].

Uma consequência direta da existência do momento magnético associado ao spin do elétron é a diferença de energia entre os dois estados do spin quando o elétron está sob um campo magnético estático [117]. Para um entendimento melhor deste fenômeno, considere um campo magnético constante  $B$  aplicado a um spin eletrônico. A energia de interação do momento

magnético  $\mu$  do elétron com o campo magnético  $\mathbf{B}$  (energia Zeeman) é dado por:

$$E = -\mu \cdot \mathbf{B} = g\beta \mathbf{S} \cdot \mathbf{B} \quad 3.6$$

Assumindo que o campo  $\mathbf{B}$  esteja direcionado ao longo do eixo z do sistema de coordenadas, a energia pode ser definida como

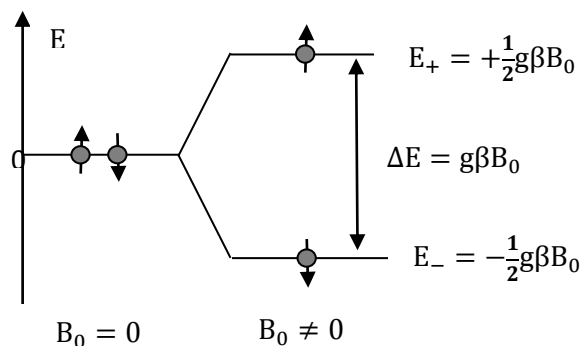
$$E = g\beta B_0 S_z \quad 3.7$$

onde  $B_0$  é a intensidade do campo magnético. Um spin eletrônico com  $S = 1/2$  apresenta dois estados de energia, conhecidos como níveis Zeeman:

$$E_{\pm} = \pm \frac{1}{2} g\beta B_0 \quad 3.8$$

O nível de maior energia pode ser denominado como spin “up” ( $\uparrow$ ),  $+1/2$  ou  $\alpha$  e o de menor energia como spin “down” ( $\downarrow$ ),  $-1/2$  ou  $\beta$ , os quais correspondem às orientações paralelas e antiparalelas de  $S_z$  com relação ao campo magnético.

A quebra da degenerescência do nível de energia do spin eletrônico na presença de um campo magnético é chamada de efeito Zeeman, representado graficamente na Figura 12.



**Figura 12: O efeito Zeeman do spin eletrônico. Na ausência de campo magnético ( $B_0 = 0$ ) os estados de spin “up” e “down”, apresentam a mesma energia ( $E = 0$ ). Na presença do campo magnético estático ( $B_0 \neq 0$ ), há a quebra da degenerescência em dois níveis de energia distintos. A diferença de energia entre os níveis é proporcional à intensidade do campo magnético. Adaptado de [117].**

A aplicação de uma radiação eletromagnética com polarização perpendicular à direção do campo magnético estático, oscilando com a frequência adequada  $\nu_0$ , resulta na absorção de energia da radiação pela espécie paramagnética em um dado valor de  $B_0$ . Esta absorção induz a transição de RPE, se a condição de ressonância

$$\Delta E = E_+ - E_- = h\nu_0 = g\beta B_0 \quad 3.9$$

for satisfeita.

Para radicais orgânicos o campo magnético de ressonância é aproximadamente 3400 G, correspondendo à frequência de radiação na região de micro-ondas do espectro eletromagnético (9 – 10 GHz). O comprimento de onda desta radiação é cerca de 3,4 cm, sendo conhecida como frequência de banda-X. Existem outras frequências comumente utilizadas como a banda-L (0,8 – 1,2 Hz), banda-S (3,4 – 3,8 Hz), banda-K (~24 GHz), banda-Q (~34 GHz) e banda-W (~94 GHz). As vantagens de se escolher uma ou outra banda dependem do sistema paramagnético em estudo, mas sabe-se que a banda-X oferece o melhor compromisso para resolução, intensidade e facilidade de uso [116].

### 3.2.3 RPE de onda contínua (RPE-OC)

Como explicado anteriormente, os spins eletrônicos em um sistema de spin 1/2 são estatisticamente distribuídos em dois estados de energia. Na presença de um campo magnético  $B_0$ , os spins interagem com seu ambiente (rede) e no equilíbrio térmico, se distribuem entre os dois estados de tal forma que haja um pequeno excesso de spins no nível de menor energia. A população relativa dos dois níveis de energia é descrito pela distribuição de Boltzmann

$$\frac{N_+}{N_-} = e^{-\Delta E/kT} = e^{-g\beta B_0/kT} \quad 3.10$$

onde  $k$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura da amostra. Para o elétron livre  $g = 2,0023$ , em temperatura ambiente, esta razão é igual a 0,9986 [116]. Esse pequeno excesso é suficiente para a absorção de micro-onda superar a emissão e tornar possível a detecção do sinal de absorção de RPE.

É importante considerar a interação do sistema de spin com a rede. O campo de micro-ondas agindo continuamente (RPE-OC) sobre o sistema, igualaria as populações de spins nos níveis de energia, se estes não forem acoplados à rede ou forem fracamente acoplados. E assim, após um curto intervalo de tempo, ocorreria o desaparecimento do sinal de absorção de RPE. Porém, se houver a interação spin-rede, haverá a restauração do equilíbrio, o qual corresponde ao excesso de spins no nível de menor energia, permitindo a observação contínua do sinal de absorção de RPE [117]. O espectro de RPE é essencialmente uma curva da absorção da micro-onda (frequência constante) em função do campo magnético aplicado.

### 3.2.4 Relaxação e forma de linha do espectro

Em um campo magnético constante  $B_0$ , uma população de spins adquire um momento magnético  $M_0$ , o qual é paralelo a  $B_0$  nas condições de equilíbrio térmico. A magnetização do equilíbrio reflete a diferença na população entre os estados dos spins, cuja degenerescência é removida pelo campo magnético, e é proporcional a  $B_0$ . Para o spin  $S = 1/2$  existem apenas dois níveis de spin, e a magnetização do equilíbrio com  $B_0$  aplicado ao longo da direção  $z$  é:

$$M_z = \frac{Ng^2\beta^2B_0}{4kT} \quad 3.11$$

$N$  é o número total de spins na amostra [118].

Após a excitação pela absorção da micro-onda, a população de spin no estado de maior energia, relaxa de volta ao estado do equilíbrio térmico. O tempo de retorno é conhecido como tempo de relaxação longitudinal ( $T_1$ ) ao longo da direção do campo magnético estático  $B_0$  [118].

O tempo de relaxação no plano perpendicular ao campo magnético estático  $B_0$  é conhecido como tempo de relaxação transversal ( $T_2$ ). Na ausência do campo de micro-onda, as componentes da magnetização de equilíbrio  $M_x$  e  $M_y$  são zero, porém essas componentes aparecem na presença da radiação com um campo magnético de amplitude  $B_1$  perpendicular ao campo  $B_0$ . Ao contrário da relaxação longitudinal, a relaxação transversal ocorre sem troca de energia com a rede. Este tipo de relaxação está relacionado às mútuas mudanças de estado de energia causadas pelas interações dentro do conjunto de spins e assim, é chamado frequentemente de relaxação spin-spin [118].

Uma consequência desses processos de relaxação com tempos  $T_1$  e  $T_2$  é a determinação da forma de linha do espectro (linha de ressonância única) do sistema de dois níveis. Isso pode ser demonstrado através das equações de Bloch (Equações 3.12 - 3.14), nas quais considerou o vetor magnetização macroscópica  $M$  em um sistema de coordenadas rotacionando em torno do eixo  $z$  com uma velocidade angular  $\omega_0 = 2\pi\nu_0 = \gamma B_0$  ( $\gamma$  é a razão giromagnética) que corresponde à frequência de ressonância [118].

$$\frac{dM_x}{dt} = (\omega_0 - \omega)M_y - \frac{M_x}{T_2}, \quad 3.12$$

$$\frac{dM_y}{dt} = (\omega_0 - \omega)M_x + \omega_1 M_z - \frac{M_y}{T_2}, \quad 3.13$$

$$\frac{dM_z}{dt} = -\omega_1 M_y - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad 3.14$$

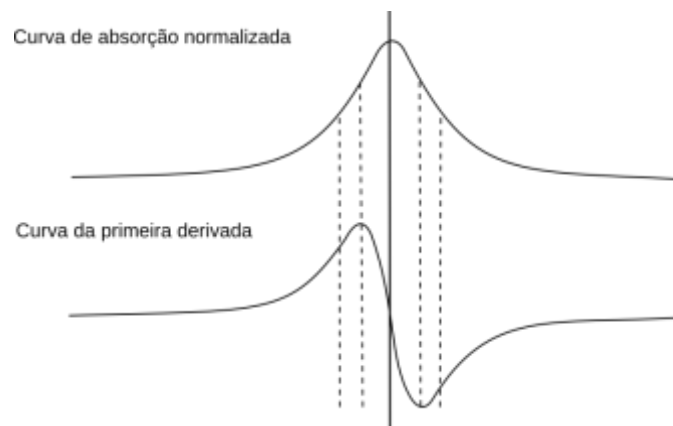
$\omega_1 = \gamma B_1$  e  $M_0$  é a magnetização no equilíbrio. Após o campo de micro-onda  $B_1$  (direcionado ao longo do eixo  $x$  no sistema de coordenadas rotacional) ser aplicado por tempo suficiente, a precessão do spin atinge um estado estável. Então a solução estacionária para as constantes  $\omega_0$  e  $\omega_1$ , quando todas as derivadas são iguais à zero, é dada por [118]:

$$M_x = \frac{(\omega_0 - \omega)\omega_1 T_2^2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad 3.15$$

$$M_y = \frac{\omega_1 T_2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad 3.16$$

$$M_z = \frac{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2}{1 + (\omega_0 - \omega)^2 T_2^2 + \omega_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad 3.17$$

A componente  $M_x$  da magnetização transversal, em fase com  $B_1$ , é proporcional ao modo de dispersão do sinal de RPE, enquanto que  $M_y$ , fora de fase  $90^\circ$ , é proporcional a absorção de energia. Além das fases, as equações descrevem a forma de linha do sinal de RPE sob condição de estado estacionário (OC). A forma do espectro de absorção e sua primeira derivada são mostradas na Figura 13.



**Figura 13: Curva de absorção de sua primeira derivada.**

Para valores pequenos de  $B_1$ , quando  $\omega_1^2 T_1 T_2 \ll 1$ , a absorção é caracterizada pela curva descrita pela função lorentziana com a largura a meia altura igual a  $2/T_2$ , ou seja, a largura é determinada pelo tempo de relaxação transversal. Na escala de frequência angular, a forma normalizada da função para uma linha ressonante centrada em  $\omega_0$  é escrita como

$$f(\omega) = \frac{T_2}{\pi} \frac{1}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2} \quad 3.18$$

Na ressonância, onde  $\omega = \omega_0$ , a intensidade máxima da absorção diminui proporcionalmente a  $(1 + \omega_1^2 T_1 T_2)^{-1}$ . No entanto, o efeito é menor nas laterais da linha de absorção. Como consequência, a saturação altera a forma da linha de ressonância no estado estacionário, suprimindo a parte central em

relação às laterais e produz um alargamento aparente do espectro. Uma vez que o tempo de relaxação  $T_1$  faz parte da equação de saturação, esta pode ser usada em RPE-OC para determinação de  $T_1$  [118]. Quanto menor o tempo de vida ( $T_1$ ) do estado excitado maior será a largura de linha, ou seja, tempos curtos levam a linhas largas [115].

Devido a grande sensibilidade do método de RPE, concentrações tão baixas como  $10^{-6}$  M de espécie paramagnética podem ser detectadas em casos favoráveis. Geralmente concentrações de  $5 \times 10^{-5}$  a  $10^{-4}$  M são usadas em estudos envolvendo radicais nitróxidos [115].

### 3.2.5 Interação Nuclear Hiperfina

A interação de um elétron desemparelhado com o campo magnético é somente uma das formas pelas quais a interação magnética pode manifestar-se em um espectro de RPE. Esta interação geralmente resulta em espectros bem caracterizados na forma de uma única linha de RPE em líquidos e até três linhas em “pó” sólidos. No entanto, existem outros tipos de interações magnéticas, geralmente de menor energia, que produzem características adicionais no espectro de RPE chamadas de estrutura fina e hiperfina. Estas surgem das interações magnéticas com núcleos magnéticos próximos e interações magnéticas com outros spins eletrônicos [118]. Tais núcleos geram seu próprio campo magnético, o qual interage com o campo magnético externo e divide o sinal em  $2I + 1$  linhas, onde  $I$  é o spin do núcleo [120].

A interação hiperfina é descrita pelo hamiltoniana:

$$H = S \cdot A \cdot I \quad 3.19$$

onde  $I$  é o spin nuclear, e  $A$  é um tensor de interação hiperfina. A hamiltoniana total consiste de um termo isotrópico (interação de contato de Fermi) e um termo anisotrópico resultante do acoplamento dipolar elétron-núcleo.

A interação de contato de Fermi é dada por:

$$H_{iso} = aS \cdot I \quad 3.20$$

onde  $a$  é a constante de acoplamento hiperfino, a qual depende de  $|\Psi_0(0)|^2$  (quadrado da função de onda que descreve o movimento do elétron calculado no ponto onde o núcleo está). A constante  $a$  é dada pela equação [118]:

$$a = (8/3)\pi g\beta g_I \beta_I |\Psi_0(0)|^2 \quad 3.21$$

A interação hiperfina é puramente isotrópica se o elétron desemparelhado ocupar um orbital  $s$ . Em muitos casos a constante isotrópica  $a$  para um átomo particular é calculada a partir da fração do orbital  $s$  incluído na função de onda molecular do elétron desemparelhado. O acoplamento hiperfino isotrópico também pode ser significativo quando o elétron desemparelhado encontrar-se em um orbital maior  $p, d$  ou  $f$ , e a densidade de spin no orbital  $s$  for induzida pelas interações configuracionais ou através de um mecanismo de polarização de spin [118].

A parte anisotrópica do hamiltoniano hiperfino é produzida pela interação de um elétron e núcleo atuando como dipolos magnéticos. O acoplamento elétron-núcleo ou dipolo-dipolo é descrito pela relação:

$$\hat{H} = -g\beta g_I \beta_I \left[ \frac{\mathbf{S} \cdot \mathbf{I}}{r^3} - \frac{3(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r})(\mathbf{I} \cdot \mathbf{r})}{r^5} \right] \quad 3.22$$

onde  $\mathbf{r}$  é o vetor de ligação do núcleo com os diferentes pontos do orbital do elétron. A integração espacial sobre as coordenadas do elétron em um sistema de coordenadas arbitrário, sendo as componentes do vetor  $\mathbf{r}(x,y,z)$ , determina a hamiltoniana da interação hiperfina anisotrópica na forma

$$H_{\text{ani}} = \mathbf{S} \cdot \mathbf{T} \cdot \mathbf{I} \quad 3.23$$

As componentes do tensor  $\mathbf{T}$  são dadas por:

$$T_{ij} = -g\beta g_I \beta_I \left\langle \frac{r^2 \delta_{ij} - 3r_i r_j}{r^5} \right\rangle \quad 3.24$$

onde  $r_i, r_j = x, y, z$ . Essa forma do tensor hiperfino mostra que ele depende da distância entre o elétron e o núcleo e pode fornecer informação sobre sua localização espacial relativa.

Uma característica importante do tensor hiperfino anisotrópico é o sistema de coordenadas dos eixos principais no qual esse tensor é diagonal. A determinação desta grandeza no sistema de coordenadas é fundamental nos experimentos de ressonância magnética. Como a interação é entre dipolos, a força da interação mostra uma dependência angular forte e, portanto, pode fornecer informações sobre a orientação relativa do elétron com relação ao núcleo [118].

### **3.2.6 O método de marcadores de spin**

A RPE tem sido largamente utilizada no estudo não somente de espécies intrinsecamente paramagnéticas, mas também de radicais livres intermediários formados em reações bioquímicas. Grande parte dos sistemas biológicos de interesse não apresenta centros paramagnéticos, tornando-se necessária a utilização de sondas específicas, usualmente conhecidas como marcadores de spin. Estas sondas são radicais livres estáveis que podem ser ligados a sítios específicos de uma molécula em um determinado sistema e a espectroscopia de RPE fornecer informações sobre o ambiente onde o marcador está inserido. Os marcadores de spin são amplamente empregados devido à grande sensibilidade do espectro de RPE à sua mobilidade, bem como à extraordinária estabilidade química do fragmento paramagnético, geralmente o radical nitróxido, mesmo quando submetido a condições extremas de pH e temperatura [121].

O método de marcador de spin foi proposto por McConnell em 1965 [113] e, desde então, vem contribuindo de maneira significativa para o estudo de propriedades conformacionais de sistemas macromoleculares. A técnica, em combinação com a RPE, é uma eficiente ferramenta para elucidar estrutura e dinâmicas de biomoléculas em condições próximas às fisiológicas. Pode ser aplicada às moléculas solúveis, como proteínas e ácidos nucleicos, tão bem como proteínas de membrana, solubilizada em detergente ou embebida na

bicamada lipídica [122]. Experimentos com os marcadores de spin foram os primeiros a fornecer evidências diretas sobre os tipos de movimentos característicos dos lipídios constituintes da membrana [123].

Os marcadores de spin mais utilizados são baseados na molécula de nitróxido (Figura 14). Estas moléculas marcadas contêm como parte essencial o fragmento paramagnético  $N\dot{-}O$ , onde o elétron desemparelhado responsável pelo paramagnetismo interage com o núcleo de nitrogênio ( $I=1$ ). Neste caso, existem três orientações igualmente prováveis do spin nuclear em relação ao campo magnético, correspondendo a  $m_I = +1, 0, -1$  (Figura 15).  $m_I$  é a projeção do spin nuclear na direção do campo. Devido a essa interação, o espectro de RPE de um radical nitróxido em solução é um triplete com intensidades muito próximas e iguais distâncias entre as linhas (Figura 16) [115].

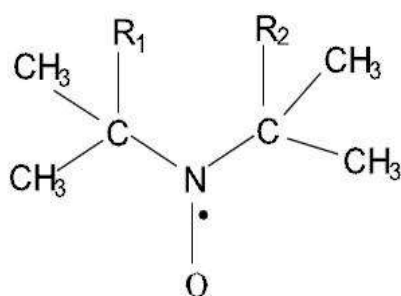


Figura 14: Estrutura molecular geral do radical nitróxido.  $R_1$  e  $R_2$  representam grupos químicos que variam de acordo com o marcador de spin.

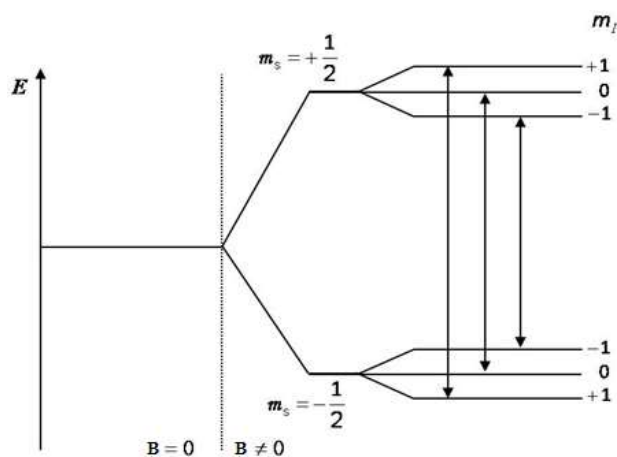
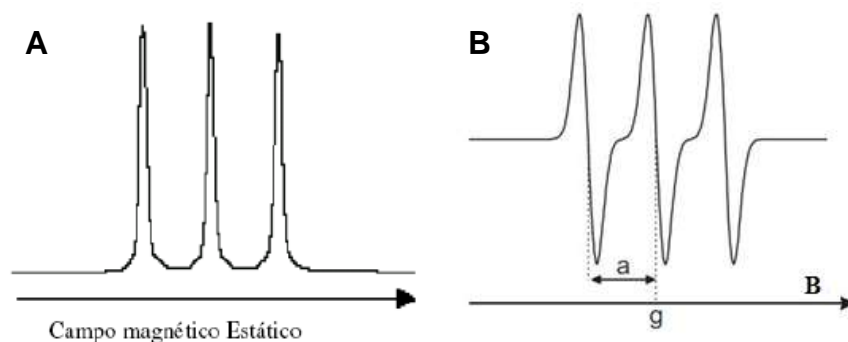


Figura 15: Níveis de energia do elétron desemparelhado do grupo nitróxido ( $N\dot{-}O$ ) na presença de um campo magnético aplicado. O desdobramento dos níveis de energia é causado pela interação entre o momento magnético eletrônico e nuclear do átomo de nitrogênio.



**Figura 16: (A) Espectro de absorção do radical nitróxido; (B) Primeira derivada da curva de absorção.  $g$  define a posição da linha central e  $a$  a constante de desdobramento hiperfino.**

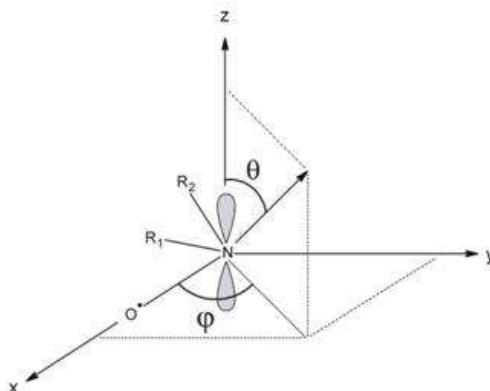
$R_1$  e  $R_2$  na Figura 14, são radicais convenientes para a ligação do marcador à molécula que se quer estudar formando assim os diversos marcadores de spin de radicais nitróxido. Como citado anteriormente, estes radicais apresentam uma grande estabilidade e podem participar de reações químicas sem o envolvimento do elemento paramagnético.

Os nitróxidos podem ser líquidos ou sólidos e apresentar um brilhante colorido que varia do amarelo ao vermelho escuro dependendo do tamanho do anel e dos substituintes ( $R_1$  e  $R_2$ ). A presença dos quatro grupos metilas adjacentes ao fragmento N–O são os responsáveis pela estabilidade adicional dos marcadores formados e impedir que o elétron desemparelhado circule pelo anel piperidínico. Os marcadores nitróxidos são solúveis em meios polares e apolares; em meios polares o átomo de oxigênio forma ligação de hidrogênio e em meios apolares os grupos metilas garantem a sua dissolução [124].

Diversos marcadores de spin baseados no nitróxido foram desenvolvidos como ferramenta para o estudo de sistemas biológicos. Entre eles, destacam-se os marcadores desenvolvidos para o estudo de membranas lipídicas e proteínas. Estes marcadores podem ser ligados covalentemente às proteínas ou serem intercalados fisicamente, no caso de membranas e micelas. Os marcadores de proteínas mais comuns reagem com grupos sulfidrilas (–SH) das cisteínas, tais como N-etil maleimida. Já os marcadores de spin de natureza lipídica são empregados para o estudo de membranas modelos e biológicas. Estes são intercalados fisicamente, em baixa concentração, tornando-se mais um constituinte da porção lipídica [123]. O sinal de RPE

produzido pelo nitróxido é extremamente sensível à dinâmica molecular, polaridade, viscosidade, acidez, estrutura e ordem do meio.

A anisotropia espectral é a base fundamental da utilidade do método de marcadores de spin. A Figura 17 apresenta o sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando o ângulo formado entre a direção do campo magnético externo  $\mathbf{B}$  e o eixo Z das coordenadas do radical. O desdobramento hiperfino e o fator g que define o centro dos espectros dependem da direção do campo magnético. A anisotropia espectral é normalmente especificada pelos três valores do fator g e da constante hiperfina obtidas nas direções paralelas aos eixos principais:  $A_{ZZ}$ ,  $A_{XX}$ ,  $A_{YY}$  e  $g_{ZZ}$ ,  $g_{XX}$ ,  $g_{YY}$ . Em muitos casos o sistema molecular é simétrico axialmente e os valores principais são designados como:  $A_{\parallel} = A_{ZZ}$ ,  $A_{\perp} = A_{XX} = A_{YY}$  e similarmemente  $g_{\parallel} = g_{ZZ}$  e  $g_{\perp} = g_{XX} = g_{YY}$  [115].



**Figura 17: Sistema de coordenadas do radical nitróxido demonstrando os ângulos formados entre a direção do campo magnético externo  $\mathbf{B}$  e os eixos de coordenadas do nitróxido.**

Esses métodos de análise permitem uma avaliação quantitativa dos espectros de RPE em termos das taxas de movimento rotacional do nitróxido, da molécula marcada, e as limitações ambientais locais para o movimento. O movimento da cadeia lateral contendo o nitróxido, com tempos na escala de  $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  s, resulta em relaxação magnética que determina a forma da linha do espectro de RPE. A dinâmica da proteína marcada, por exemplo, resulta de três movimentos executados pela estrutura proteica: rotação da proteína inteira (“*tumbling*”), rotação em torno das ligações que conectam o nitróxido à cadeia principal da proteína e movimento local da cadeia principal onde o nitróxido se encontra [125].

Entretanto, as proteínas de massa molecular elevada, a contribuição do *tumbling* para o espectro de RPE é pequena. Assim, informações dinâmicas são obtidas apenas pelos movimentos em torno das ligações que conectam o nitróxido à cadeia de aminoácidos e do movimento local da cadeia principal. Nestes casos, os espectros de RPE são geralmente compostos por duas componentes espectrais, com dois tempos de correlação rotacional distintos, que estão relacionadas a diferentes graus de mobilidade do marcador de spin [125].

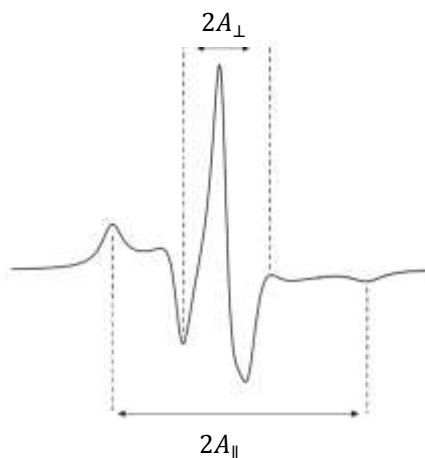
Em uma bicamada lipídica, típica de uma membrana celular, a orientação dos lipídios é limitada por lipídios circundantes e outras moléculas. As taxas de movimento destas moléculas levam ao tensor de difusão rotacional, enquanto que as limitações dos movimentos levam a um parâmetro de ordem ( $S$ ) [126], o qual pode ser dado por:

$$S = \frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{ZZ} - \frac{1}{2}(A_{XX} + A_{YY})} \quad (3.25)$$

onde  $A_{\parallel}$  e  $A_{\perp}$  são medidos diretamente do espectro experimental (Figura 18) e  $A_{XX}$ ,  $A_{YY}$  e  $A_{ZZ}$  são os valores obtidos do espectro rígido (espectro de pó). O parâmetro de ordem experimental é obtido entre zero e um, isto é, quando a ordem dos lipídios na membrana é grande  $S = 1$ , já quando o movimento é completamente isotrópico  $S = 0$ . O parâmetro de ordem é uma medida da orientação molecular em relação a um eixo de referência. Quanto menor for o valor de  $S$ , mais fluída é a região próxima ao centro paramagnético do marcador de spin, ou seja, maior é a sua mobilidade rotacional na membrana na qual se encontra inserido.

Os parâmetros experimentais apresentados,  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ , refletem a anisotropia dos fatores  $g$  e  $A$ . Em solução, os marcadores assumem um regime de movimento molecular rápido. A média dos parâmetros anisotrópicos apresentados anteriormente aparecem com as rápidas flutuações do marcador de spin nesse ambiente fazendo com que não mais se observe a diferença entre os valores de  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ . Nesse regime de movimento, os espectros dos marcadores de spin passam a exibir um caráter isotrópico, onde os tensores  $g$

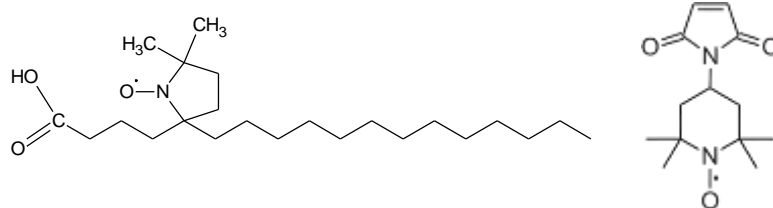
e  $A$  são substituídos pelas médias aritméticas de suas componentes matriciais no sistema de coordenadas do grupo nitróxido.



**Figura 18:** Espectro de RPE de um marcador de spin lipídico obtido em temperatura ambiente com a indicação dos parâmetros espectrais  $2A_{\parallel}$  e  $2A_{\perp}$ .

Vale ressaltar que o movimento molecular mais importante não é o movimento do grupo radical nitróxido, e sim da molécula na qual ele está ligado. Em membranas biológicas, o eixo principal dos marcadores de spin pode assumir todos os possíveis ângulos em relação à direção do campo magnético externo. Sendo assim, o espectro de RPE desses marcadores será uma superposição dos espectros de todas as possíveis orientações das cadeias carbônicas em relação ao campo magnético externo, cujos desdobramentos máximos ocorrerão quando uma determinada população de marcadores de spin possuir suas cadeias carbônicas alinhadas paralelamente ao campo externo, e mínimo quando estiver alinhada perpendicularmente.

Neste trabalho estaremos interessados em apenas dois marcadores, os quais foram desenvolvidos para o estudo de lipídios e proteínas de membrana: o marcador lipídico 5-DSA e o marcador de proteína MAL-6 (Figura 19). O primeiro é uma molécula derivada do ácido esteárico, apresentando o anel radical nitróxido ligado ao 5° carbono da cadeia acil e, intercalado nos lipídios, permite obter informações sobre a fluidez da membrana. O segundo é um marcador de spin derivado do maleimido, o qual se liga covalentemente aos grupos sulfidrilas livres presentes nas proteínas e pode fornecer informações a respeito da conformação e dinâmica destas.



**Figura 19: Marcador de spin lipídico 5-DSA que possui o anel do radical nitróxido ligado ao 5º carbono da cadeia acil e o marcador de proteína MAL-6.**

### 3.2.7 O espectrômetro de RPE

Em RPE-OC, a amostra é posicionada sob um campo magnético linearmente variável, ao mesmo tempo em que é exposta a uma radiação de micro-ondas com frequência fixa. O tipo de experimento determina a estrutura do instrumento de RPE. O espectrômetro de RPE padrão geralmente consiste dos seguintes componentes, nomeados de acordo com sua função: fonte de micro-ondas, cavidade ressonante, ímã, fonte de energia e sistemas de modulação e detecção [118].

A fonte inclui todos os componentes que geram as ondas de micro-ondas, e linhas de transmissão. A Klystron é conhecida por ser uma fonte estável de micro-ondas de alta potência, a qual apresenta pouco ruído, o que lhe dá alta sensibilidade. É a fonte mais frequentemente usada. Outra fonte, utilizada nos espectrômetros mais modernos, é um diodo Gunn. As guias de onda ou cabos coaxiais transmitem micro-ondas para a cavidade onde está a amostra. O controle de frequência automático (CFA) bloqueia a fonte na frequência ressonante da cavidade. Interpostos entre a Klystron e a cavidade estão os seguintes componentes: um isolador, que protege a Klystron da energia da micro-onda refletida; um atenuador, que regula a entrada de energia; e um circulador. O circulador direciona a energia de micro-onda da fonte para a cavidade e simultaneamente redireciona as energias refletidas para o detector [117,127].

O coração do espectrômetro de RPE é o ressonador, também conhecido como cavidade ou suporte de amostra [128]. As cavidades são caracterizadas pelo seu fator de qualidade Q, o qual indica o grau de eficiência da cavidade em armazenar energia da micro-onda. À medida que Q aumenta, a sensibilidade do espectrômetro aumenta. O fator Q é definido como:

$$Q = \frac{2\pi E_{armazenada}}{E_{dissipada}} \quad 3.26$$

onde a energia dissipada representa a quantidade de energia perdida durante um período de oscilação da radiação de micro-ondas. A energia pode ser dissipada nas paredes laterais da cavidade uma vez que as micro-ondas geram correntes elétricas internas que, por sua vez geram calor. Cavidades com  $Q$  elevado são tipicamente usados em RPE-OC porque são eficientes na conversão da magnetização do spin em sinal detectável.

O sistema de detecção normalmente inclui um detector, um pré-amplificador de sinal seguido por um detector sensível à fase, sintonizado na frequência de modulação do campo. O detector é um diodo de cristal de silício em contato com um fio de tungstênio. Ele converte a energia de micro-onda em corrente elétrica contínua. O detector produz um ruído inerente inversamente proporcional à frequência do sinal detectado denominado ruído  $1/f$ . O amplificador aumenta (melhora) o sinal registrado sem, no entanto, alterar significativamente a relação sinal-ruído [129].

Uma melhora significativa na relação sinal ruído é possível graças à adição de um campo magnético alternado, o campo de modulação, ao campo estático (Figura 20). Este campo limita as contribuições do ruído muito próximas à frequência de modulação. Para que isso ocorra na detecção, duas bobinas de Helmholtz impulsionadas por um oscilador são colocadas, uma em cada lado da cavidade, de modo que um campo magnético de pequena amplitude em uma frequência, normalmente igual a 100 KHz, sobrepõe-se ao campo [113].

Esse procedimento transforma o sinal de RPE, no campo de ressonância, em uma onda senoidal com uma amplitude proporcional a inclinação da linha de ressonância. Assim, se a amplitude do campo de modulação a 100 KHz for pequeno comparado a largura da linha ( $\sim < 25\%$ ), o sinal modulado após a detecção sensível a fase aparece como a primeira derivada da intensidade de RPE versus o campo magnético [128]. Para melhorar ainda mais a sensibilidade do equipamento, uma constante de tempo é usada para filtrar o ruído. O sinal processado é digitalizado e um computador é usado para registrar e analisar os dados e para coordenar funções de

temporização de todos os componentes envolvidos na aquisição do espectro. Um desenho esquemático de um espectrômetro de RPE típico de banda-X é mostrado na Figura 21.

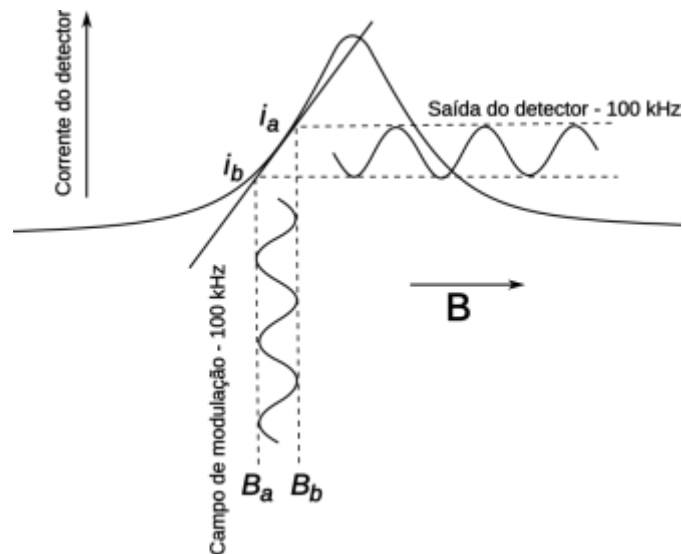


Figura 20: Efeito do campo de modulação de pequena amplitude e frequência de 100 KHz na saída do detector de corrente. O campo magnético estático B é modulado entre os limites  $B_a$  e  $B_b$ , que gera uma variação na corrente do detector entre os limites  $i_a$  e  $i_b$ . O diagrama mostra o sinal de 100 KHz registrado e retificado em função de B. Adaptado de [113].

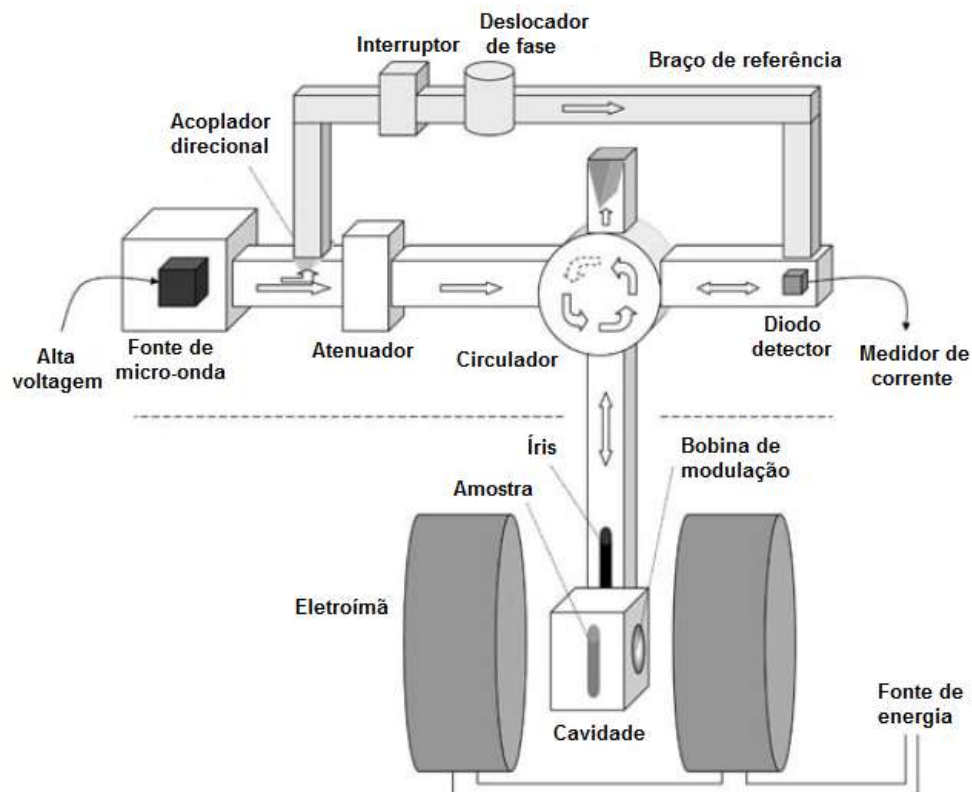


Figura 21: Desenho esquemático de um espectrômetro de RPE típico de banda X. Adaptado de [128].

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Reagentes Químicos

A MT, os marcadores de spin 5-DSA e MAL-6, o MTT, o azul de tripano (trypan blue) e os meios de cultura Grace e RPMI foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Todos os outros produtos químicos utilizados foram do maior grau de pureza possível e os tampões e meios de cultura preparados com água mili-Q.

### 4.2 Parasitos

Foi estudada a cepa de referência da OMS, *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa). O isolado encontra-se estocado, congelado em nitrogênio líquido na forma promastigota procíclica, no *Leishbank* (Banco de leishmanias do Laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses, no Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás (UFG)).

### 4.3 Obtenção e cultivo das amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*

As formas amastigotas foram obtidas a partir de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento. Os parasitos na forma promastigota foram mantidos a 26 °C em meio de cultura Grace, suplementado com 20% de Soro Fetal Bovino (SFB) inativado, 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As promastigotas foram coletadas no 6º dia de cultura, por haver a maior quantidade de metacíclicas infectantes. Isto foi feito por centrifugação a 1400 x g, 10º C por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o concentrado de *Leishmania* foi ressuscitado em meio de cultura Grace (pH 5,5) com os mesmos constituintes descritos acima. Estas foram distribuídas novamente em placas de 24 poços iniciando a cultura com 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL e incubadas a 32 °C por 10 dias [130,131],

para a transformação das formas promastigotas em amastigotas. Após a transformação, as cepas amastigotas foram mantidas realizando repiques uma vez por semana (5<sup>o</sup> ou 6<sup>o</sup> dia de cultura). Sempre que necessário, os parasitos foram passados duas vezes em uma agulha 26 G<sup>1/2</sup> para desagregação dos grumos de amastigotas formados. As quantidades de parasitos foram estimadas utilizando um hematocítômetro.

#### **4.4 Curva de crescimento das amastigotas axênicas**

As amastigotas foram colocados em placas de 24 poços contendo meio Grace completo (pH 5,5) e mantidos à 32 °C. A cultura foi iniciada com 5 x 10<sup>6</sup> parasitos/mL. A quantificação dos parasitos foi feita diariamente durante doze dias, após diluição de uma alíquota da cultura em solução fixadora (tampão fosfato salino – PBS, contendo 0,2 % de paraformaldeído), realizando as contagens em uma câmara de Neubauer. O experimento foi realizado com seis poços independentes (n = 6) e os resultados foram expressos em número de parasitos/mL em função do dia em que a contagem ocorreu.

#### **4.5 Obtenção das células peritoneais**

Para a obtenção das células peritoneais, inoculou-se, por via intraperitoneal, 2 mL de tioglicolato a 3% em camundongos Balb/c, para estimular os macrófagos desta região [132]. No 5<sup>o</sup> dia de estímulo, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e, posteriormente, exposta a cavidade peritoneal. Injetou-se 10 mL de PBS (pH 7,2) estéril e gelado com auxílio de uma seringa na cavidade peritoneal dos camundongos. Em seguida, fez-se uma massagem abdominal a fim de homogeneizar a suspensão celular, a qual foi obtida com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para tubo falcon mantido em gelo. Este protocolo está de acordo com um projeto de pesquisa aprovado no comitê de ética em pesquisa médica, humana e animal da UFG sob o nº 125/2004. As células foram sedimentadas por centrifugação a 600 x g, 10 min, 4 °C e ressuspensas em 2 mL de solução hemolítica, sendo levemente agitadas por 2 min, aproximadamente. Então, a solução foi diluída

em PBS, e submetida à centrifugação nas mesmas condições já descritas. Novamente, desprezou-se o sobrenadante e as células foram “lavadas” em PBS por mais duas vezes, para a eliminação completa da solução hemolítica e dos resquícios de hemácias. Após a última centrifugação, dependendo do experimento a ser realizado, as células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI-1640 suplementado ou não com 10% de SFB inativado, e 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, ou em 1 mL de PBS. As células viáveis foram quantificadas em câmara de Neubauer na presença de azul de tripano a 0,1% e mantidas sob refrigeração até o início dos experimentos.

#### **4.6 Preparação e marcação das amostras e tratamento com a MT**

Inicialmente, foi realizado o estudo do efeito da MT nas membranas de *Leishmania* e macrófagos por RPE. Para isto, as amastigotas foram retiradas do meio de cultura (6º dia após o repique) por centrifugação a 1400 x g, 10 °C por 10 min. Em seguida, estas foram ressuspensas em PBS e submetidas à centrifugação novamente. Repetiu-se este processo por mais duas vezes e após a última, os parasitos foram quantificados e a concentração destes acertada para  $2 \times 10^9$  parasitos/mL. O mesmo foi feito para os experimentos em que a concentração de parasitos utilizada foi de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL, porém, nesta concentração, os parasitos foram ressuspensos em meio Grace completo sem SFB, em vez de PBS. Já os ensaios com as células peritoneais, foram realizados com as células em PBS a uma concentração de  $7 \times 10^7$  células/mL.

Para a marcação de cada amostra com o marcador de spin lipídico 5-DSA, uma pequena alíquota deste marcador, diluído em etanol (4 mg/mL), foi adicionada em tubo de ensaio [15,133]. Esperou-se até que todo o etanol presente na solução evaporasse, formando assim, um filme das moléculas de 5-DSA no fundo dos tubos de vidro. Em seguida adicionou-se 50 µL da amostra no tubo e agitou-se brandamente por alguns segundos. O monitoramento da eficiência da incorporação do marcador nas membranas de *Leishmania* é feito

usando a própria espectroscopia de RPE e tem demonstrado que este processo permite uma incorporação eficiente e com distribuição homogênea nas membranas. O tratamento dos parasitos com MT foi feito usando o mesmo procedimento da marcação de spin. Alíquotas da solução de MT em etanol (3,15 ou 100 mg/mL), foi adicionada aos tubos, e logo após a evaporação de todo o etanol, adicionou-se sobre o filme de fármaco, 50  $\mu$ L de amostra previamente marcada com o 5-DSA. Todas as amostras foram introduzidas em capilares, os quais foram selados de um lado e centrifugados a 20000 x g, por 10 min. O sobrenadante foi retirado com o auxílio de uma micro seringa e utilizado para os testes de lise celular. Então, os capilares foram selados do outro lado e levados para as medidas de RPE. Em parte dos experimentos os capilares foram mantidos no congelador (-15 °C) por aproximadamente 15 dias antes das medições por RPE, desde que foi previamente verificado que esta manutenção das amostras no congelador não causa alteração nos espectros de RPE.

Para marcar as proteínas das membranas tanto dos parasitos como dos macrófagos e obter informações destas por RPE foi utilizado o marcador de proteína MAL-6. Este marcador foi diluído em etanol (50 mg/mL) e adicionado às amostras na proporção de 1  $\mu$ L para cada 100  $\mu$ L de amostra. Agitou-se levemente e deixou reagir por 2 horas a 32 °C para as leishmânias e a 4 °C para os macrófagos. Em seguida, para remover o excesso de marcadores livres na solução, as suspensões de células foram centrifugadas por 8 vezes a 1400 x g, 10 °C por 15 minutos para os parasitos e 600 x g, 10 min, 4 °C para as células peritoneais, sendo os sobrenadantes removidos cuidadosamente em cada lavagem. As amostras, após a última lavagem, foram ressuspensas em PBS e tratadas com MT da mesma forma já descrita anteriormente. Foram introduzidas em capilares, os quais foram selados e centrifugados. Nestas amostras, o sobrenadante foi retirado dos capilares e introduzido em outros para detecção de presença de proteínas. O precipitado de células foi congelado após os capilares serem completamente selados e também mantidos no congelador até as medidas de RPE.

## 4.7 Lise e ruptura celular

Os sobrenadantes retirados das amostras marcadas com 5-DSA e tratadas com MT foram utilizados para os testes de quantificação de lise celular, os quais foram realizados usando um kit comercial (Sigma) com base na reação do ácido bicinconínico (BCA). O método do BCA baseia-se na conversão de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^{1+}$  em condições alcalinas (reação de Biureto). Essa conversão é influenciada por quatro resíduos de aminoácidos (cisteína, cistina, tirosina e triptofano) e pela ligação peptídica, portanto, é função direta da concentração de proteína. Após a redução de  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^{1+}$ , duas moléculas de BCA reagem com um íon  $\text{Cu}^{1+}$  formando um complexo de cor roxa que absorve em 562 nm. A concentração de proteína presente em uma solução pode ser quantificada pelo espectro de absorção. Os valores da absorbância são diretamente proporcionais à quantidade de proteínas presente na solução.

Assim, as amostras com células (leishmânias ou macrófagos) rompidas apresentam fragmentos de membranas e proteínas do citoplasma em seu sobrenadante. Estas proteínas reduzem o  $\text{Cu}^{2+}$  em  $\text{Cu}^{1+}$ , o qual reage com o BCA permitindo quantificar a lise celular. Quanto maior a quantidade de células rompidas, maior a quantidade de proteína no sobrenadante, portanto maior a absorbância.

A ruptura das membranas celulares também foi analisada através das intensidades dos espectros de RPE obtidos com os sobrenadantes das amostras marcadas com MAL-6 e tratadas com MT [15]. A intensidade do sinal de RPE é obtida a partir da área sob a curva de absorção, e é proporcional à concentração de marcadores de spins presentes na solução. Neste caso, os marcadores de spin MAL-6, ligados às proteínas dos fragmentos de membrana presentes no sobrenadante, devido à lise celular, geram sinal de RPE. Quanto maior a quantidade de marcadores ligados, ou seja, quanto maior a quantidade de fragmentos de membrana no sobrenadante, maior a intensidade do sinal gerado.

## **4.8 Condições de operação do espectrômetro de RPE**

As medidas experimentais de RPE foram realizadas no Laboratório de Ressonância Paramagnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade de Brasília (Grupo de Nano-estruturas Semicondutoras de Magnéticas - Núcleo de Física Aplicada). Utilizou-se um espectrômetro Bruker Bio Spin equipado com uma cavidade ressonante ER4102ST operando em banda-X (9,4 GHz aproximadamente) seguido dos seguintes parâmetros: frequência e amplitude de modulação, 100 kHz e 1,024 G, respectivamente; potência de micro-onda, 20 mW; varredura do campo magnético, 100 G; tempo de varredura, 168 s e constante de tempo de detecção, 41 s.

## **4.9 Viabilidade celular pelo teste de MTT**

O teste de MTT é um método enzimático que se baseia na atividade de desidrogenases mitocondriais presentes nas células [134]. A viabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do sal MTT, um sal de coloração amarela e solúvel em água, a outro sal denominado Formazan, o qual apresenta uma cor arroxeada e é insolúvel em água. Dessa forma, a redução do MTT a Formazan é diretamente proporcional à viabilidade celular.

Os testes de MTT foram realizados sob duas condições diferentes. Na primeira, o meio de cultura específico para cada tipo de célula (Grace ou RPMI-1640) foi suplementado com 10% de SFB e o tempo de incubação das amostras após o tratamento com MT foi de 24 horas. Na segunda, o meio de cultura não continha SFB e as amostras foram incubadas por 2 horas. Os parasitos diluídos em meio Grace com ou sem SFB, foram tratados com as quantidades requeridas de MT, a qual foi diluída no mesmo meio, formando suspensão. As amostras, preparadas em triplicatas e volume de 100  $\mu$ L, foram distribuídas em placa contendo 96 poços. Deixou-se reagindo por 24 ou 2 horas a 32 °C. Em seguida, foi acrescentado 20  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) em cada poço. A placa foi coberta com papel alumínio e incubada por 4 horas a 32 °C. Após esse período foram adicionados a cada poço 100  $\mu$ L de SDS (duodecil

sulfato de sódio) a 10%, a fim de solubilizar os cristais de Formazan, e as placas foram mantidas na estufa por aproximadamente 18 horas a 36 °C. A absorbância foi lida no leitor de ELISA a 550 nm. A absorbância obtida pelas células controles, células não tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular. As mesmas condições e procedimentos foram mantidos para as células peritoneais, exceto o meio de cultura e a quantidade de soluções utilizadas. Neste caso, as células foram diluídas em meio RPMI-1640, suplementado ou não com SFB. Inicialmente, foi adicionado a cada poço 200 µL de suspensão (células/MT/meio) e após as 24 ou 2 horas de incubação, 10 µL de MTT. Para finalizar, o volume de SDS acrescentado foi 50 µL. Aqui, todo o experimento foi realizado em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 36 °C.

#### **4.10 Viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripano**

O azul de tripano é um corante utilizado para ensaios de viabilidade celular, pois permite a distinção entre as células mortas e vivas. Em microscópio óptico, células vivas (viáveis) apresentam um aspecto translúcido e membrana bem definida enquanto que células mortas (não viáveis) incorporam o corante apresentando membranas disformes e núcleo azulado.

Alíquotas de 50 µL de células em meio de cultura (10% de SFB), contendo 10<sup>8</sup> parasitos ou 3,5 x 10<sup>6</sup> células peritoneais, foram tratadas com as concentrações desejadas de MT, a qual estava diluída em etanol. Para a incorporação do fármaco, foi feito um filme deste no fundo de um tubo de vidro. As células foram adicionadas a este filme e então agitadas brandamente, como nas amostras preparadas para as medidas de RPE. Pequenas quantidades das células, já tratadas, foram diluídas em azul de tripano (0,1%), permitindo assim a contagem das células vivas e mortas através de uma câmara de Neubauer. A viabilidade foi calculada dividindo a quantidade de células contadas pela média das quantidades contadas para a amostra controle (sem MT). O resultado foi multiplicado por 100.

#### 4.11 Infecção dos macrófagos

Os macrófagos foram infectados com as amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. Para a infecção das células, foram colocadas lamínulas circulares nos poços de placas de 24 poços, nas quais foram adicionadas  $5 \times 10^5$  células em 200  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB. As células ficaram a temperatura ambiente por 40 min para aderirem às lamínulas. Em seguida acrescentou-se 300  $\mu\text{L}$  de meio RPMI-1640 ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) aos poços e deixou incubar em estufa com atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  a  $36^\circ\text{C}$  por 2 horas. Enquanto isso preparou-se as leishmânias para a infecção, retirando-as do meio Grace por centrifugação e ressuspensão em meio RPMI-1640. Após as duas horas, os poços foram lavados (3x) com PBS a  $36^\circ\text{C}$  para retirar as células não aderidas. Então, adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo os parasitos na concentração de 5 parasitos/macrófago (5:1), portanto  $2,5 \times 10^6$  parasitos/poço. Em seguida acrescentou-se 400  $\mu\text{L}$  de meio em cada poço e a placa foi levada novamente a estufa de  $\text{CO}_2$ , onde permaneceu por toda a noite (“overnight”). No dia seguinte, lavou-se os poços com PBS (3x) para retirar os parasitos que não infectaram os macrófagos. E então, as células foram tratadas com as quantidades requeridas de MT diluída em meio RPMI-1640 com 10% de SFB ou em meio sem SFB, dependendo do experimento. A MT agiu nas células por 10, 30, e 120 min. Após este tempo, os poços foram lavados novamente (3x) com PBS. As lamínulas foram coradas utilizando a coloração panótico e coladas em lâminas para a visualização em microscópio óptico.

#### 4.12 Análise estatística

Todos os dados apresentados estão expressos como a média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram comparados através de uma análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para diferenças estatisticamente significativas com  $P < 0,05$ .

## 5 Resultados

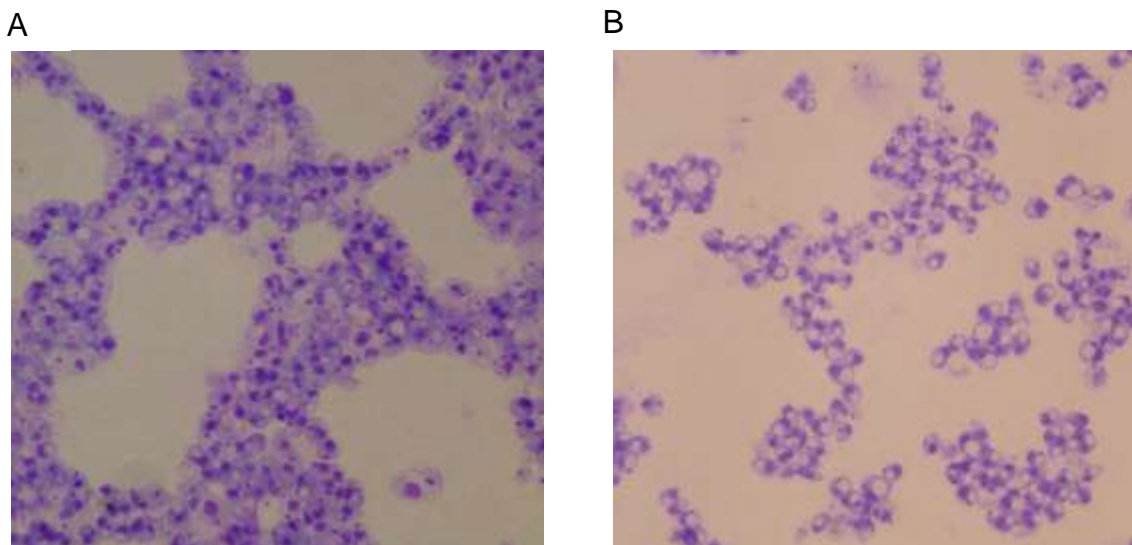
### 5.1 Protocolo para obtenção e manutenção das amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*

Inicialmente, foi desenvolvido o protocolo para a obtenção das amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. O protocolo foi desenvolvido baseado nos trabalhos de Teixeira, M.C.A. *et al.* [130], Cysne-Finkelstein, L. *et al.* [131] e Hodgkinson, V.H. *et al.* [135]. Segundo Cysne-Finkelstein, L. e colaboradores [131], a diferenciação *in vitro* das promastigotas em amastigotas está diretamente associada à metaciclogênese das promastigotas. Eles observaram que a cultura contendo, originalmente, uma grande quantidade de formas metacíclicas (73%), submetidas ao processo completo de diferenciação, resultou em uma cultura com 100% de amastigotas sem contaminação com formas promastigotas.

Além da metaciclogênese, a temperatura e as características do meio de cultura também são fundamentais para a diferenciação das leishmânias e são diferentes para cada espécie de parasito [130]. De acordo com os trabalhos [130,131], as melhores condições para obter-se as amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* é em meio de cultura com pH 5,4 ou 5,5 e mantê-las a temperatura de 32°C. Para se obter aproximadamente 97% de amastigotas axênicas desta espécie é necessário de 7 a 10 dias de diferenciação nas condições citadas [130].

Assim, as promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, espécie utilizada neste trabalho, foram coletadas na fase estacionária de crescimento (6º dia), fase em que se há a maior concentração das formas infectantes (metacíclicas). Estas foram colocadas novamente em cultura no meio Grace suplementado com 20% de SFB, pH 5,5 e à temperatura de 32 °C. As leishmânias permaneceram nestas condições por 7 e 10 dias para análise de quantos dias seria necessário para a diferenciação completa dos parasitos. No sétimo e décimo dia, as amastigotas axênicas foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em PBS e aderidas em lâminas através de uma cito spin. Em seguida, foi feita a

coloração panótico dos parasitos e retiradas imagens para confirmar a diferenciação. A seguir se encontram duas das imagens obtidas (Figura 22):



**Figura 22: Amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). Promastigotas cultivadas a 26°C em meio Grace completo foram coletadas na fase estacionária de crescimento e colocadas novamente em cultura em meio Grace - 20% de SFB, pH 5,5 a 32 °C. As imagens foram obtidas no sétimo (A) e décimo (B) dias de cultura por coloração panótico através de um microscópio óptico.**

Nota-se que com 7 dias (Figura 22A) ainda há leishmânias se diferenciando em amastigotas, havendo contaminação com algumas promastigotas. Com 10 dias (Figura 22B) as formas arredondadas e sem flagelo aparente estão bem definidas, mostrando a diferenciação completa das leishmânias e sem contaminação com promastigotas. Portanto, a cultura de amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* foi iniciada sempre após 10 dias de diferenciação.

Para conhecer a fase logarítmica de crescimento dessas amastigotas axênicas foram feitas curvas de crescimento com contagem diária dos parasitos em hematocitômetro por 12 dias. Foram feitas 6 curvas independentes (Figura 23), iniciando a cultura com  $5 \times 10^6$  parasitos/mL. As amastigotas se multiplicam por 7 dias e, então, entram na fase estacionária de crescimento apresentando, inclusive, morte de parasitos. Devido a isso, as amastigotas axênicas foram mantidas com repiques semanais, realizados a cada 6 dias, por, no máximo, 10 passagens.

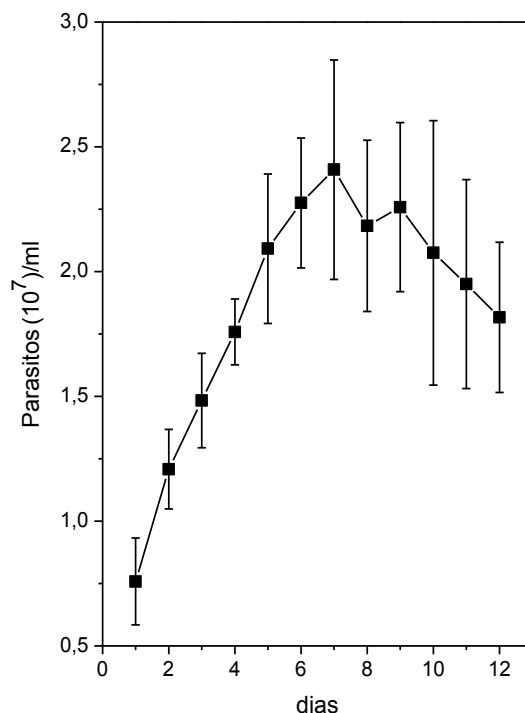


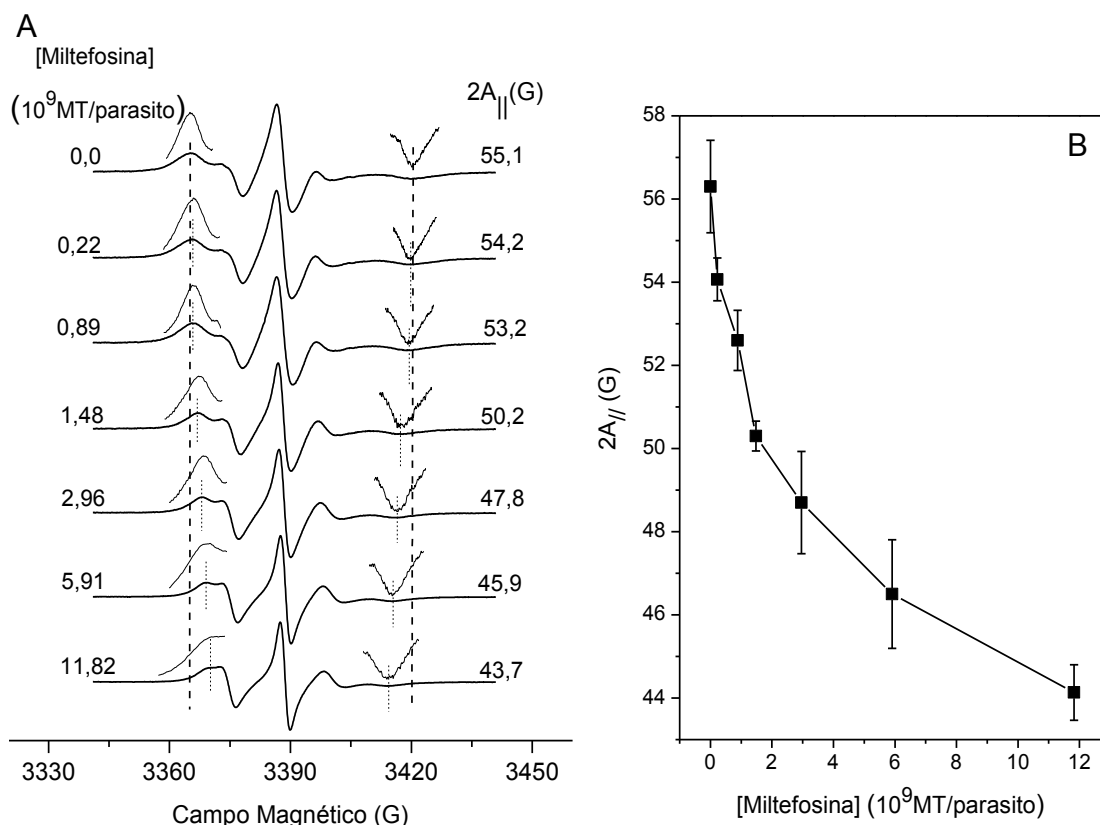
Figura 23: Curva de crescimento *in vitro* das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). Os parasitos foram cultivados em meio Grace completo a 32°C, iniciando-se a cultura com  $5 \times 10^6$  parasitos/mL. A quantificação das leishmânias foi realizada pela contagem diária (12 dias) em hematocítômetro utilizando um microscópio óptico. Os dados representam as médias e desvios padrões de seis curvas independentes.

## 5.2 Efeitos da MT nas membranas de *Leishmania* e macrófago analisados por RPE

### 5.2.1 Marcador de spin 5 – DSA

A ação da MT foi analisada, primeiramente, nas membranas das amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* através dos espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA. A Figura 24A mostra os espectros experimentais e a Figura 24B os valores do parâmetro  $2A_{\parallel}$  do marcador 5-DSA inserido nas membranas de *L. (L.) amazonensis* para diferentes concentrações de MT, obtidos à temperatura ambiente. Os espectros apresentados são de um dos três experimentos realizados para a obtenção da média e desvio padrão dos valores do  $2A_{\parallel}$  mostrados no painel B. A concentração de *Leishmania* utilizada neste experimento foi de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL, mais especificamente,  $10^8$  parasitos/amostra (a amostra continha 50  $\mu$ L), tendo assim uma alta

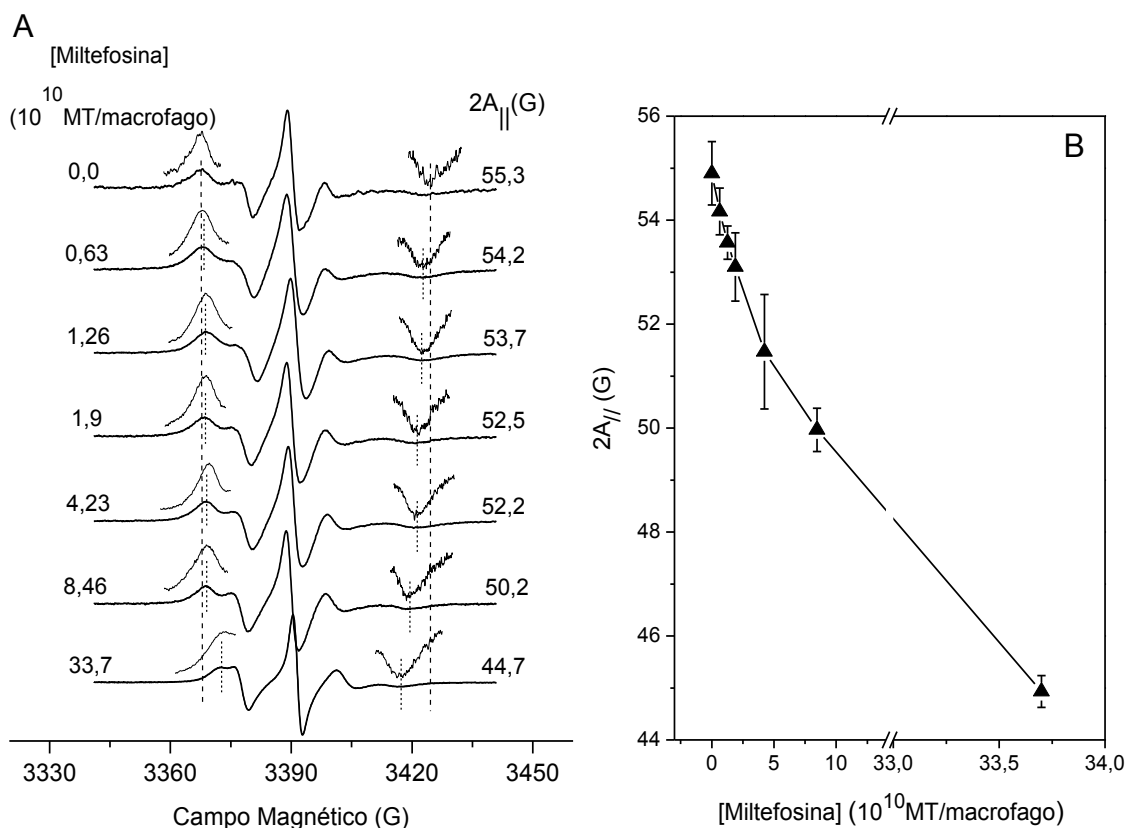
concentração de membrana. Isto foi feito para se obter um bom sinal de RPE. Por isso a concentração de MT é apresentada em número de moléculas por parasito (MT/parasito). Como a MT tem uma grande afinidade por membrana, esta é a forma de se obter um cálculo mais preciso da quantidade de MT que age sobre cada parasito [133].



**Figura 24: (A) - Espectros experimentais de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT; (B) – Valor do parâmetro  $2A_{||}$  do marcador 5-DSA em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em tampão fosfato salino (PBS), foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. Todas as amostras são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $0,89 \times 10^9$  MT/parasito com  $P < 0,01$ .**

Analisando os resultados obtidos, observa-se que com o aumento da concentração de MT há um aumento na fluidez das membranas dos parasitos, ou seja, há uma diminuição no valor do parâmetro  $2A_{||}$  o qual é obtido diretamente dos espectros como mostrado anteriormente. O  $2A_{||}$  é a separação em unidade de campo magnético entre o primeiro pico de ressonância e o último pico invertido do espectro, indicados pelas linhas verticais tracejadas no caso do primeiro espectro da figura. A diferença entre o valor do  $2A_{||}$  obtido para a amostra controle e a amostra com maior concentração de MT ( $11,82 \times 10^9$

$10^9$  MT/parasito) foi maior que 10 G, sendo esta uma diferença significativamente grande, considerando que o erro do equipamento é de apenas 0,5 G. Com  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito a diferença do  $2A_{//}$  foi de aproximadamente 5 G com relação ao controle. Esses resultados mostram que a MT provoca um drástico aumento na dinâmica da membrana da *Leishmania*. O mesmo efeito se observa nas membranas dos macrófagos peritoneais quando estes são tratados com MT, o que pode ser visto na Figura 25.



**Figura 25:** (A) - Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de macrófagos tratadas e não tratadas com MT. (B) - Parâmetro  $2A_{//}$  do marcador 5-DSA em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações iguais ou maiores a  $1,26 \times 10^{10}$  MT/macrófago são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $4,23 \times 10^{10}$  MT/macrófago com  $P < 0,01$ .

A concentração de células utilizadas neste experimento foi  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL, ou ainda,  $3,5 \times 10^6$  macrófagos/amostra. A MT também provocou um aumento na fluidez da membrana dos macrófagos, sendo este efeito muito grande para altas concentrações de MT. A diferença no  $2A_{//}$  para a concentração de  $1,9 \times 10^{10}$  MT/macrófago foi de aproximadamente 4 G com

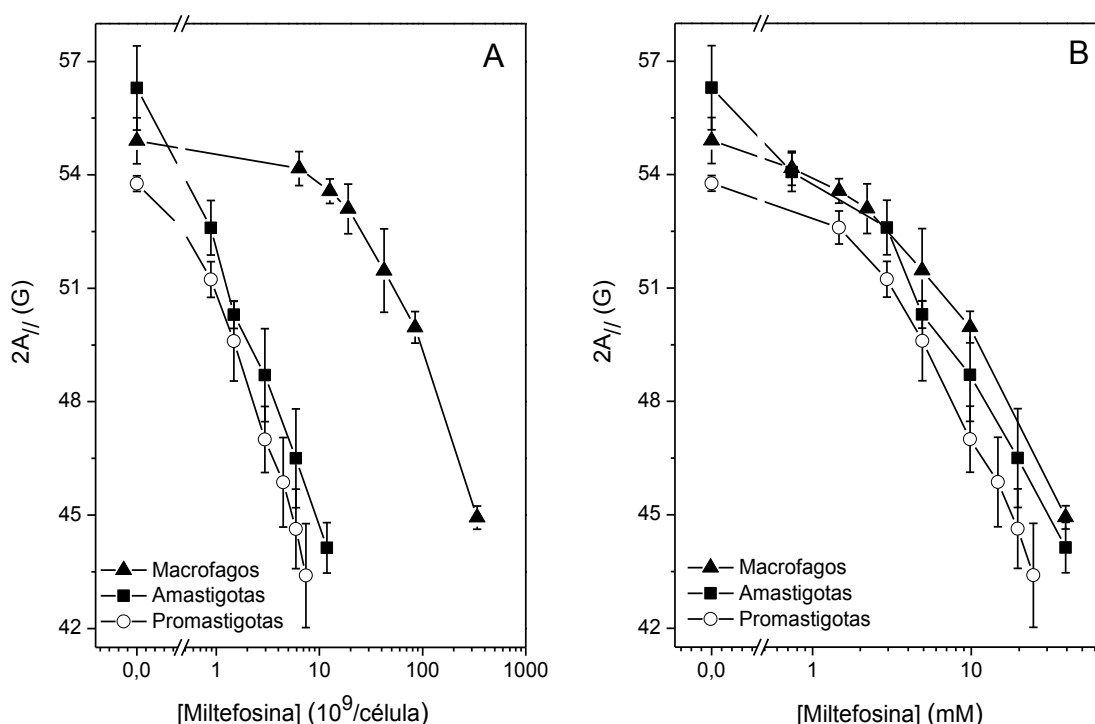
relação ao controle chegando a mais de 10 G para a concentração de  $33,7 \times 10^{10}$  MT/macrófago.

Nota-se que a concentração de MT necessária para se obter um efeito nas membranas dos macrófagos é maior que a concentração que se observa efeito nas leishmânias. Necessita-se de  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito para uma diferença no  $2A_{//}$  de 5 G nas membranas das leishmânias enquanto que para os macrófagos, esta diferença só seria obtida com uma concentração superior a  $4,23 \times 10^{10}$  MT/macrófago, ou seja, ~28,6 vezes mais. Esses resultados podem ser explicados pela diferença no volume de membrana ( $V_m$ ) nas amostras de leishmânias e macrófagos (uma análise em função de  $V_m$  será apresentada no item 5.5).

Para se observar alterações nas membranas por RPE é necessário que estas aconteçam na membrana como um todo e em todas as membranas, pois o que o RPE fornece são médias da mobilidade dos marcadores de spin. Sendo assim, é necessária uma concentração mínima, chamada de concentração crítica, de fármaco na membrana para se começar a observar o efeito por RPE. Como os macrófagos são células maiores, a quantidade de MT necessária para atingir sua membrana e provocar um efeito visível por RPE é maior que a quantidade de MT necessária para um efeito similar nas leishmânias.

Para uma análise melhor destas diferenças no efeito da MT nas membranas das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais, os resultados mostrados anteriormente foram colocados juntos em uma mesma figura (Figura 26A) juntamente com os resultados obtidos por Moreira *et al.* [15] para as promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. E na Figura 26B foram apresentados os mesmos resultados, porém a concentração de MT foi expressa em concentração molar. O eixo das abscissas foi plotado na escala logarítmica para uma melhor visualização dos resultados. Observa-se que a MT também aumenta a dinâmica da membrana das promastigotas. Não há uma diferença significativa entre os valores do  $2A_{//}$  obtidos para as amastigotas e as promastigotas, exceto para as amostras de controle. Para as amastigotas, os valores foram numericamente maiores, enquanto para as amostras controle houve uma diferença de aproximadamente 3 G entre amastigota e promastigota, sendo, portanto, acima do erro experimental (0,5 G). Essa

diferença mostra que a forma amastigota apresenta uma membrana mais rígida que a membrana das promastigotas.



**Figura 26: Interação da MT com membranas de *L. (L.) amazonensis* nas formas amastigota e promastigota e membranas de macrófagos peritoneais. A interação foi avaliada através do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador de spin lipídico 5-DSA. Em (A) a concentração de MT foi calculada em número de moléculas por célula e em (B) em concentração molar (mM).**

A Figura 26A mostra que os macrófagos necessitam de uma quantidade consideravelmente maior de moléculas de MT por célula para se obter um efeito na sua membrana semelhante ao obtido na das leishmânias. O mesmo parece não acontecer em concentração molar (Figura 26B). O gráfico (B), mostra que os efeitos nas membranas dos macrófagos e parasitos foram observados em concentrações de MT similares, entretanto, a concentração de células nas suspensões é diferente. A relação entre a concentração de células e de MT será examinada em detalhes mais adiante. Isto denota que é preciso cuidado ao comparar as concentrações do fármaco, pois são dependentes das condições do sistema em estudo, em especial da concentração de células.

### 5.2.2 Marcador de spin MAL-6

A ação da MT nas proteínas das membranas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais também foi avaliada através dos espectros de RPE do marcador de spin MAL-6. Os espectros de RPE desse marcador são compostos, geralmente, por duas componentes espectrais, tecnicamente chamadas de componentes fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas. Essas duas componentes são resultado do equilíbrio termodinâmico de duas populações de marcadores de spin com diferentes estados de mobilidade. Por simulação, é possível separar essas duas componentes espectrais que se sobrepõem no espectro composto [136]. A Figura 27 mostra um espectro experimental (A) juntamente com um espectro simulado (B), o qual apresenta as duas componentes S e W.

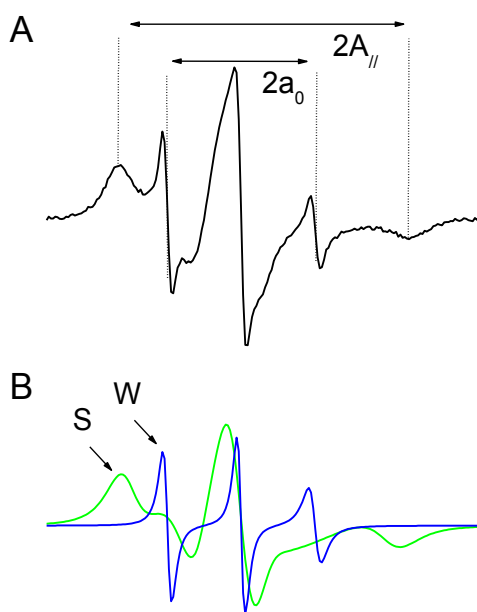
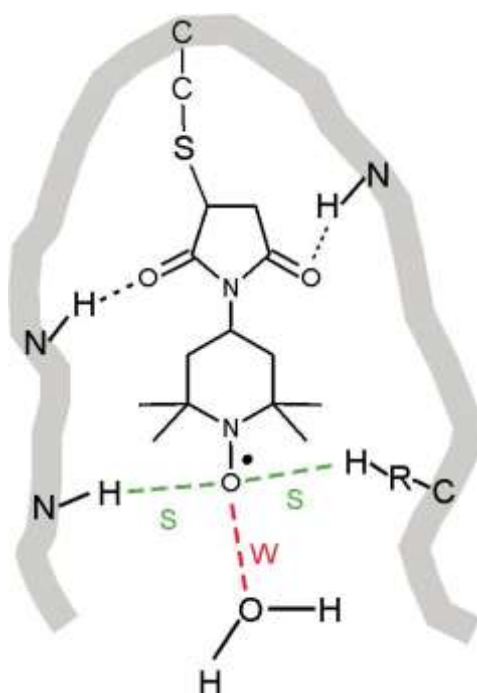


Figura 27: (A) Espectro de RPE a 25 °C do marcador de spin MAL-6 ligado aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana da *L. (L.) amazonensis*. (B) As componentes espectrais fortemente (S) e fracamente (W) imobilizadas obtidas a partir da simulação pelo programa NLLS [136], a qual foi feita usando um modelo de duas componentes espectrais. Os parâmetros, desdobramento hiperfino isotrópico ( $2a_0$ ) e  $2A_{//}$  estão indicados em (A). A escala de varredura do campo magnético foi de 100 G.

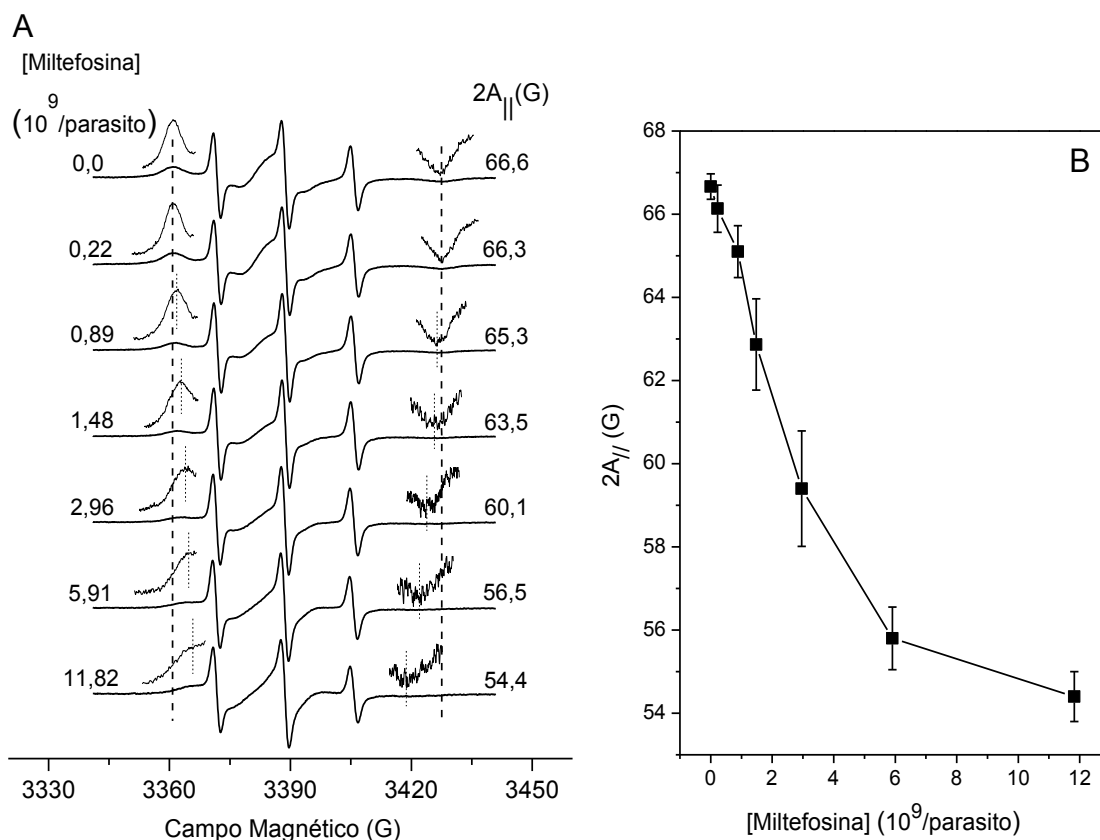
A componente de maior mobilidade (W) apresenta três linhas de ressonância bem definidas tendo um desdobramento hiperfino isotrópico ( $2a_0$ ), o qual é muito sensível à polaridade do solvente onde o radical nitróxido está dissolvido. O valor do  $2a_0$  é o mesmo encontrado para o marcador de spin em

solução tamponada ( $17,1 \pm 0,5$  G), indicando que os radicais nitróxidos ligados aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana da leishmânia que geram o sinal de RPE da componente W ficam expostos ao solvente aquoso [136-138]. A componente de menor mobilidade (S), na escala de tempo do RPE em banda X ( $\sim 9,4$  GHz) para o radical nitróxido, representa uma grande fração do espectro e permite medidas do desdobramento hiperfino das linhas de ressonância extremas do espectro, o parâmetro  $2A_{\parallel}$ . Este parâmetro reflete a mobilidade do marcador de spin para a componente S. Esta componente exibe um tempo de correlação rotacional de aproximadamente uma ordem de magnitude maior que a W, indicando fortes interações entre a cadeia lateral do nitróxido e a estrutura da proteína. Um modelo molecular ilustrando o marcador MAL-6 ligado ao grupo sulfidrilas está apresentado na Figura 28. Além disso, a figura mostra uma possível ligação de hidrogênio entre o nitróxido e a proteína, e também entre os átomos de oxigênio do anel maleimido com a cadeia polipeptídica. Essas ligações podem prender fortemente o marcador à dobra da cadeia polipeptídica explicando a baixa mobilidade deste marcador de spin.



**Figura 28:** Modelo molecular esquemático ilustrando o marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente ao grupo sulfidrilas da proteína. O radical nitróxido pode formar ligações de hidrogênio com o grupo amida da cadeia principal da proteína, gerando a componente fortemente imobilizada (S), ou com as moléculas de água para gerar a componente fracamente imobilizada (W). Os dois átomos de oxigênio do anel maleimido também podem formar ligações de hidrogênio com a cadeia polipeptídica, como indicado na figura [136].

Assim, o marcador de spin MAL-6 fornece informações sobre a dinâmica das proteínas presente nas membranas. A Figura 29A mostra os espectros experimentais para temperatura ambiente e a Figura 29B, os valores do parâmetro  $2A_{||}$  do marcador MAL-6 ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas das membranas de *L. (L.) amazonensis* para diferentes concentrações de MT. Foram mantidas as mesmas condições experimentais descritas anteriormente para o marcador de spin 5-DSA.



**Figura 29: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT; (B) – Parâmetro  $2A_{||}$  do marcador MAL-6 em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações maiores ou iguais a  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,01$ .**

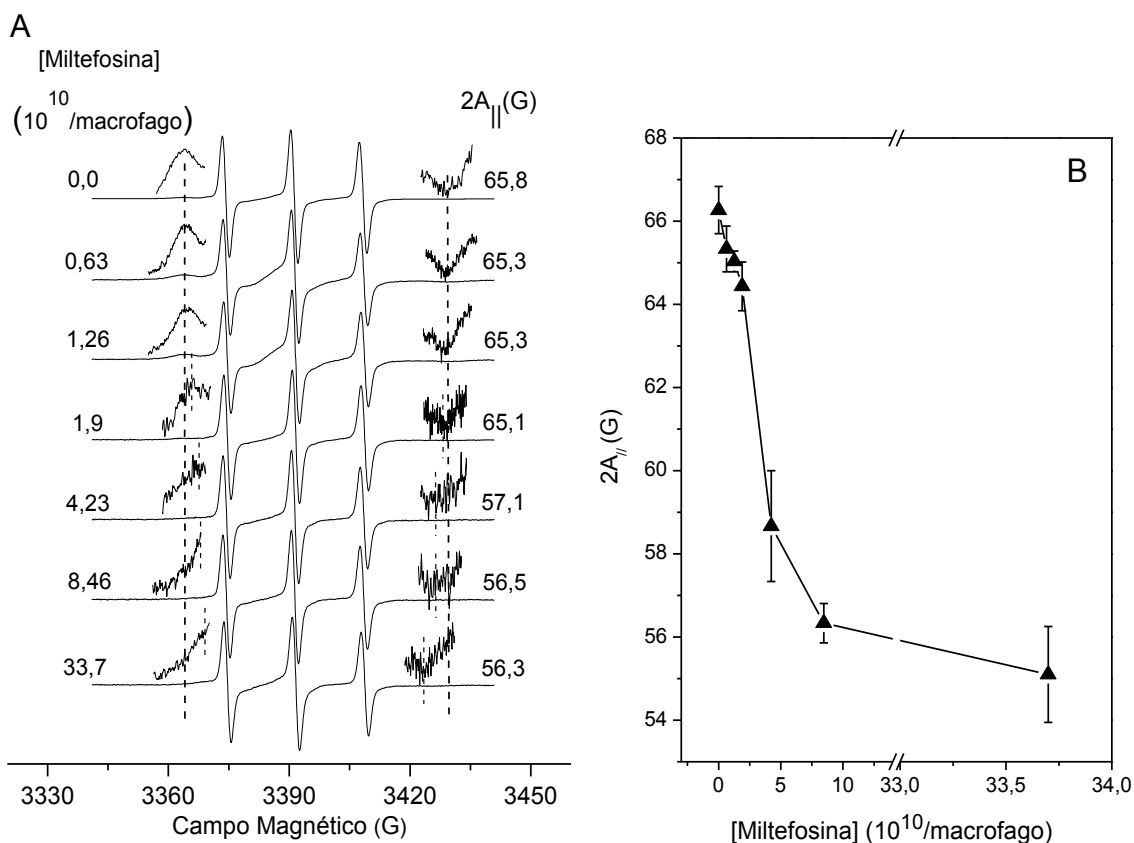
Os espectros obtidos experimentalmente e mostrados na Figura 29A apresentam valores para  $2a_0$  semelhantes aos valores obtidos para o nitróxido dissolvido em meio aquoso. Sendo assim, os grupos sulfidrilas das proteínas da membrana da leishmânia, nos quais os marcadores de spin se ligam, encontram-se na camada externa da membrana, onde podem encontrar

acesso ao ambiente aquoso. Pois, em contato com os componentes do citoplasma (interior da membrana), o radical nitróxido poderia ser reduzido, devido à presença de ácido ascórbico,  $F_e$  (II), entre outros agentes redutores, eliminando o sinal de RPE [15].

A ação da MT na membrana dos parasitos tem como consequência a diminuição da população da componente S, como pode ser visto na Figura 29A. Esse efeito indica que a MT desestabiliza as proteínas da membrana, levando a conformações mais expandidas e expostas ao solvente. Além disso, a MT, em concentrações maiores ou iguais a  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito, provoca um aumento significativo na dinâmica das proteínas da membrana, como indicado pelos valores do parâmetro  $2A_{//}$  da componente S. O espectro da amostra de controle apresentou um valor para o  $2A_{//}$  típico de proteínas em geral, 67 G a 25°C. Esse valor caiu para aproximadamente 54 G na amostra de maior concentração de MT,  $11,82 \times 10^9$  MT/parasito. Houve uma diminuição de mais de 10 G no valor do  $2A_{//}$  desta amostra com relação ao controle e uma perda significativamente grande na intensidade da componente S.

O estudo da interação da MT com as proteínas das membranas dos macrófagos de peritônio de Balb/c utilizando o marcador de spin MAL-6, está apresentado na Figura 30A pelos espectros de RPE e na Figura 30B, pelos valores do  $2A_{//}$  em função da concentração de MT. Nota-se que as formas de linha dos espectros são diferentes das obtidas para os parasitos. A amostra não tratada apresentou um valor menor para o  $2A_{//}$  (~65,8 G) e menor intensidade da componente S. Porém o efeito foi o mesmo, tanto a intensidade de S como o valor do  $2A_{//}$  diminuíram com o aumento da concentração de MT, mostrando assim, um aumento na dinâmica da cadeia polipeptídica das proteínas ligadas à membrana.

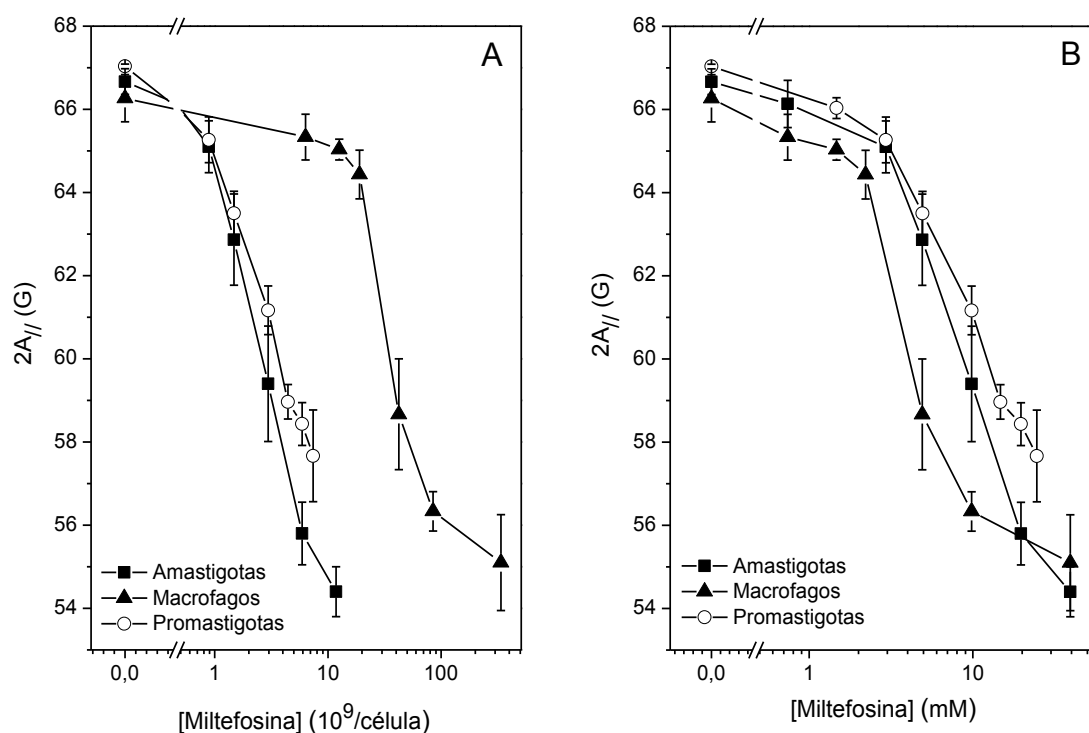
A baixa população de marcadores na componente S deve-se ao fato de marcadores de spin ligados covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas da membrana dos macrófagos apresentar maior contato com o solvente. Com isso, a componente W dos espectros dos marcadores se torna muito mais evidente.



**Figura 30: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana de macrófagos tratadas e não tratadas com MT; (B) – Parâmetro  $2A_{||}$  do marcador MAL-6 em função da concentração de MT. As amostras já marcadas, nas concentrações de  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em PBS, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e transferidas, após 5 min, a capilares para as medidas de RPE. As amostras com as concentrações maiores ou iguais a  $1,26 \times 10^{10}$  MT/macrófago são significativamente diferentes da amostra de controle com  $P < 0,05$  e as amostras com concentrações maiores ou iguais a  $4,23 \times 10^{10}$  MT/macrófago com  $P < 0,01$ .**

Os valores do parâmetro  $2A_{||}$  em função da concentração de MT obtidos para as membranas das amastigotas e células peritoneais, mostrados anteriormente, foram colocados juntos em uma mesma figura (Figura 31) para melhor visualização e comparação da ação da MT. Nesta figura também estão apresentados os resultados obtidos por Moreira *et al.* [15] para as promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Em (A), a concentração de MT foi dada em MT/célula e em (B), em concentração molar. Observa-se que nos três sistemas estudados, a MT aumentou drasticamente a dinâmica das proteínas das membranas, uma vez que os valores do  $2A_{||}$  diminuíram com o aumento da concentração de MT. Em concentrações menores que  $5,91 \times 10^9$  MT/parasito, não houve diferenças significativas entre os efeitos da MT nas proteínas das membranas das amastigotas e promastigotas. Em concentrações maiores ou

iguais a esta, há indicações de que o efeito da MT seja maior nas amastigotas. Para visualizar as mesmas alterações das membranas dos parasitos, os macrófagos necessitam de uma concentração de MT, em MT/célula, significativamente maior. Já em concentrações molares, a diferença entre os três sistemas, são visivelmente menores. A concentração de MT, em mM, que se obtém efeito nos macrófagos é menor que nos parasitos. Lembrando que a concentração de células peritoneais também é menor,  $7 \times 10^7$  células/mL, enquanto que as leishmânias se encontram a  $2 \times 10^9$  parasitos/mL.

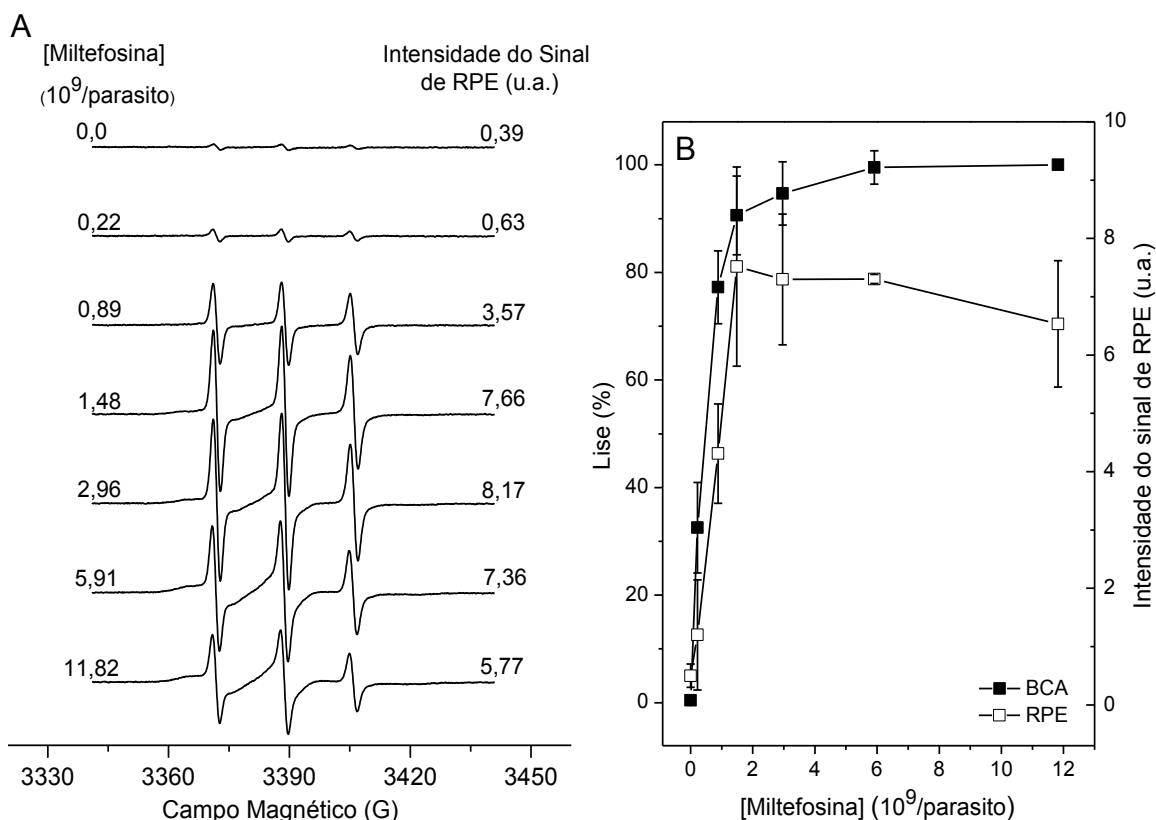


**Figura 31: Interação da MT com membranas de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e com membranas de macrófagos. A interação foi avaliada através do parâmetro  $2A_{//}$  do marcador de spin MAL-6, o qual se liga covalentemente aos grupos sulfidrilas das proteínas de membrana. Em (A) a concentração de MT está expressa em MT/célula e em (B) em concentração molar.**

### 5.3 Lise celular

Simultaneamente aos estudos da ação da MT nas membranas dos parasitos e macrófagos por RPE, foram realizados testes para analisar se o intervalo de concentrações de MT que causa aumento na dinâmica e fluidez das membranas, também as rompem, causando lise celular. Para isso, as amostras já marcadas com MAL-6 e tratadas com MT, foram centrifugadas, e

os sobrenadantes transferidos a capilares para o registro dos espectros de RPE. A Figura 32A mostra os espectros dos sobrenadantes das amostras de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. A intensidade do sinal aumentou com a concentração de MT, atingindo o máximo em  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito. Isso revela um aumento de fragmentos de membrana marcados presentes no sobrenadante das amostras tratadas com MT. Os sinais de RPE obtidos pelas amostras não tratadas se devem, provavelmente, aos marcadores de spins livres que não foram removidos da solução durante a sua preparação. As intensidades dos espectros em função da concentração de MT estão apresentadas na Figura 32B, juntamente com as medições de lise das membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.



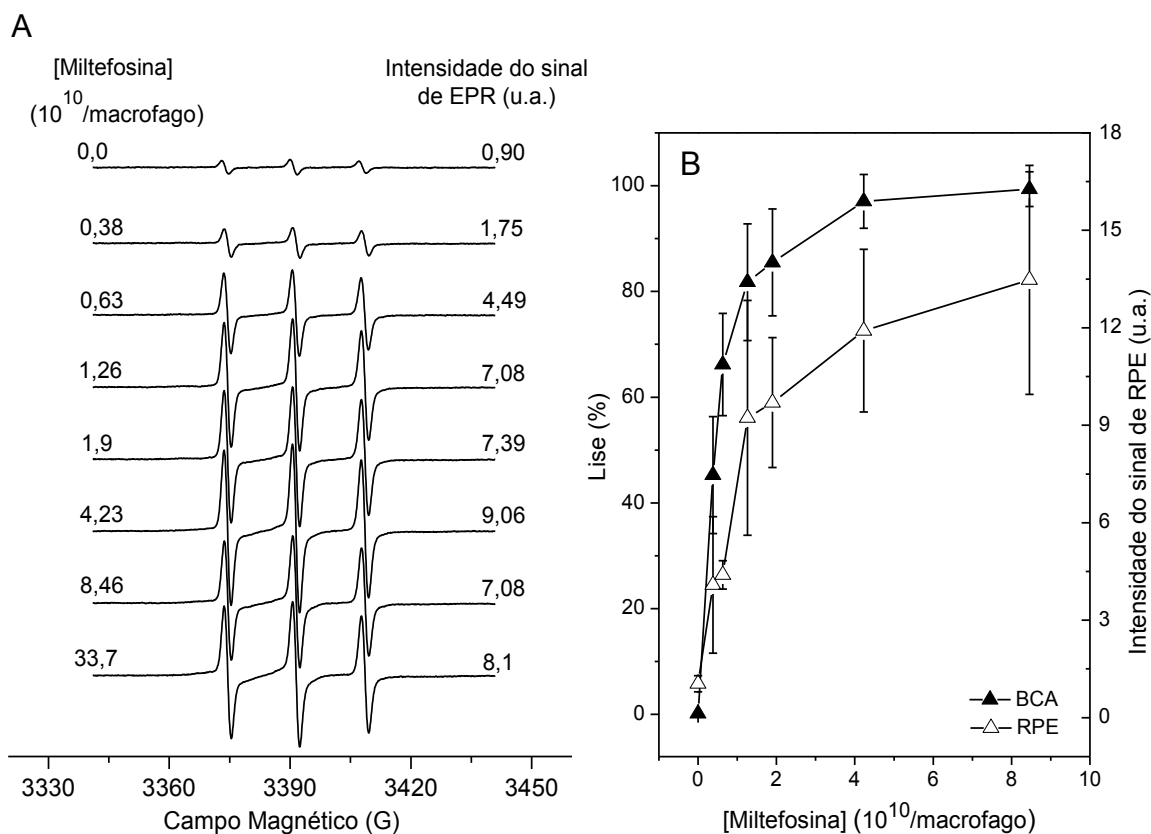
**Figura 32: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalentemente a grupos sulfidrilas das proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras de membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas e não tratadas com MT. (B) - Porcentagem de lise celular (quadrados fechados) e fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante das amostras de *L. (L.) amazonensis* (quadrados abertos) em função da concentração de MT. A concentração de células utilizada foi de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL em PBS. As medições de lise foram feitas pelo conteúdo de proteína no sobrenadante das amostras através da reação do ácido bicinonínico (BCA). O sinal de RPE é proporcional à quantidade de fragmentos de membrana no sobrenadante das amostras.**

A porcentagem de lise foi calculada a partir dos valores de absorvância das proteínas nos sobrenadantes das amostras. As amostras marcadas com 5-DSA foram submetidas à centrifugação, a qual permitiu a coleta do sobrenadante e a medida da concentração de proteínas presentes nesta solução pelo método colorimétrico de BCA. A concentração de proteína no sobrenadante das amostras aumentou com a concentração de MT, indicando um aumento na quantidade de parasitos sofrendo lise celular. O mesmo não acontece com as intensidades do sinal de RPE, os quais se mantêm estável ou diminui em concentrações maiores que  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito. Isso pode ser consequência da redução do radical nítróxido devido ao contato deste com o conteúdo do citoplasma após a lise celular.

Os espectros obtidos a partir de fragmentos de membranas marcadas com MAL-6, presentes nos sobrenadantes das amostras de macrófagos peritoneais se encontram na Figura 33A. E na Figura 33B estão apresentadas as intensidades dos sinais de RPE com as porcentagens de lise das membranas dos macrófagos em função da concentração de MT. Observa-se que a intensidade do sinal de RPE aumenta com a concentração de MT, assim como a quantidade de proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras.

Portanto, as concentrações de MT que causaram aumento na dinâmica das proteínas das membranas de leishmânias e das células peritoneais, também provocaram a lise destas. Além disso, é importante notar que os espectros obtidos para os sobrenadantes das amostras são semelhantes aos apresentados nas Figuras 27A e 30A para concentrações elevadas de MT. Isso mostra que as altas concentrações de MT provocam completa ruptura das membranas, assim, os sinais de RPE obtidos são de fragmentos de proteínas livres.

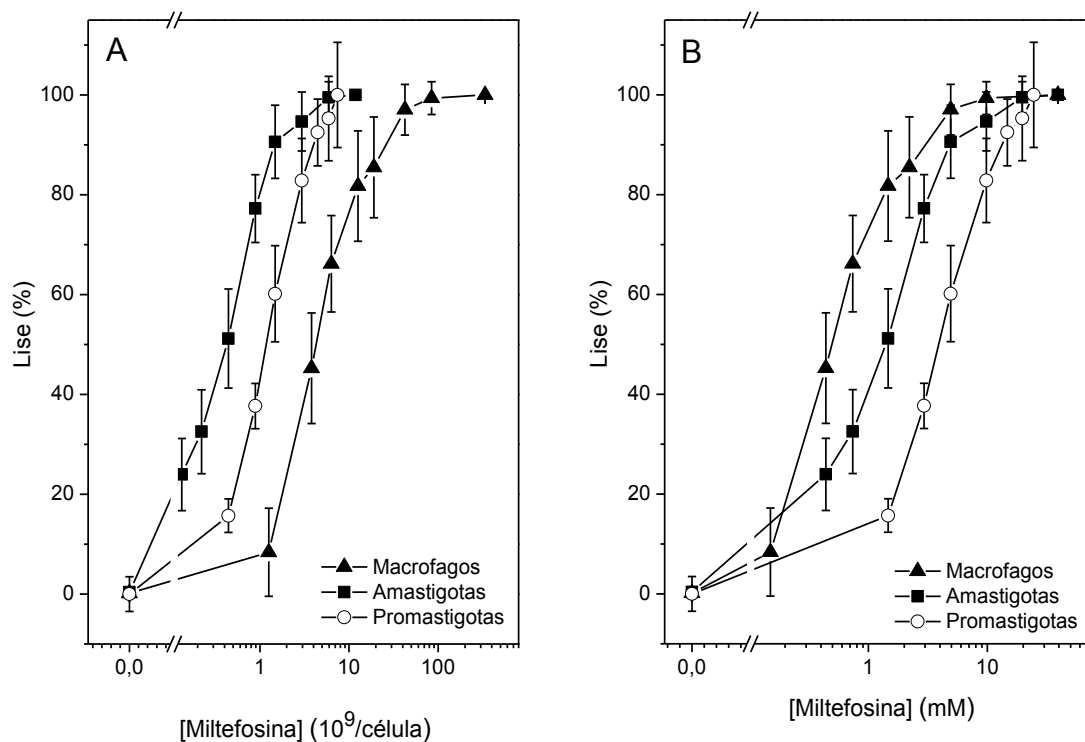
Para comparar a lise provocada pela MT nas membranas das amastigotas e macrófagos e também nas promastigotas [15], os resultados das porcentagens de lise em função da concentração de MT foram colocados juntos na Figura 34, sendo que em (A) a concentração de MT foi dada em MT/célula e (B) em mM.



**Figura 33: (A) - Espectros de RPE do marcador de spin MAL-6 ligado covalente a grupos sulfidrilas das proteínas presentes nos sobrenadantes das amostras de membrana das células peritoneais tratadas e não tratadas com MT. (B) - Porcentagem de lise celular (triângulos fechados) e fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante das amostras de células peritoneais (triângulos abertos) em função da concentração de MT. A concentração de células utilizada foi de  $7 \times 10^7$  células/mL em PBS. As medições de lise foram feitas pela quantificação de proteína no sobrenadante das amostras através da reação do ácido bicinonínico (BCA). O sinal de RPE é proporcional à quantidade de fragmentos de membrana no sobrenadante das amostras.**

Observa-se na Figura 34A que as amostras de parasitos amastigotas apresentaram proteínas no sobrenadante em concentrações menores de MT que as demais células. Os macrófagos necessitaram de uma quantidade maior de fármaco para ter sua membrana rompida o suficiente para se detectar proteínas livres. Quanto às promastigotas, as medições de lise não apresentaram diferenças significativas com relação às amastigotas quando tratadas com elevadas concentrações de MT, ou seja, quando as membranas se encontraram quase ou totalmente rompidas. Os resultados de lise obtidos podem ser explicados pelo tamanho das células, pois as amastigotas tem a menor célula, portanto, uma concentração pequena de MT já a atinge provocando ruptura e assim se detecta as proteínas no sobrenadante. Os

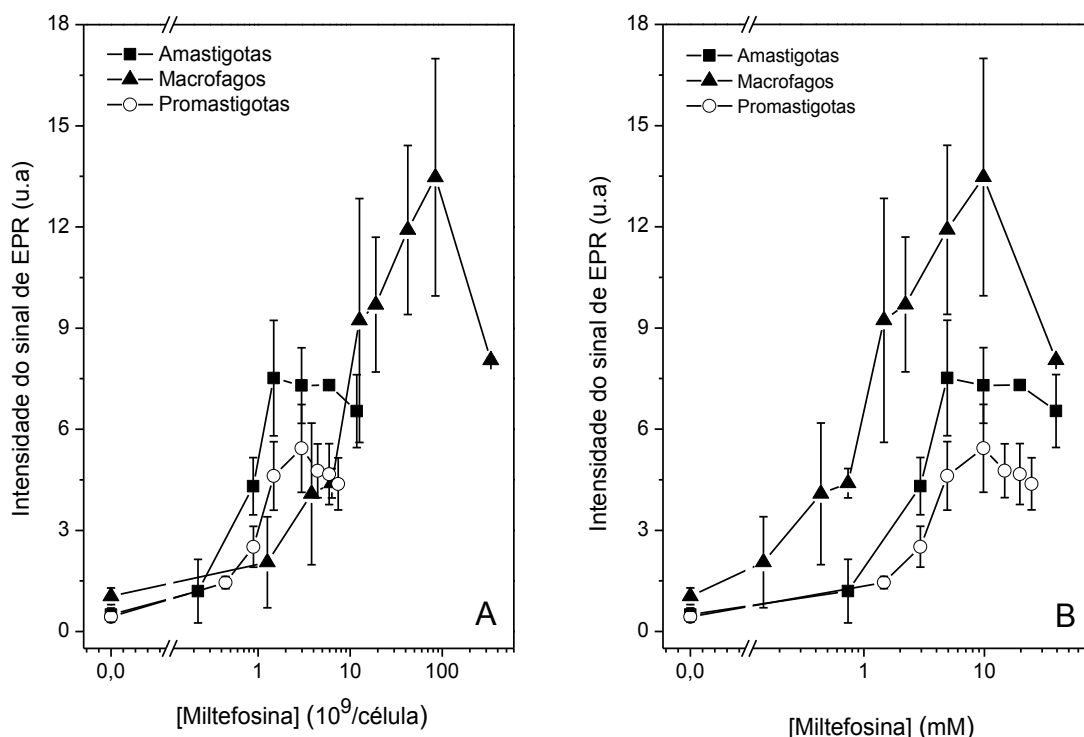
macrófagos, sendo a maior célula, precisam de uma quantidade maior de fármaco para atingir a sua membrana causando lise de tal forma que possibilite a detecção dos fragmentos livres. Na Figura 34B nota-se um comportamento invertido, os macrófagos sofreram lise em concentrações molares de MT menores que as demais células.



**Figura 34: Porcentagem de lise celular em função da concentração de MT das amostras de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e dos macrófagos peritoneais. Em (A) a concentração de MT foi dada em número de MT/célula e em (B) em concentração molar.**

As intensidades dos sinais de RPE obtidos dos fragmentos de membranas marcados em função da concentração de MT dos três sistemas estudados, também foram colocadas juntas em uma mesma figura (Figura 35). Na Figura 35A, a concentração de MT é dada em MT/célula e na Figura 35B em concentração molar (mM). Nota-se que o efeito foi o mesmo do apresentado nas Figuras 34A e 34B, as amostras de amastigotas apresentaram fragmentos de membranas livres com concentrações, em MT/célula, menores que as demais. Em concentrações molares, esse efeito foi invertido, os macrófagos passaram a apresentar proteínas marcadas em concentrações menores que os parasitos.

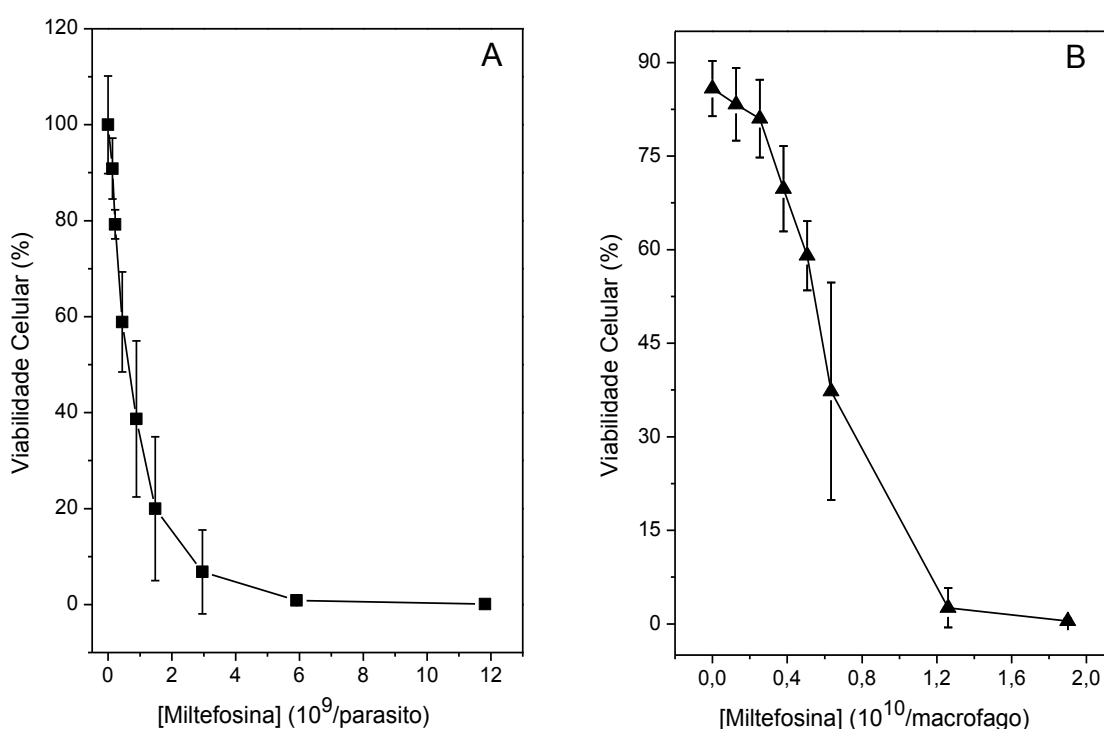
Os experimentos com os parasitos amastigotas e macrófagos foram realizados mantendo as mesmas condições experimentais, assim se possibilita comparar os resultados. As intensidades dos sinais de RPE das amostras dos macrófagos tratados com concentrações elevadas de MT são significativamente maiores que das amostras de amastigotas. Revelando uma quantidade maior de proteínas nas membranas destas células. Já os resultados obtidos com as amostras de promastigotas [15], foram apresentados apenas para comparar o efeito provocado pela MT, pois as condições em que as medidas de RPE foram realizadas podem ter sido diferentes. Importante observar que o comportamento da curva foi o mesmo das amastigotas, a intensidade do sinal aumenta até certa concentração de MT ( $1,48 \times 10^9$  MT/parasito), depois começa a estabilizar ou decair. Os resultados de lise obtidos com RPE foram semelhantes aos obtidos pelo método colorimétrico, mostrando que a metodologia desenvolvida para a técnica de RPE é confiável e pode ser usada para estudos de outros sistemas celulares.



**Figura 35: Fragmentos de membrana marcados com MAL-6 no sobrenadante de amostras de *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e de macrófagos peritoneais, em função da concentração de MT. Em (A) a concentração de MT foi dada em número de MT/célula e em (B) em concentração molar.**

## 5.4 Viabilidade das *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais pelo azul de tripano

Para examinar se as concentrações de MT que causaram alterações na dinâmica das membranas e lise das células também provocam morte celular, foram realizados testes de viabilidade pelo método de exclusão do azul de tripano. As condições experimentais foram as mesmas dos testes de RPE, porém, neste caso, as células estavam em meio de cultura suplementado com 10% de SFB. A contagem das células viáveis foi feita após 5 minutos do tratamento com MT. Os resultados obtidos se encontram na Figura 36. Em (A) está a viabilidade celular, dada em porcentagem, dos parasitos amastigotas e em (B), dos macrófagos.

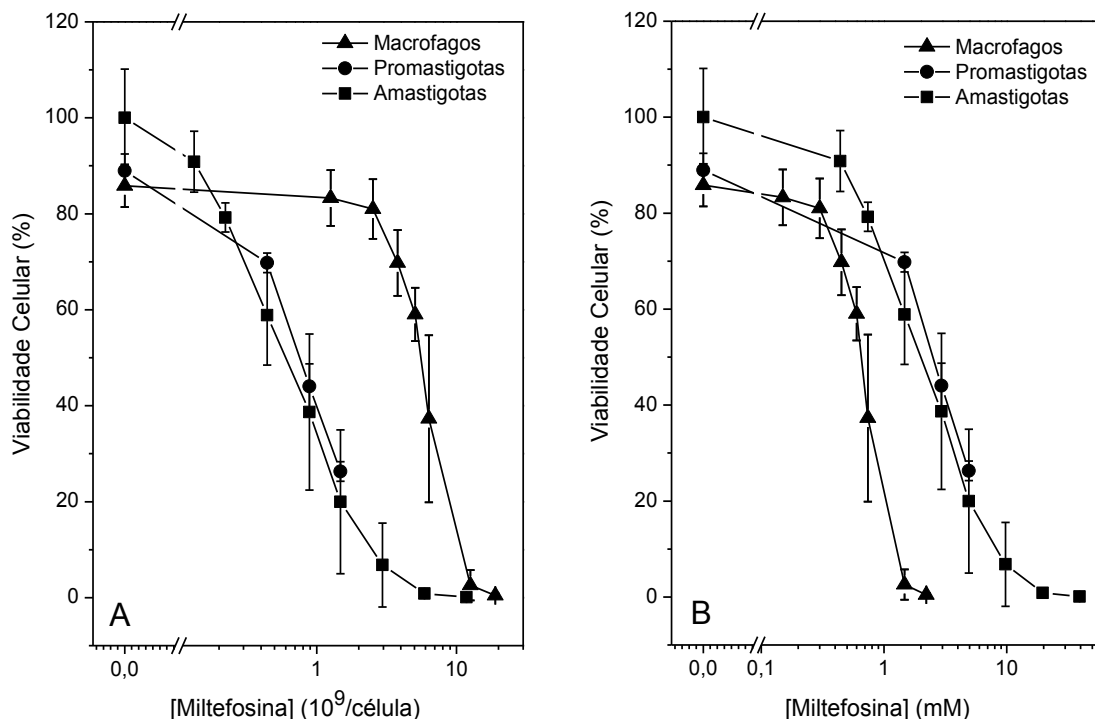


**Figura 36: Contagem de células viáveis nas amostras de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (A) e nas amostras de macrófagos peritoneais (B) pelo método de exclusão do azul de tripano. As células foram tratadas com as concentrações requeridas de MT e a contagem realizada após 5 minutos do tratamento. As concentrações celulares utilizadas foram de  $2 \times 10^9$  parasitos/mL e  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL em meio completo com 10% de SFB.**

Nas concentrações em que houve alterações significativas nas membranas celulares por RPE, uma grande porcentagem das células se encontrava morta. Nas concentrações de  $0,89 \times 10^9$  MT/parasito,

aproximadamente 60% das leishmânias haviam morrido e de  $1,48 \times 10^9$  MT/parasito, esse valor sobe para 80%. As amostras de macrófagos apresentam esta porcentagem de células mortas para a concentração de  $1,26 \times 10^{10}$  MT/macrófago.

Para comparar os resultados de viabilidade celular, foram colocados juntos na Figura 37, os valores obtidos para as amastigotas, promastigotas e macrófagos. Em (A) a concentração de MT foi dada em MT/célula e (B) em mM.



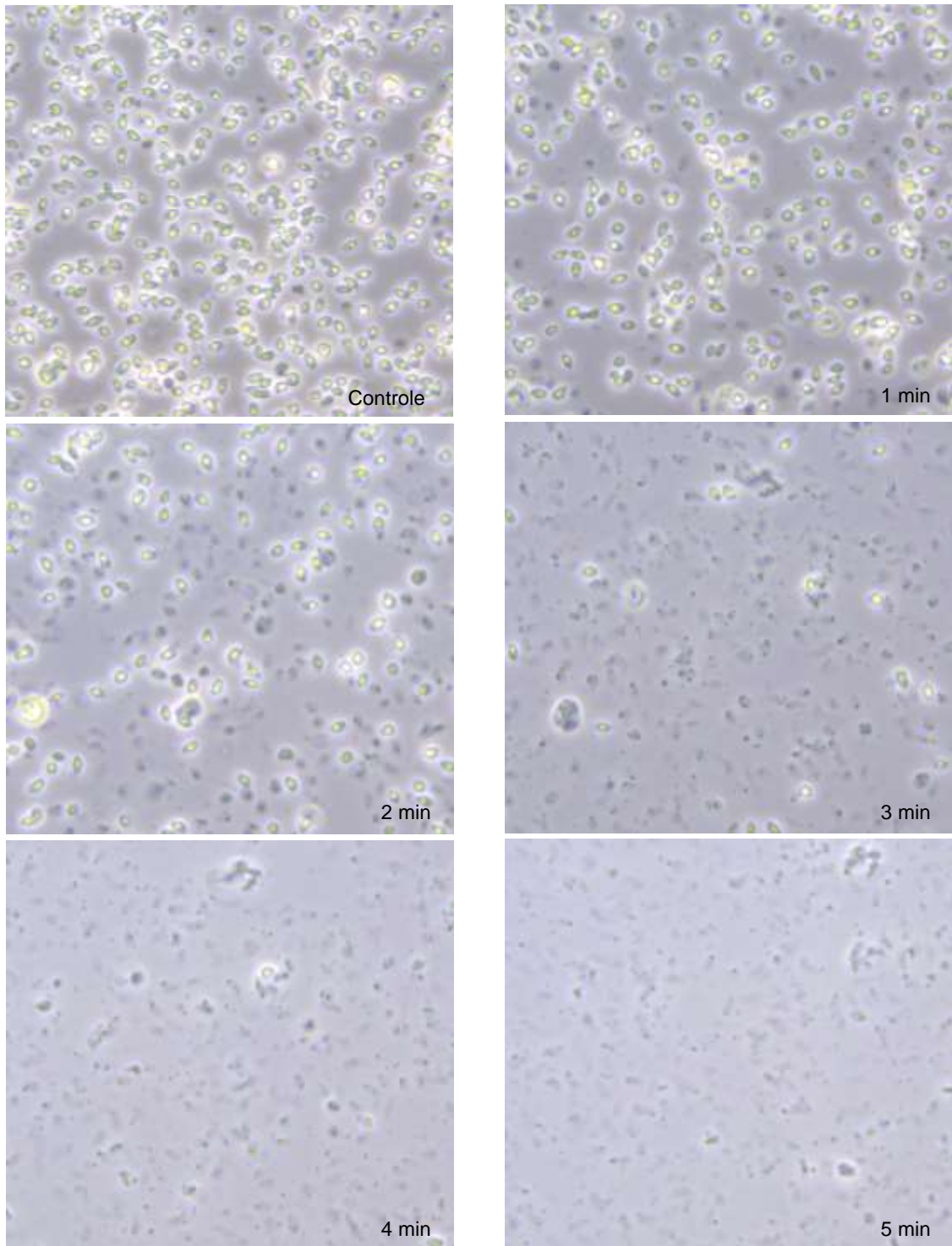
**Figura 37: Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de tripano. As *L. (L.) amazonensis* na forma amastigota e na forma promastigota e os macrófagos peritoneais foram tratados com as concentrações requeridas de MT. A contagem das células viáveis foi feita após 5 minutos do tratamento. Em (A) a concentração de MT foi calculada em MT/célula e em (B) em concentração molar.**

Observa-se que mais de 50% das promastigotas morreram nas concentrações de MT que se obtêm alterações significativas na dinâmica da membrana celular por RPE. Já para a morte dos macrófagos é necessário uma concentração maior de MT, se esta for calculada em MT/célula. Em concentração molar este comportamento é invertido, lembrando que a quantidade de macrófagos utilizada no experimento é menor que as demais.

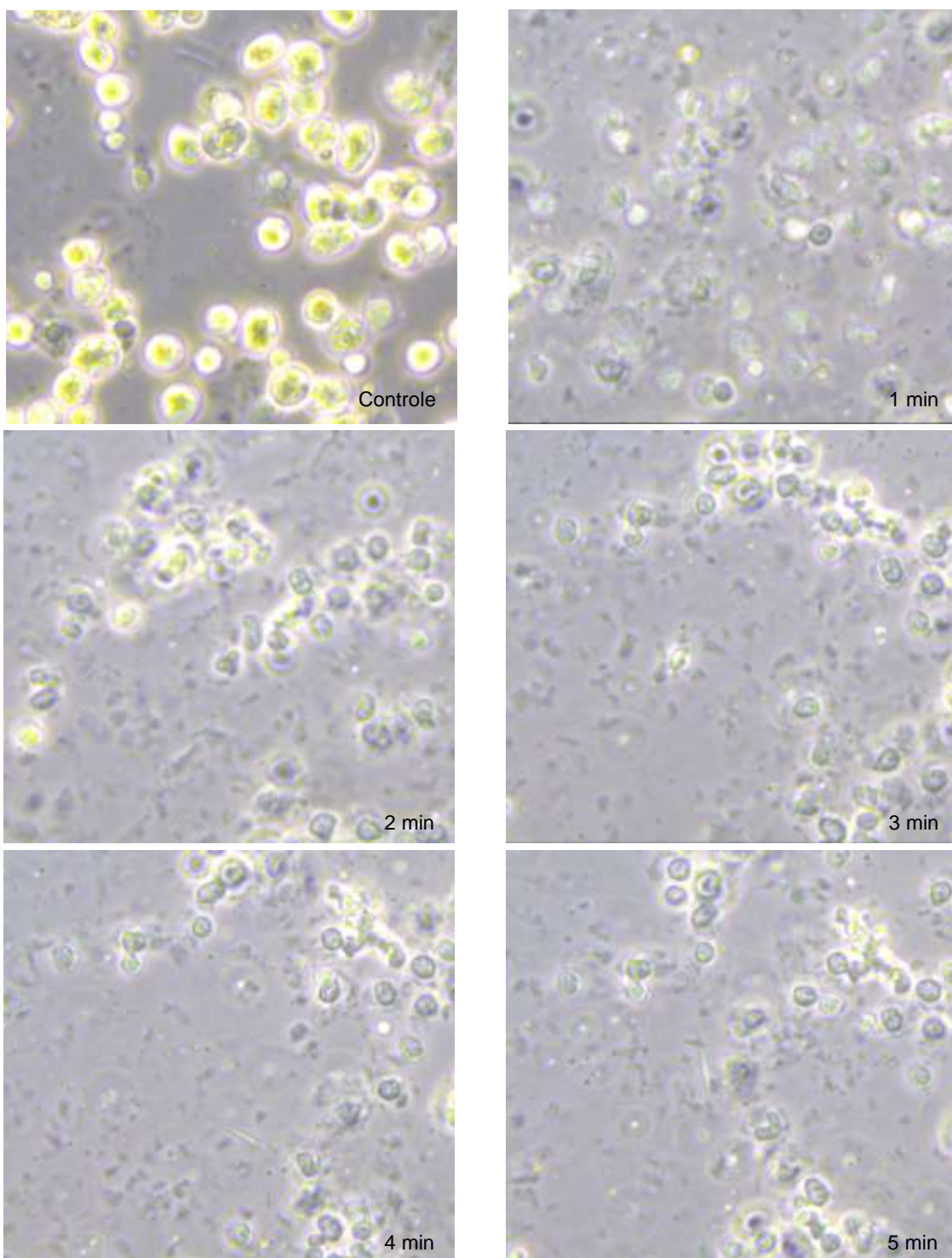
O tamanho das células pode influenciar na visualização daquelas que tiveram suas membranas rompidas permitindo que o azul de tripano

penetrasse. A amastigota, sendo a menor célula, foi destruída rapidamente pela MT. Isso pode ser observado nas imagens a seguir (Figura 38), tiradas a partir de uma câmera acoplada a um microscópio óptico. As amastigotas foram tratadas com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, sendo a primeira da amostra não tratada. A MT foi incorporada às células como nos experimentos de RPE, lise e viabilidade. Após 3 minutos do tratamento se vê poucas leishmânias no meio, após os 5 minutos, praticamente nenhuma. Isto confirma os dados mostrados anteriormente referentes à contagem dos parasitos vivos nesta concentração de MT.

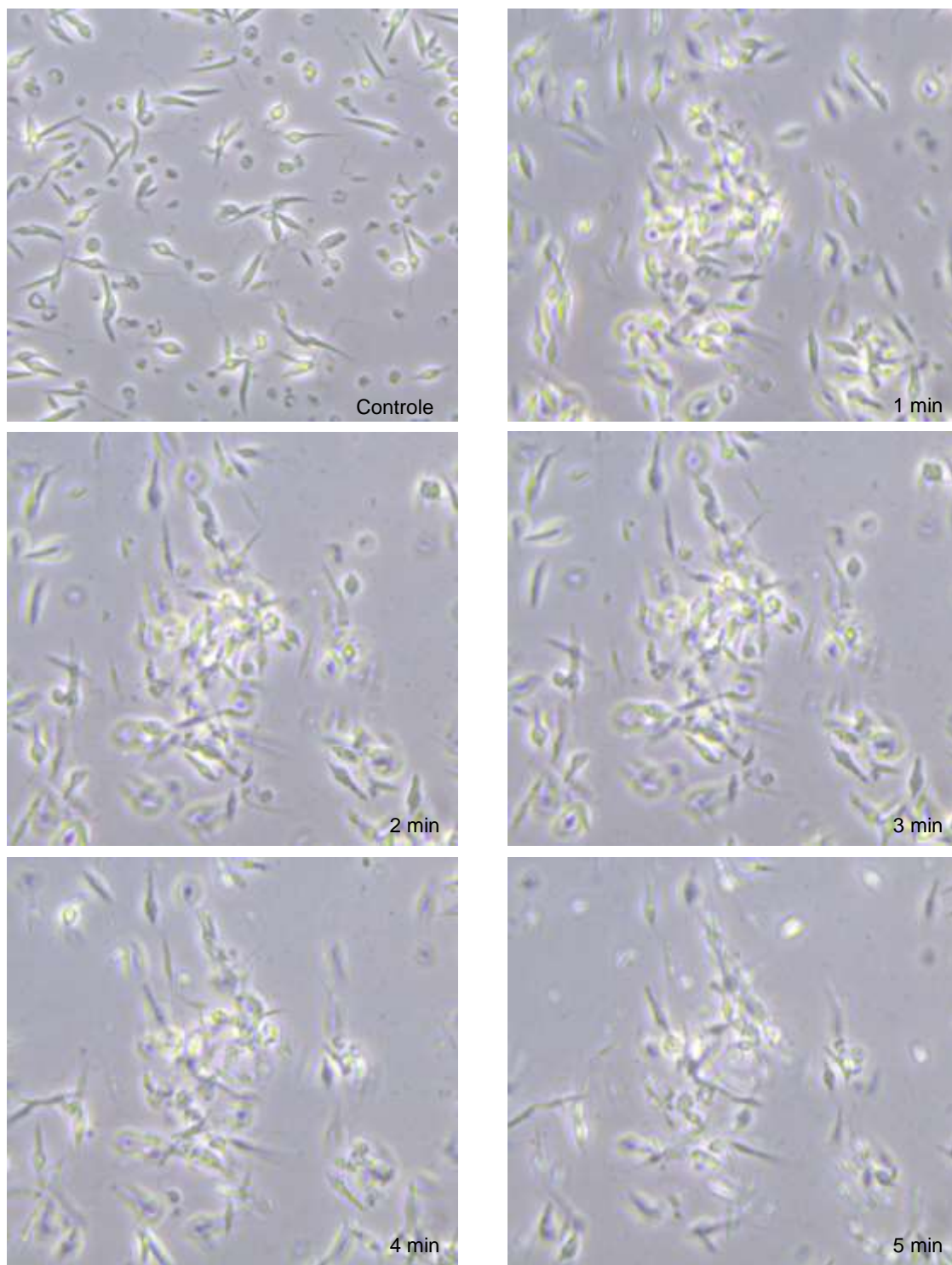
O mesmo foi feito para os dois outros tipos de células. As imagens foram obtidas dos macrófagos tratados com  $0,63 \times 10^{10}$  MT/macrófagos (Figura 39) e das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito (Figura 40). A primeira imagem foi obtida do controle. Pode-se observar a ação da MT sobre os macrófagos no primeiro minuto após o tratamento. Nota-se a presença de muitas células mortas, porém não destruídas completamente, além de muitos fragmentos livres. As imagens obtidas das promastigotas também mostram a mortalidade das células sem o completo desaparecimento destas como foi visto com as amastigotas.



**Figura 38:** Imagens obtidas das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* a partir de uma câmera acoplada a um microscópio óptico. Os parasitos foram tratados com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada.



**Figura 39:** Imagens obtidas de macrófagos peritoneais usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com  $0,63 \times 10^{10}$  MT/macrófago e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada.



**Figura 40:** Imagens obtidas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. Os parasitos foram tratados com  $2,96 \times 10^9$  MT/parasito e as imagens obtidas a cada 1 minuto por 5 minutos, após o tratamento com MT. A primeira imagem se refere à amostra não tratada.

## 5.5 Avaliação da citotoxicidade celular pelo teste de MTT

A viabilidade celular também foi avaliada pelo teste de redução do MTT. Neste caso, as células (*Leishmanias* e macrófagos) foram tratadas com as quantidades específicas de MT e incubadas por 2 ou 24 horas, antes da adição do MTT. As amostras incubadas por 2 horas não continham SFB, enquanto que as amostras de 24 horas apresentavam 10% de SFB. O teste foi realizado para várias concentrações de células, e o  $IC_{50}$  (concentração de MT que provoca a morte de 50% das células presentes) obtido em concentração molar e MT/célula. Os resultados estão apresentados na Tabela 1. Os resultados para as promastigotas foram obtidos de Rodrigo *et al.* [15].

Comparando os três tipos de células estudadas, nota-se que os maiores valores de  $IC_{50}$  foram obtidos para os macrófagos. Quanto aos parasitos, não houve diferenças significativas entre o  $IC_{50}$  obtido para amastigotas e promastigotas [15]. Os resultados encontrados para as amastigotas incubadas por 24 horas em meio com 10% de SFB e 2 horas sem o SFB também não tiveram diferenças consideráveis, diferentemente dos macrófagos. Estas últimas tiveram valores de  $IC_{50}$  muito menores quando foram incubadas por 2 horas na ausência de SFB.

Como já citado anteriormente, a MT possui certa afinidade pela albumina presente no SFB [89]. Sendo assim, uma quantidade de MT presente na solução com SFB não chega à membrana celular, pois se liga à albumina. Por isso, as amostras incubadas por menos horas, mas em meio sem SFB apresentaram valores de  $IC_{50}$  iguais ou menores as incubadas por 24 horas em meio contendo SFB.

É importante analisar que, em todos os sistemas estudados, à medida que se aumentou a concentração de células, os valores do  $IC_{50}$  diminuíram em concentração molar e aumentaram em MT/célula. Isso acontece porque a MT é uma molécula com alta afinidade por membrana. Logo, o tratamento é mais rápido quando se usa uma alta concentração de células. Como exemplo, têm-se os experimentos de RPE, lise/ruptura e contagem já descritos anteriormente, em que o efeito da MT foi observado após 5 minutos do tratamento.

Tabela 1: Efeito da MT contra amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (teste do MTT).

		24 h – 10% de SFB		2h – sem SFB	
Células/mL	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> (10 <sup>9</sup> MT/cel)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> (10 <sup>9</sup> MT/cel)	
<b>Amastigotas</b>					
1 x 10 <sup>8</sup>	54,2 ± 7,55 (A)	0,32 ± 0,05 (A)	55,25 ± 6,23 (A)	0,33 ± 0,04 (A)	
4 x 10 <sup>7</sup>	34,55 ± 5,34 (B)	0,52 ± 0,08 (A)	24,35 ± 0,05 (B)	0,37 ± 0,01 (A)	
2 x 10 <sup>7</sup>	22,79 ± 3,62 (BC)	0,66 ± 0,1 (A)	11,21 ± 1,76 (C)	0,34 ± 0,06 (A)	
5 x 10 <sup>6</sup>	12,97 ± 1,76 (C)	1,57 ± 0,22 (B)	6,46 ± 0,65 (C)	0,77 ± 0,08 (B)	
<b>Promastigotas</b>					
1 x 10 <sup>8</sup>	59,3 ± 9,2 (A)	0,36 ± 0,06 (A)	-	-	
4 x 10 <sup>7</sup>	43,4 ± 8,9 (AB)	0,65 ± 0,14 (AB)	-	-	
2 x 10 <sup>7</sup>	26,4 ± 6,4 (BC)	0,79 ± 0,19 (B)	-	-	
5 x 10 <sup>6</sup>	11,8	1,42	-	-	
<b>Macrófagos</b>					
1 x 10 <sup>7</sup>	237,73 ± 4,1(A)	28,7 ± 0,5 (A)	96,19 ± 3,35 (A)	11,6 ± 0,4 (A)	
5 x 10 <sup>6</sup>	233,35 ± 8,8 (A)	56,1 ± 2,1 (A)	62,77 ± 2,43 (B)	15,2 ± 0,6 (AB)	
2,5 x 10 <sup>6</sup>	-	-	33,39 ± 1,49 (C)	16,1 ± 0,7 (B)	
1 x 10 <sup>6</sup>	145,83 ± 3,32 (B)	175,3 ± 3,8 (B)	23,65 ± 2,06 (D)	28,2 ± 2,2 (C)	
5 x 10 <sup>5</sup>	137,12 ± 15,0 (B)	332,6 ± 26,1 (C)	13,62 ± 1,09 (E)	32,8 ± 2,6 (D)	

Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com letras distintas são significativamente diferentes com  $P < 0,05$ .

Outra forma de analisar essa dependência da ação da MT com relação ao sistema mais ou menos diluído é através do cálculo do coeficiente de partição membrana-água para os três tipos de células usadas neste trabalho, de forma que quanto maior o valor do coeficiente, maior a concentração de MT e, portanto, maior a ação na membrana e, isto permite comparar os danos sofridos por cada membrana para uma dada concentração de MT. Como visto,

a concentração de MT que inibe em 50% a proliferação das células ( $IC_{50}$ ) varia consideravelmente com a concentração de células na suspensão. Um dos principais objetivos deste trabalho é entender porque a ação da MT depende da concentração de células usadas no experimento. Os aspectos biofísicos apresentados a seguir são relevantes em todos os ensaios envolvendo a interação de moléculas hidrofóbicas com células.

Para uma molécula teste com alta afinidade por membrana, como a MT, em uma suspensão celular, o cálculo da concentração molar não pode ser feito da maneira usual, porque uma fração considerável da molécula entra na membrana, reduzindo assim a concentração molar no meio aquoso. Para examinar mais detalhadamente o cálculo, vamos considerar uma suspensão de células com  $n_w$  moles de molécula teste no meio aquoso e  $n_m$  moles no interior da membrana. A concentração molar na suspensão ( $c_{sus}$ ) é dada por:

$$c_{sus} = \frac{n_w + n_m}{V_w + V_m} \quad 5.1$$

onde  $V_w$  é o volume do meio aquoso e  $V_m$ , o volume de membrana na suspensão. Reescrevendo a equação 5.1 em termos de concentração molar na membrana,  $c_m$ , e no meio aquoso,  $c_w$ , e introduzindo o coeficiente de partição membrana – água  $K$ , onde  $K = c_m/c_w$ , tem-se:

$$c_{sus} = \frac{c_w V_w + K c_w V_m}{V_w + V_m} \quad 5.2$$

ou

$$\frac{c_{sus}}{c_w} = \frac{(V_w/V_m) + K}{(V_w/V_m) + 1} \quad 5.3$$

Se  $V_w \gg V_m$ , então a equação 5.3 indica que  $c_{sus} = c_w$ , ou seja, a concentração calculada é precisa para sistemas bem diluídos. Se a molécula teste for hidrofílica, o valor de  $K$  é pequeno e novamente  $c_{sus} = c_w$ , indicando que o cálculo também é preciso neste caso. No entanto, para altas concentrações de células e molécula hidrofóbica, a suspensão já não pode ser considerada homogênea e  $c_{sus}$  pode ser bastante diferente de  $c_w$ .

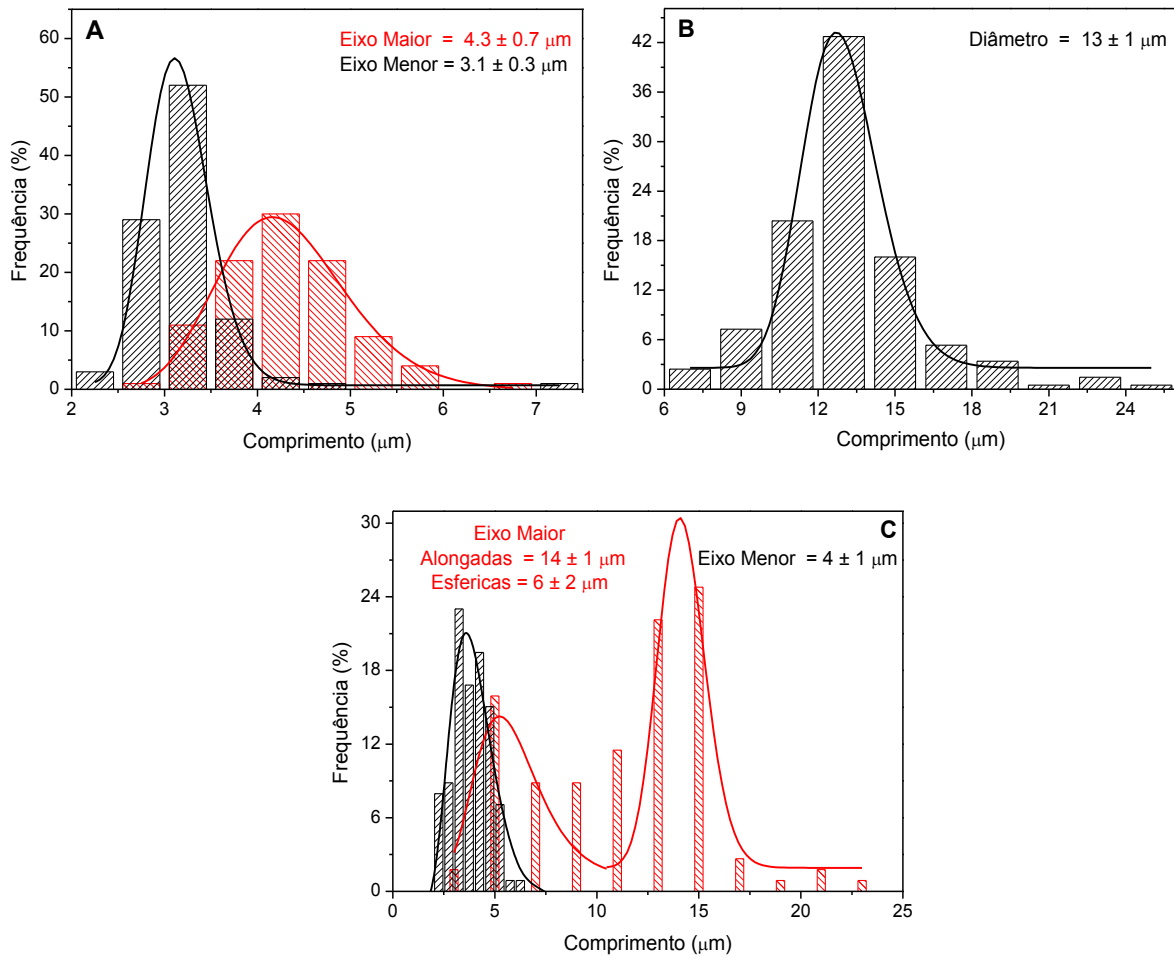
É possível estimar os valores de todas essas grandezas citadas anteriormente, mas, para isso, é necessário conhecer as dimensões das células para o cálculo do volume e área celular. Sendo assim, foram feitas medidas dos comprimentos dos parasitos e macrófagos a partir das imagens das amostras de controles, obtidas por microscopia óptica, as quais estão apresentadas nas Figuras 38,39 e 40. Foram analisadas 100 células de cada espécie. Para as amastigotas foram feitas duas medidas, uma do eixo maior e uma do eixo menor, já que estas apresentam uma forma aproximadamente elipsoidal. Para os macrófagos, aproximadamente esféricos, foi realizada uma única medida do diâmetro. Já as promastigotas apresentaram duas morfologias distintas, uma próxima de uma elipsoide e outra mais alongada e, em ambos os casos, foram medidos o eixo maior e o menor (desconsiderando o flagelo). A partir dos dados obtidos foram feitos histogramas (Figura 41) e estes foram ajustados utilizando distribuições do tipo Log-Normal

$$P(x) = \frac{A}{\sqrt{2\pi x\delta}} e^{\left(\frac{-\ln(x/x_0)^2}{2\delta^2}\right)}, \quad 5.4$$

onde  $A$  é uma constante,  $x_0$  é o diâmetro mediano,  $\delta$  é o parâmetro de dispersão e  $x$ , a variável de integração.

Com os parâmetros tirados do ajuste ( $x_0$  e  $\delta$ ) foram calculados os valores médios dos comprimentos em questão ( $x_{médio} = x_0 e^{\delta^2/2}$ ) e o desvio padrão ( $SD = x_{médio} \sqrt{(e^{\delta^2} - 1)}$ ). No caso dos macrófagos, como mediu-se apenas um comprimento, o diâmetro médio foi calculado ( $13 \pm 1 \mu\text{m}$ ) e o volume e área superficial foram obtidos das equações correspondentes da esfera. No caso das amastigotas, o eixo maior e o eixo menor foram separadamente ajustados por log-normais distintas, cada uma resultando em um valor médio ( $(4,3 \pm 0,7 \mu\text{m}) \times (3,1 \pm 0,3 \mu\text{m})$ ) a partir do qual encontrou-se o volume e a área superficial da elipsoide. Já no caso das promastigotas, foi encontrado um único pico para o eixo menor, mas dois picos para o eixo maior (uma para os parasitos mais esféricos e um para os parasitos alongados), de modo que foi possível determinar dois eixos maiores ( $14 \pm 1 \mu\text{m}$ ) e ( $6 \pm 2 \mu\text{m}$ ) e um menor ( $3,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$ ). Desta forma, os cálculos do volume e da área

superficial das células foram realizados com a média do eixo maior (10  $\mu\text{m}$ ) considerando-as elipsoides.



**Figura 41: Histogramas de distribuição das dimensões das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (A), macrófagos (B) e promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (C). A análise foi realizada em 100 células de cada espécie. O ajuste foi feito utilizando distribuições do tipo Log-normal.**

A partir desses dados calculou-se  $V_w/V_m$  nas suspensões de células em estudo. A Figura 42A mostra o gráfico das concentrações molares de MT ( $c_{sus}$ ) que matam 50% ( $IC_{50}$ ) das amastigotas em função do  $V_w/V_m$ . É importante ressaltar que todos os gráficos que serão apresentados nesta seção foram feitos com os valores obtidos para a média de três experimentos independentes. As concentrações são as mesmas da Tabela 1, sendo os quadrados pretos referentes aos parasitos presentes em meio de cultura contendo 10% de SFB (incubados por 24 h) e os quadrados vermelhos referentes às amostras em meio sem SFB (incubadas por 2 h). Nesta mesma figura se encontram duas curvas da  $c_{sus}$  versus  $V_w/V_m$ , as quais estão

associadas aos valores do  $IC_{50}$ , e são fornecidas pela equação 5.3. O melhor ajuste destas curvas permite estimar os valores de  $K$ ,  $c_w$  e  $V_w/V_m$  na suspensão de células.

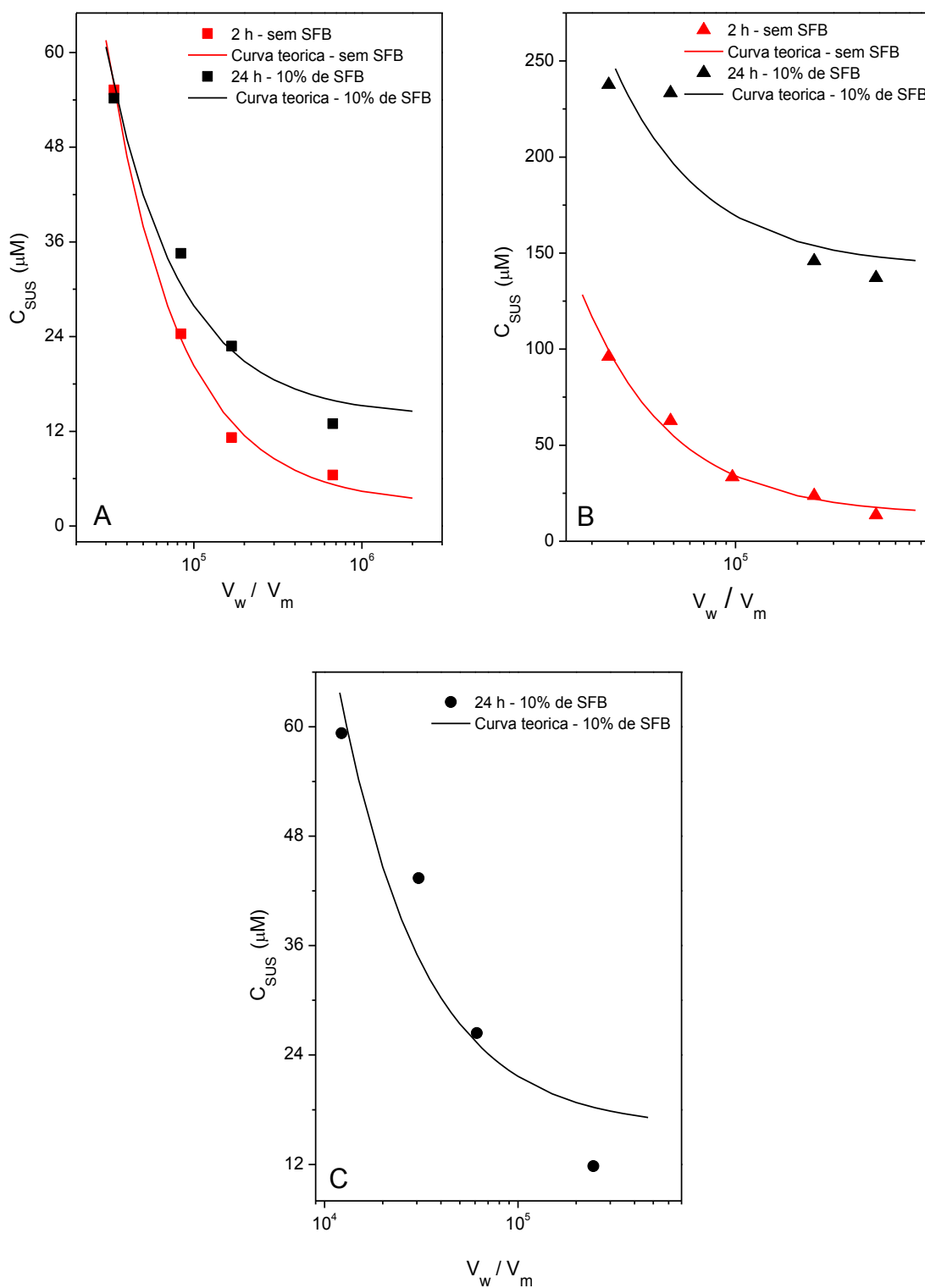


Figura 42: Dados experimentais e curvas teóricas calculadas a partir da equação 5.3 para a concentração de MT na suspensão ( $c_{sus}$ ) que provoca a morte de 50% das amastigotas (A), dos macrófagos (B) e das promastigotas (C), em função de  $V_w/V_m$  na suspensão. Os pontos e curvas na cor preta são das amostras em meio contendo 10% de SFB e na cor vermelha em meio sem SFB.

Considerando as formas amastigotas semelhantes a elipsoide e utilizando as dimensões médias encontradas para estas células, foi possível estimar  $V_w/V_m$ . O volume de parasito médio calculado foi de 21,64 fL, com uma área superficial média de 38,23  $\mu\text{m}^2$ . Considerando a espessura da membrana celular da *Leishmania* de 78 Å (mesma do eritrócito [139]) e multiplicando-a pela área da célula do parasito, encontrou-se o volume da membrana ( $V_m = 2,98 \times 10^{-13}$  mL). Desta forma,  $V_m$  é 72,6 vezes menor que o volume do parasito (21,64  $\times 10^{-12}$  mL). Então,  $V_w/V_m = 3,36 \times 10^{12}$  quando calculado para uma única célula e para uma suspensão com  $2 \times 10^7$  parasitos/mL,  $V_w/V_m = 1,68 \times 10^5$ . Para as outras concentrações de leishmânias, as razões volumétricas foram calculadas com base nesta relação.

Do melhor ajuste para cada experimento obteve-se o coeficiente de partição  $K$  membrana – água para MT em meio sem SFB, ( $K = 6,78 \pm 1,47$ )  $\times 10^5$  ( $\text{Log } K = 5,82 \pm 0,10$ ) e em meio com 10% de SFB,  $K = (1,02 \pm 0,15) \times 10^5$  ( $\text{Log } K = 5,01 \pm 0,06$ ). A concentração de MT do  $\text{IC}_{50}$  no meio aquoso também foi obtida pelo ajuste, sendo  $c_w = (2,6 \pm 0,3) \mu\text{M}$  no meio sem SFB e  $c_w = (13,8 \pm 1,8) \mu\text{M}$  no meio com 10% de SFB. Como  $K = c_m/c_w$ , o valor de  $c_m$  pode ser calculado,  $c_m = (1,8 \pm 0,2) \text{ M}$  para o primeiro caso e  $c_m = (1,4 \pm 0,2) \text{ M}$  para o segundo. Essas são as concentrações de MT na membrana do parasito que mata 50% destes. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o  $c_m$  obtido para as amostras contendo SFB e sem SFB.

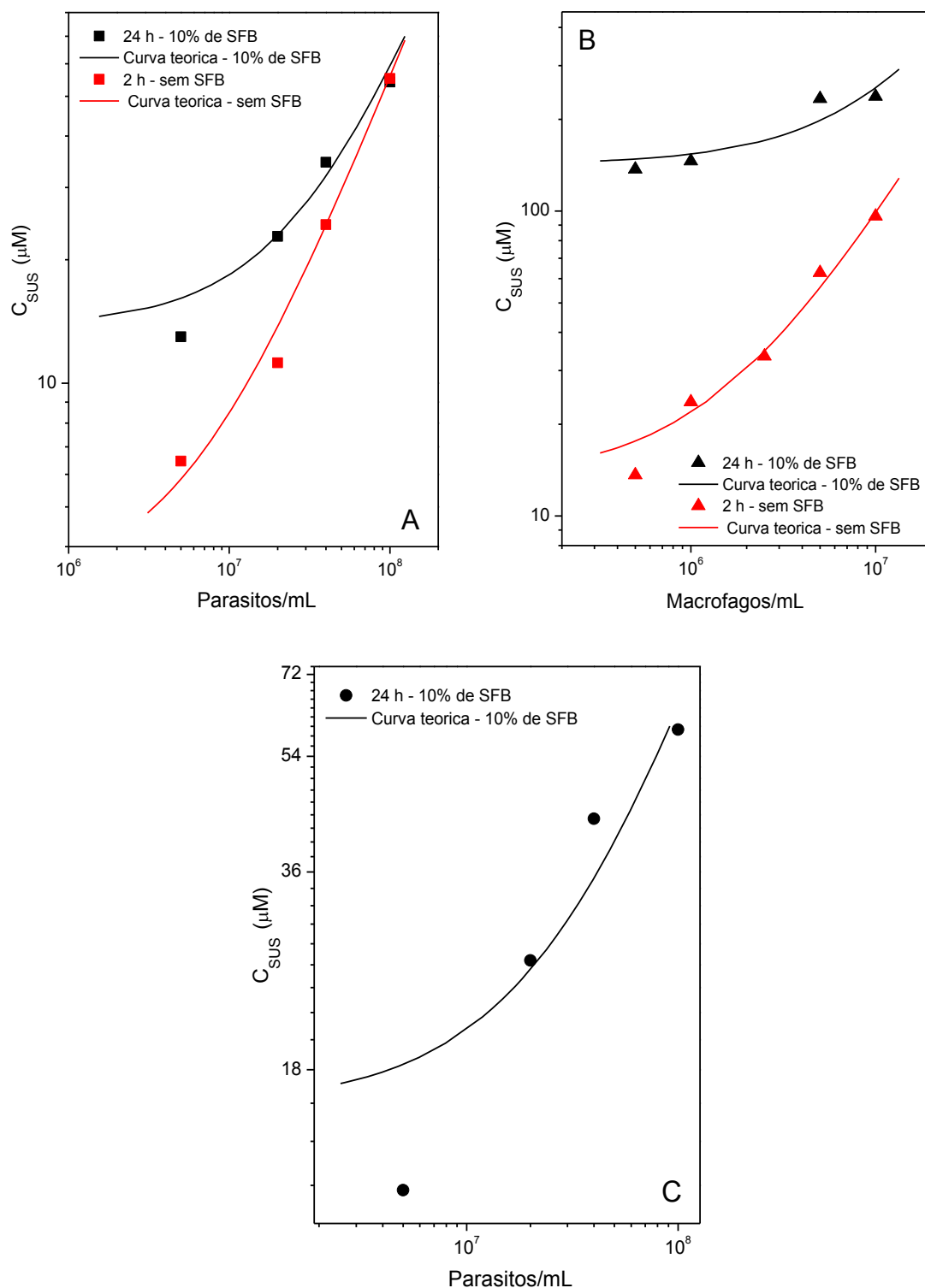
Na Figura 42B encontra-se o gráfico das concentrações molares médias de MT ( $c_{sus}$ ) do  $\text{IC}_{50}$  (Tabela 1) dos macrófagos e as curvas teóricas em função do  $V_w/V_m$ . As amostras contendo 10% de SFB (incubadas por 24 h) estão representadas pelos triângulos pretos enquanto que as células em meio sem SFB (incubadas por 2 h) pelos triângulos vermelhos. Considerando os macrófagos uma esfera e utilizando o raio médio encontrado para estas células, calculou-se o volume médio e a área superficial, sendo estes iguais a 1150,35 fL e 530,93  $\mu\text{m}^2$ , respectivamente. Multiplicando-se a área da célula pela espessura da membrana (78 Å), encontrou-se o volume de membrana ( $V_m = 4,14 \times 10^{-12}$  mL), portanto  $V_m$  é 277,86 vezes menor que o volume do macrófago (1150,35  $\times 10^{-12}$  mL). Logo,  $V_w/V_m = 2,42 \times 10^{11}$  quando calculado para uma única célula e para uma suspensão com  $10^6$  células/mL,  $V_w/V_m =$

$2,42 \times 10^5$ . Para as outras concentrações de macrófagos, as razões volumétricas foram calculadas a partir desta relação.

Neste caso, o coeficiente de partição  $K$  membrana – água para MT obtido do melhor ajuste de cada curva teórica foi  $K = (1,56 \pm 0,62) \times 10^5$  ( $\text{Log } K = 5,19 \pm 0,02$ ) em meio sem SFB e  $K = (1,90 \pm 0,36) \times 10^4$  ( $\text{Log } K = 4,27 \pm 0,08$ ) em meio com 10% de SFB. A concentração do  $\text{IC}_{50}$  de MT no meio aquoso obtida foi  $c_w = (13,3 \pm 0,7) \mu\text{M}$  no meio sem SFB e  $c_w = (142,6 \pm 7,9) \mu\text{M}$  no meio com 10% de SFB e o valor de  $c_m$  calculado foi de  $c_m = (2,1 \pm 0,0) \text{ M}$  para o primeiro caso e  $c_m = (2,7 \pm 0,4) \text{ M}$  para o segundo caso, sendo estes dois últimos valores significativamente diferentes para  $p < 0,05$ .

Na Figura 42C está o gráfico das concentrações molares médias de MT ( $c_{sus}$ ) do  $\text{IC}_{50}$  (Tabela 1) das promastigotas e as curvas teóricas. Para estas células, também consideradas elipsoides, o volume médio calculado foi de 83,78 fL, e a área superficial média de  $104,47 \mu\text{m}^2$ . O volume de membrana encontrado, considerando a espessura da membrana igual a  $78 \text{ \AA}$ , foi  $V_m = 8,17 \times 10^{-13} \text{ mL}$ , sendo assim,  $V_m$  é 102,5 vezes menor que o volume do parasito ( $83,78 \times 10^{-12} \text{ mL}$ ). Então,  $V_w/V_m = 1,22 \times 10^{12}$  quando calculado para uma única célula e para uma suspensão com  $2 \times 10^7$  células/mL,  $V_w/V_m = 6,13 \times 10^4$ . O coeficiente de partição  $K$  membrana – água para MT obtido do melhor ajuste de cada curva teórica foi  $K = (3,61 \pm 0,25) \times 10^4$  ( $\text{Log } K = 4,57 \pm 0,03$ ). Os cálculos foram feitos apenas para os parasitos em meio contendo 10% de SFB. A concentração do  $\text{IC}_{50}$  de MT no meio aquoso foi  $c_w = (15,9 \pm 2,8) \mu\text{M}$  e o valor de  $c_m$  calculado foi de  $c_m = (5,7 \pm 0,9) \times 10^5 \mu\text{M}$ .

Na Figura 43 se encontra a concentração de MT para 50% de morte celular expressa em  $\mu\text{M}$ , versus o número de células por mL na suspensão. No painel A estão os dados referentes aos parasitos amastigotas, em B os dados dos macrófagos e em C, das promastigotas.



**Figura 43: Concentração de MT expressa em  $\mu M$  versus a concentração celular dada em células/mL. No painel (A) os dados e curvas teóricas são referentes aos parasitos amastigotas, no painel (B) aos macrófagos e no painel (C) aos promastigotas. Os pontos e curvas na cor preta são das amostras em meio contendo 10% de SFB e na cor vermelha em meio sem SFB.**

Nas Figuras 42 e 43 é possível notar, novamente, a dependência das concentrações do IC<sub>50</sub> da MT ( $c_{sus}$ ) com a quantidade de células presente no meio e se este contém ou não SFB. Para facilitar a comparação e análise dos dados obtidos para cada tipo de célula foi feita uma tabela (Tabela 2) onde se encontra os valores dos principais parâmetros ( $K, \text{Log } K, c_w, c_m$ ) necessários para o estudo da afinidade das membranas plasmáticas pela MT. Nota-se que nesta tabela foram acrescentados valores referentes a eritrócitos. Estes dados foram obtidos experimentalmente no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (trabalho submetido). Os valores se referem à ação da MT nas membranas destas células, por isso a comparação. Neste caso, o foco principal foi o estudo da atividade hemolítica da MT, portanto, encontrou-se valores de IC<sub>50</sub> de MT que provoca 50% de hemólise dos eritrócitos presentes.

**Tabela 2: Parâmetros biofísicos relacionados à ação da MT nas membranas das amastigotas e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c e eritrócitos.**

<b>Amostras contendo SFB</b>					
<b>Células</b>	<b>(<math>V_c/V_m</math>)</b>	<b><math>K</math> (<math>10^5</math>)</b>	<b><math>\text{Log } K</math></b>	<b><math>c_w</math> (<math>\mu\text{M}</math>)</b>	<b><math>c_m</math> (M)</b>
Amastigotas	72,6	1,02 ± 0,15 (A)	5,01 ± 0,06	13,8 ± 1,8(A)	1,4 ± 0,2 (A)
Promastigotas	102,5	0,36 ± 0,02 (B)	4,57 ± 0,03	15,9 ± 2,8 (A)	0,6 ± 0,1(B)
Macrófagos	277,9	0,19 ± 0,04 (C)	4,27 ± 0,08	142,6 ± 7,9 (B)	2,7±0,4 (C)
Eritrócitos*	83,8	-	-	-	-
<b>Amostras sem SFB</b>					
Amastigota		6,78 ± 1,47(D)	5,82 ± 0,10	2,6 ± 0,3 (C)	1,8±0,2(AD)
Promastigotas		-	-	-	-
Macrófagos		1,56 ± 0,62(E)	5,19 ± 0,02	13,3 ± 0,8 (A)	2,1±0,0 (D)
Eritrócitos*		0,48	4,68	2,3	0,1

$V_c/V_m$  é razão entre o volume da célula e o volume de membrana;  $K$ , o coeficiente de partição membrana – água;  $c_w$ , a concentração molar de MT no meio aquoso;  $c_m$ , concentração molar de MT na membrana;

Significância estatística: em cada coluna, os dados indicados com letras distintas são significativamente diferentes com  $P < 0,05$ ;

\*Dados não publicados.

Comparando os resultados mostrados na Tabela 2, nota-se que as amastigotas foram as células que apresentaram o maior valor para o coeficiente de partição membrana-água ( $K$ ), independentemente se as amostras continha SFB ou não, mostrando uma afinidade maior da MT pela membrana da célula destes parasitos, com relação às outras células. A concentração de MT no meio aquoso ( $c_w$ ) é dependente da presença ou não do SFB, apresentando valores significativamente maiores para as amostras que o continha, demonstrando novamente a afinidade da MT pela albumina. As suspensões de macrófagos foram as que apresentaram maiores valores para  $c_w$ , demonstrando uma sensibilidade menor da membrana destas células pela MT. Os macrófagos também apresentaram maiores valores para  $c_m$ , isto é, essas células necessitam de uma concentração de MT maior na membrana para provocar morte celular. Os eritrócitos apresentaram o menor valor para  $c_w$  e  $c_m$  e também para  $K$ , mostrando ser a célula com menor afinidade pela MT, mas mais sensível a ela, se rompendo com uma concentração menor que a necessária para romper as outras células. As promastigotas apresentaram mesmo  $c_w$  que as amastigotas, porém menor  $c_m$ , demonstrando mesma sensibilidade pela MT, porém necessitando de uma concentração menor de MT na membrana para sentir o efeito desse fármaco.

Esperava-se que os valores de  $c_m$  obtidos para as células em meio com e sem SFB, não apresentassem diferenças significativas, uma vez que a quantidade de MT necessária para romper a membrana teria de ser a mesma, independentemente da solução em que a célula se encontrar. Como já dito anteriormente, as amastigotas não apresentaram diferenças significativas com  $P < 0,05$  para  $c_m$ , mas os macrófagos sim. Este dado sugere que uma quantidade de MT possa ter entrado nos macrófagos. Como as amostras foram incubadas por 24 horas, caso a membrana dos macrófagos apresente alguma facilidade para a internalização da MT, haveria tempo para que isso ocorresse.

É interessante observar que os valores obtidos para o  $c_w$  se aproximam dos valores de  $IC_{50}$  para as amostras mais diluídas, como  $5 \times 10^6$  parasitos/ml e  $5 \times 10^5$  macrófagos/ml, mostrados na Tabela 1. Para as amastigotas, o  $IC_{50}$  obtido para a concentração em questão foi de  $12,97 \pm 1,76$ , enquanto  $c_w$ ,  $13,84 \pm 1,80$ , ambos os dados das amostras contendo SFB. Para os macrófagos, o

IC<sub>50</sub> foi de 137,12 ± 15 e  $c_w$ , 142,56 ± 56 para as amostras em SFB, e IC<sub>50</sub> igual a 13,62 ± 1,09 com  $c_w$  igual a 13,33 ± 0,67, para as amostras sem SFB. Estes resultados sugerem que a quantidade de fármaco que apresenta alta afinidade por membrana, em concentração molar, se aproxima da concentração real do efeito nas células quanto mais diluída estiver a suspensão.

Com as curvas teóricas das amostras sem SFB apresentadas na Figura 42, foi feita uma estimativa dos valores de IC<sub>50</sub> da MT para as concentrações de células utilizadas nos experimentos em que se analisou a ação da MT nas membranas celulares por RPE dos marcadores de spins lipídico e de proteína, além dos testes de lise e viabilidade celular ( $2 \times 10^9$  parasitos/ml e  $7 \times 10^7$  macrófagos/ml). Os valores obtidos juntamente com as concentrações de MT que provocaram alterações significativas para  $p < 0,05$  no parâmetro de ordem  $2A_{//}$ , lise e morte celular, se encontram na Tabela 3.

**Tabela 3: Comparação entre as concentrações estimadas do IC<sub>50</sub> da MT para as concentrações de  $2 \times 10^9$  parasitos/ml e  $7 \times 10^7$  macrófagos/ml com as concentrações de MT que provocaram alterações significativas com  $P < 0,05$  na dinâmica das membranas avaliadas por RPE, lise e viabilidade celular.**

Células	nº de células/ml	Concentração de MT (mM)				
		IC <sub>50</sub>	RPE (5-DSA)	RPE (MAL-6)	Lise	Viabilidade
Amastigota	$2 \times 10^9$	1,05 ± 0,12	0,74	1,47	0,44	0,44
Promastigota	$2 \times 10^9$	0,95 ± 0,16*	1,47	1,47	1,47	1,47
Macrófago	$7 \times 10^7$	0,61 ± 0,01	1,47	1,47	0,44	0,44

IC<sub>50</sub> estimado a partir das curvas teóricas das amostras sem SFB apresentadas na Figura 42; Para os experimentos de RPE, lise e viabilidade, a análise estatística foi realizada para cada concentração de MT com relação à amostra de controle para  $P < 0,05$ .

\* IC<sub>50</sub> para amostra em meio com 10% de SFB.

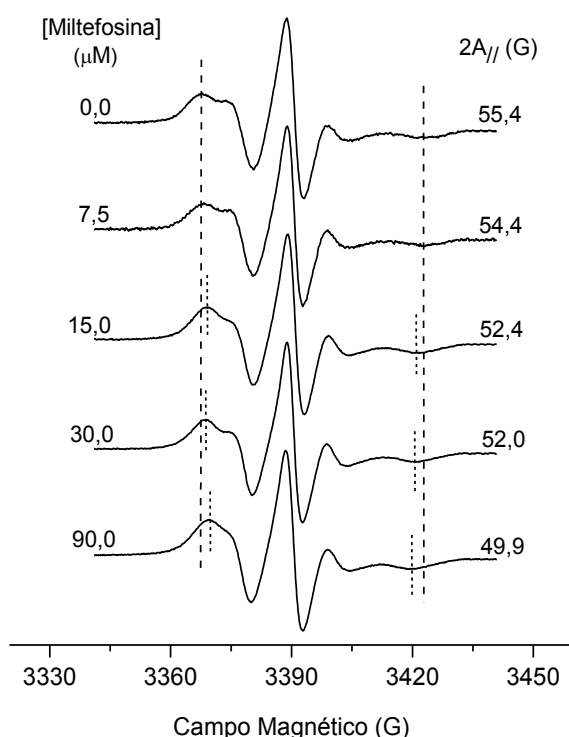
Para  $2 \times 10^9$  parasitos/ml de amastigotas observou-se que concentrações de MT menores que a obtida para o IC<sub>50</sub>, provocaram um

aumento significativo na dinâmica da membrana avaliada por RPE do marcador de spin 5-DSA, além de lise celular e diminuição dos parasitos vivos na suspensão. As alterações da membrana observadas com o marcador de spin de proteínas MAL-6 foi significativamente diferente da amostra de controle com  $P < 0,05$  em concentrações iguais ou maiores que 1,47 mM. Para as promastigotas ( $2 \times 10^9$  parasitos/ml), as alterações na membrana, lise e morte dos parasitos foram observados em concentrações de MT maiores que a do  $IC_{50}$ . Porém, é importante informar que 1,47 mM foi a menor concentração de MT utilizada nos experimentos referentes às promastigotas [15], assim, não se pode afirmar que esta seja a menor concentração de MT que provoca danos significativos às leishmânias. É importante observar também que não houve diferenças estatísticas entre o  $IC_{50}$  obtido para as amastigotas e promastigotas. Para os macrófagos, uma lise considerável das células foi provocada por uma concentração de MT menor que a do  $IC_{50}$ , assim como a morte celular. Já as alterações significativas da membrana avaliada por RPE foram obtidas com concentrações razoavelmente maiores que a do  $IC_{50}$ .

Finalizando o estudo da viabilidade celular pelo teste de MTT, foi realizado um teste de RPE, a fim de comparar experimentalmente se as concentrações de MT que causam a morte de 50% das amastigotas ( $IC_{50}$ ) provoca alteração na membrana celular destas. O experimento foi feito para a concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL. Até então, os testes de RPE tinham sido feitos apenas para altas concentrações de células, já que o equipamento exige uma quantidade de células grande para se conseguir um bom sinal. Por isso foi necessário uma adaptação para a realização deste experimento. Os  $4 \times 10^7$  parasitos foram diluídos em 1 mL de meio de cultura sem SFB; as amostras foram preparadas sempre em duplicata. Assim, em cada eppendorff foram adicionados 2 mL da suspensão de células, os quais foram tratados com as quantidades requeridas de MT. A MT, diluída em etanol, foi acrescentada às amostras com o auxílio de uma seringa micrométrica. Após o tratamento, as amostras foram incubadas por 1 hora a 32 °C. Em seguida a suspensão foi centrifugada e descartado o sobrenadante para obter uma concentração de células de  $8 \times 10^7$  parasitos/mL. Esta suspensão mais concentrada de parasitos foi marcada com 5-DSA usando filme do marcador e as amostras foram transferidas aos capilares para as medidas de RPE. Assim, as amostras

em maior concentração permitiram obter bons espectros de RPE. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 44. A concentração de MT foi dada em  $\mu\text{M}$ .

Para a concentração de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL o  $\text{IC}_{50}$ , para a amostra em meio sem SFB e incubada por 2 h, foi  $24,35 \pm 0,05 \mu\text{M}$  (Tabela 1). Analisando os espectros da Figura 44, nota-se que próximo a esta concentração já se percebe uma alteração na fluidez da membrana dos parasitos. Com  $30 \mu\text{M}$  houve uma diminuição de aproximadamente 3 G no valor do parâmetro  $2A_{//}$  quando comparado com a amostra controle. Para o RPE esta é uma diferença significativa e considerável. Portanto, mostrou-se mais uma vez, agora em uma concentração de célula menor que a demonstrado antes ( $2 \times 10^9$  parasitos/mL), que as concentrações de MT que causam a morte dos parasitos são as mesmas que provocam alterações na dinâmica da membrana celular.



**Figura 44:** Espectros de RPE do marcador de spin 5-DSA inserido em membranas de amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (cepa Josefa). As amostras, nas concentrações de  $4 \times 10^7$  parasitos/mL em meio Grace completo sem SFB, foram tratadas com as quantidades requeridas de MT e incubadas por 1 hora a  $32^\circ\text{C}$ . Em seguida, foram marcadas e então transferidas a capilares para as medidas de RPE.

## 5.6 Ação da MT em macrófagos peritoneais infectados com parasitos *L. (L.) amazonensis*

O tratamento com MT dos macrófagos infectados com parasitos *L. (L.) amazonensis* foi mais um teste realizado com o objetivo de tentar entender o mecanismo de ação da MT responsável pela morte dos parasitos. Este teste tem uma importância maior por ser o sistema real onde o fármaco precisa agir. Até então, foi visto que a MT apresenta ação tanto nas membranas dos parasitos como dos macrófagos, aumentando a dinâmica e causando a ruptura destas nas mesmas concentrações em que as mata. A concentração de MT necessária para visualizar a ação nos macrófagos é significativamente maior que as concentrações que se observa efeito nas leishmânias, conforme indicado pelos valores de  $c_m$  na Tabela 2. Portanto, surge a pergunta se a MT age inicialmente na membrana dos macrófagos e depois atinge os parasitos ou a atravessa e age diretamente nas leishmânias? Para responder esta pergunta foram obtidas imagens das células infectadas, controle e tratadas com a MT, a fim de tentar visualizar a ação da MT neste sistema. Primeiramente, as células foram tratadas em meio de cultura contendo 10 % de SFB. Algumas das fotografias obtidas se encontram nas Figuras 45 e 46.

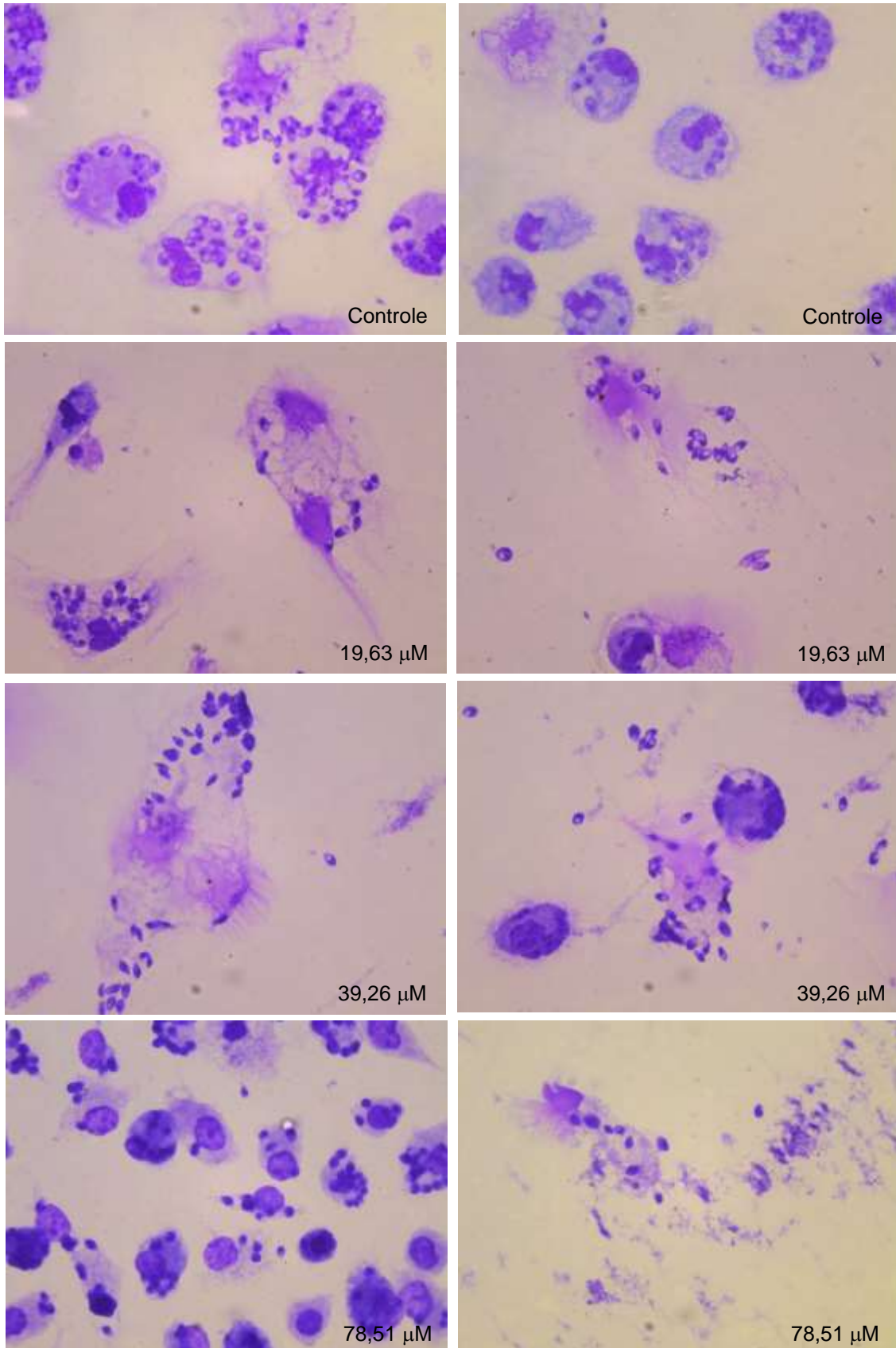
Sabendo que o  $IC_{50}$  dos macrófagos nesta concentração de células ( $10^6$  células/mL) é  $145,83 \pm 3,32 \mu\text{M}$  de MT, esperava-se observar 50% de células mortas nas concentrações próximas a esta. Mas é possível notar que na fotografia que representa as células tratadas com  $235,54 \mu\text{M}$  de MT, onde se esperava que a maioria, se não todas as células já estivessem mortas, estão aparentemente sem danos e ainda infectadas. Esta imagem foi obtida de determinada região da lamínula. Em algumas regiões havia células aparentemente mortas e ausência de parasitos. Este foi o maior problema encontrado na análise destes dados, pois as lamínulas ficaram muito heterogêneas, com regiões que pareciam mais atingidas pela MT que outras. O mesmo aconteceu com todas as outras amostras. Nas menores concentrações de MT já se observou alguns parasitos fora dos macrófagos, o que poderia confirmar a nossa suspeita de que a MT lisa o macrófago liberando o parasito, o qual morre depois pelo contato direto com a MT ou eliminado pelo próprio

organismo. Esse resultado, entretanto, é inconclusivo, pois as leishmânias do lado de fora das células podem não ter infectado nenhum macrófago e, ainda assim, não terem sido eliminadas na lavagem com PBS, apesar de não ter se visto parasitos livres no controle.

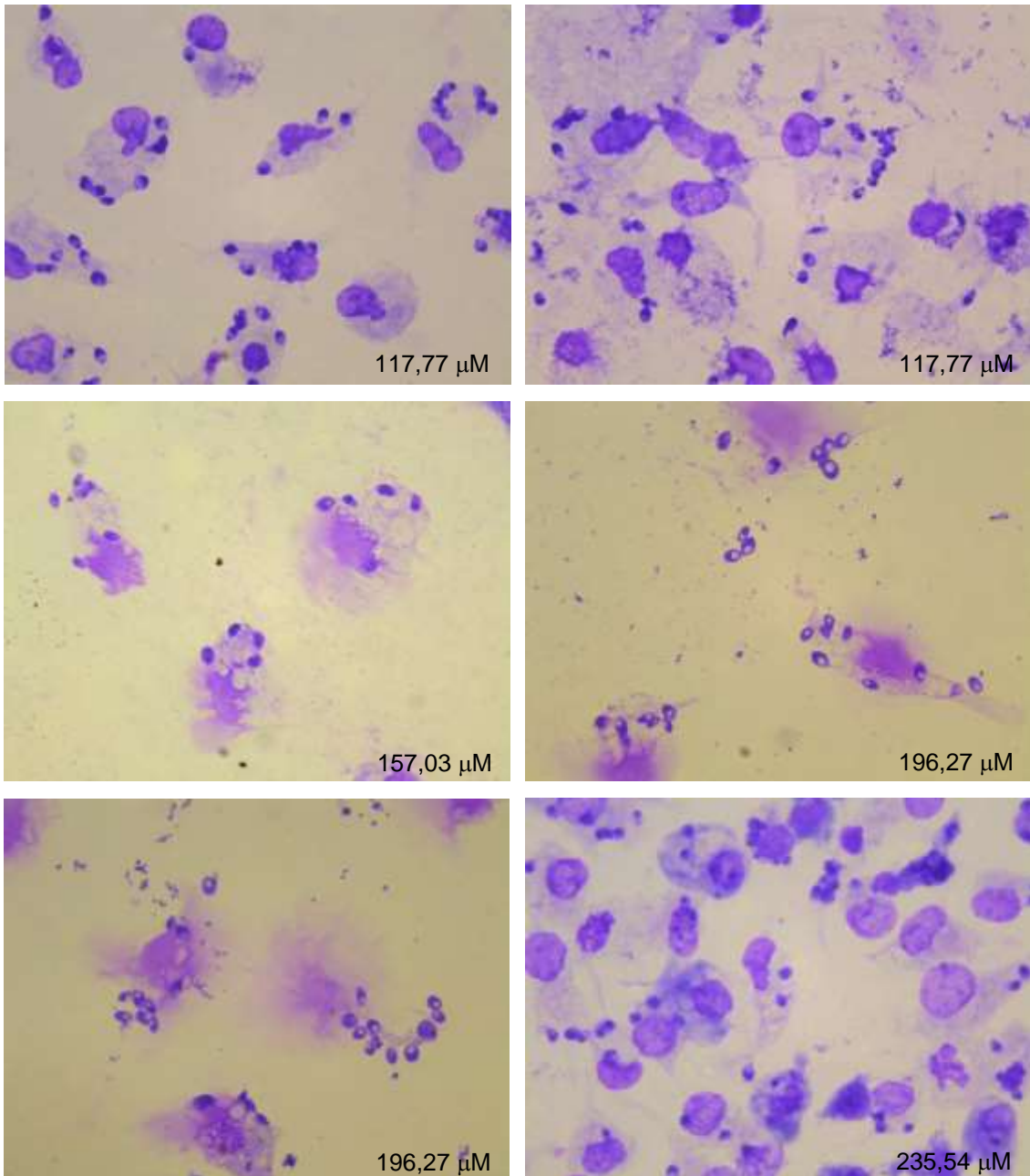
As imagens foram obtidas de regiões que ficaram mais bem coradas e tentando representar de forma geral o efeito da MT no restante da lamínula. Em nenhuma das concentrações de MT utilizadas percebeu-se a morte total das células. Algumas imagens, como as de 78,51  $\mu\text{M}$ , 117,77  $\mu\text{M}$  e 196,27  $\mu\text{M}$ , sugerem a destruição de algumas células. Devido a esses dados inconclusivos, foram realizados mais alguns experimentos onde os macrófagos foram tratados e mantidos em meio de cultura RPMI sem SFB. As células, após a infecção com os parasitos e tratados com a MT, foram incubadas por 10 e 30 min a 37°C e não por 2 horas como no experimento anterior. As imagens obtidas se encontram nas Figuras 47 e 48.

Como nas concentrações de MT utilizadas anteriormente não se obteve nenhuma amostra com morte total das células, aumentou-se as concentrações utilizadas nos próximos experimentos. Isso foi feito também para tentar flagrar momentos diferentes da ação da MT. Com isto, percebeu-se a perda de muitas células. Além disso, notou-se que à medida que se aumentou a concentração de MT a quantidade de parasitos presentes pareceu diminuir. Na concentração de 441,65  $\mu\text{M}$  não se observou mais nenhuma célula, e isto ocorreu tanto para 10 min como para 30 min de tratamento, o que mostra mais uma vez que a ação da MT nas células pode ser instantânea.

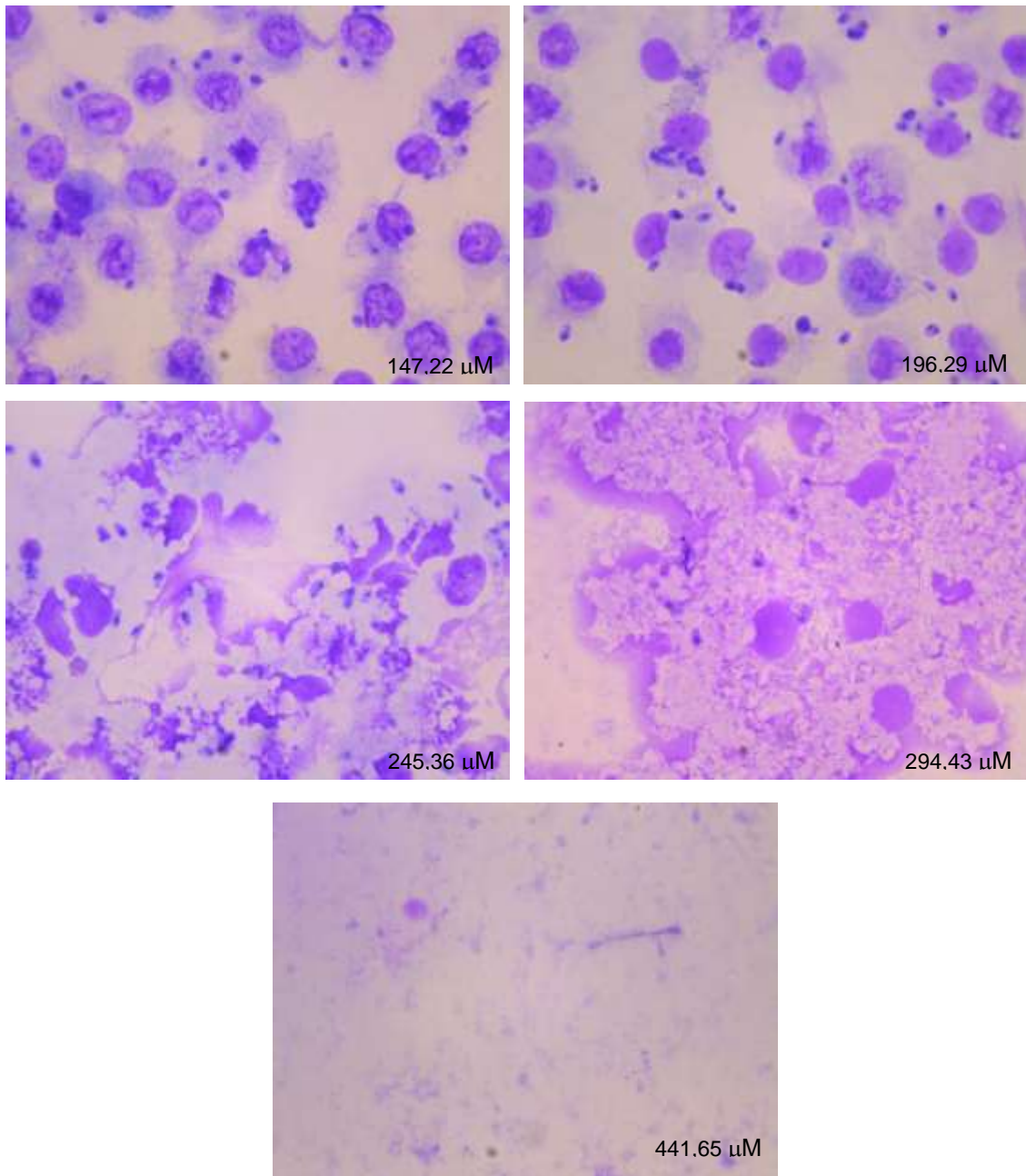
Desta toda forma, os experimentos não foram conclusivos e não responderam a nossa pergunta. Apesar de algumas fotografias sugerirem a nossa suspeita, são necessários mais experimentos, utilizando um microscópio eletrônico, por exemplo, que nos permita obter imagens com resoluções significativamente melhores.



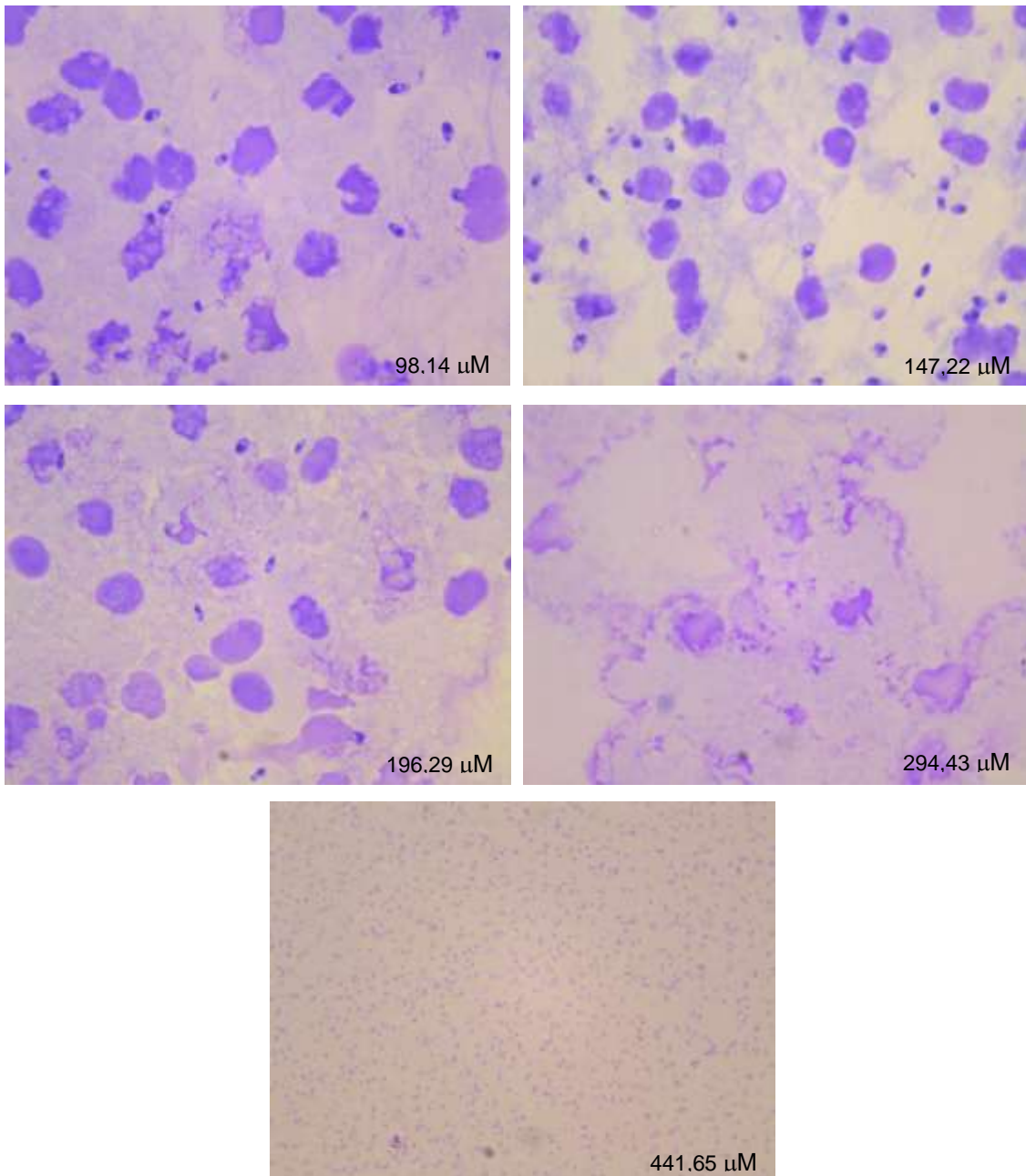
**Figura 45:** Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 2 horas a 37°C em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As duas primeiras fotografias referem-se à amostra não tratada. As células foram coradas utilizando a coloração panótico.



**Figura 46:** Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 2 horas a 37°C em meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico.



**Figura 47:** Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 10 min a 37°C em meio RPMI sem SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico.



**Figura 48: Fotografias tiradas de macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* usando um microscópio óptico. As células foram tratadas com as concentrações desejadas de MT (demonstrada nas fotos) e incubadas por 30 min a 37°C em meio RPMI sem SFB. As células foram coradas utilizando a coloração panótico.**

## 6 Discussão

A espectroscopia de RPE de marcadores de spin tem sido largamente utilizada no estudo da dinâmica de proteínas e lipídios de membranas celulares. Dentre os marcadores, os derivados do ácido esteárico são os mais utilizados, graças, principalmente, a sua alta capacidade de incorporação na superfície celular. Neste trabalho foram utilizados dois tipos, um marcador lipídico (5-DSA) e um marcador de proteína (MAL-6). Inicialmente os estudos da interação da MT com as membranas de amastigota de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos extraídos do peritônio de camundongos Balb/c foram feitos utilizando o marcador 5-DSA. A espectroscopia de RPE desta sonda tem identificado a presença de duas populações de marcadores em diferentes estados de mobilidade. A primeira população, das sondas paramagnéticas com menor mobilidade, foi associada aos marcadores que circundam as regiões hidrofóbicas das proteínas. Já a segunda população, a qual apresenta maior mobilidade, foi atribuída aos marcadores localizados na bicamada lipídica sem contato com as proteínas [140]. Assim, um marcador de spin lipídico pode também refletir alterações nas proteínas da membrana celular.

Um método que se tem mostrado muito adequado para a marcação das amostras com o marcador de spin 5-DSA consiste em dissolvê-lo em etanol e formar um filme no tubo de vidro por evaporação do solvente. Quando as células são colocadas sobre o filme e o tubo agitado moderadamente, os monômeros das moléculas marcadas são transferidos para a membrana, conseguindo assim uma eficiente incorporação e uma homogeneidade na distribuição do marcador de spin. Com este método, imediatamente após a marcação, já se obtém um excelente sinal de RPE estabilizado. O mesmo procedimento foi utilizado para obter uma rápida incorporação da MT nas membranas de promastigotas [15] e, neste trabalho, nas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e macrófagos peritoneais. A ação da MT nas membranas destas células foi monitorada através do parâmetro  $2A_{//}$ , o qual é medido diretamente nos espectros de RPE e muito utilizado para avaliar a dinâmica molecular, embora seja um parâmetro estático associado à distribuição de orientação dos marcadores de spin na membrana (ordem molecular). Portanto, através deste

parâmetro pode-se analisar a fluidez da membrana, de forma que quanto menor o seu valor, menor a ordem molecular e maior a fluidez da membrana. Nas membranas de macrófagos e amastigotas, o aumento na concentração de MT resultou em uma substancial elevação da fluidez lipídica (Figuras 24 e 25). A diferença no  $2A_{\parallel}$  das amostras tratadas com a maior concentração de MT foi superior a 10 G quando comparadas ao controle. O mesmo efeito foi observado nas membranas das promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, como mostrado na Figura 26. Os espectros obtidos para estas amostras podem ser visto no trabalho de Moreira *et al.* [15].

A RPE e a espectroscopia de fluorescência de sondas extrínsecas em vesículas unilamelares grandes de DPPC não detectaram mudanças na fluidez lipídica induzida pela MT para concentrações acima de 25 mol%, em analogia com seu comportamento em vesículas esféricas preparadas com ceramida de cérebro bovino, ácido beénico e colesterol [13]. No entanto, a MT aumenta drasticamente a fluidez da membrana extracelular do estrato córneo onde parte dos lipídios está covalentemente ligada às proteínas [13]. Desde que a fluidez lipídica da membrana celular é fortemente influenciada pelas proteínas da membrana [13,140,141], estes resultados sugerem que a ação principal da MT é na componente proteica da membrana.

Os resultados da ação da MT nas membranas das amastigotas e macrófagos obtidos com o marcador de proteína MAL-6 (Figuras 27 e 30) mostraram uma diminuição no  $2A_{\parallel}$  à medida que se aumentou a concentração de MT, o que reflete um aumento na dinâmica das proteínas destas membranas. Além disso, a população da componente S dos espectros de RPE também foi reduzida em concentrações mais elevadas de MT. Um efeito semelhante foi obtido em um estudo abordando a interação de surfactantes com BSA através do marcador de spin MAL-5 ligado covalentemente ao único grupo tiol livre da proteína. Neste, os surfactantes também causaram uma diminuição no  $2A_{\parallel}$  do espectro de RPE e redução da população da componente S, indicando que o surfactante favorece conformações de proteína mais dinâmicas e expostas ao solvente [142]. Portanto, um possível mecanismo de ação da MT é o ataque das proteínas ligadas à membrana celular. Desta forma, os espectros de RPE do marcador de spin das proteínas ligadas à membrana de *Leishmania* nas suas duas formas evolutivas e de

macrófagos peritoneais, como as mudanças provocadas pela MT, sugere um efeito tipo detergente da MT nas proteínas destas membranas [15]. A MT também tem ação em fungos patogênicos [143], outras espécies de *Leishmania* [11], *Tripanossoma cruzi* [144] e vários tipos de células tumorais [9,145].

É importante observar que, para  $2 \times 10^9$  parasitos/mL e  $7 \times 10^7$  macrófagos/mL, as concentrações de MT que provocaram as maiores alterações conformacionais na estrutura das proteínas e fluidez lipídica também causaram lise e ruptura da membrana celular, além da morte destas células. Esse efeito pôde ser visto tanto para os parasitos na forma amastigota quanto promastigota, sendo este último caso já descrito por Moreira *et al.* [15]. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o sesquiterpeno nerolidol e os monoterpenos (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol, e 1,8 cineol também apresentaram lise celular nas mesmas concentrações em que se observou um aumento na dinâmica dos lipídios da membrana [133]. Neste caso, concluiu-se que a ação dos terpenos é restrito à componente lipídica da membrana e não nas proteínas, o que difere dos resultados encontrados para a MT.

Estes mesmos trabalhos citados anteriormente [15,133] mostraram, através do teste de MTT, que a concentração de fármacos (MT ou terpenos) necessária para inibir o crescimento celular em 50% das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* presentes ( $IC_{50}$ ) é dependente da quantidade de células no meio. O mesmo efeito foi visto nos estudos da ação da MT nas amastigotas axênicas desta espécie de parasito e nos macrófagos peritoneais, cujos resultados estão apresentados neste trabalho (Tabela 1). Outro efeito interessante observado foi a dependência do valor de  $IC_{50}$  da presença ou não da albumina no meio de cultura das células. Encontrou-se uma diferença nos valores de  $IC_{50}$  significativamente maiores para as amostras no meio de cultura suplementado com SFB, em relação às amostras no meio de cultura sem SFB. Esta diferença foi consideravelmente maior nos valores obtidos para os macrófagos (Tabela 1). Além disso, o tratamento das células com a MT resultou em um efeito dose-dependente na viabilidade das leishmânias e macrófagos.

A atividade antiproliferativa do sesquiterpeno nerolidol e dos monoterpenos (+)-limoneno,  $\alpha$ -terpineol, e 1,8 cineol com promastigotas de *L.*

*(L.) amazonensis* foi avaliada utilizando várias concentrações de parasitos ( $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  e  $2 \times 10^9$  parasitos/mL) [133]. O valor do  $IC_{50}$  desses terpenos aumentou a medida que a concentração de parasitos usados no ensaio de citotoxicidade aumentou. Como exemplo, o valor de  $IC_{50}$  do nerolidol variou de 8 a 1109  $\mu\text{M}$  entre a menor a maior concentração de células utilizada. O ensaio de citotoxicidade e os experimentos de RPE dos marcadores de spins realizados com a mesma concentração de parasitos ( $2 \times 10^9$  parasitos/mL) revelaram uma correlação entre o valor de  $IC_{50}$  dos terpenos e as concentrações na qual a fluidez da membrana celular aumentou. Adicionalmente, os terpenos induziram uma pequena quantidade de lise celular (4 - 9%) no seu respectivo valor de  $IC_{50}$  e para concentrações levemente acima variou de 20 a 50% [133]. Estes resultados deixaram claro que as atividades antiparasitárias dos terpenos é causada por danos na membrana celular.

Santa-Rita *et al.* [146] analisaram a ação da MT em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* encontrando um valor de  $IC_{50}$  igual a  $7,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$  para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL com um dia de tratamento e  $3,4 \pm 0,4 \mu\text{M}$  com três dias. Neste mesmo trabalho, o teste de citotoxicidade da MT foi realizado para as amastigotas no interior de macrófagos peritoneais murinos, e o  $IC_{50}$  obtido foi de  $9,0 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , significativamente diferente dos valores reportados de  $16 \pm 2,72 \mu\text{g/mL}$  ( $39,26 \mu\text{M}$ ), obtido por [147] e de  $3,21 \mu\text{M}$  por [148]. Tem sido demonstrado que os macrófagos sofrem danos em concentrações de MT acima de  $60 \mu\text{M}$  [146]. Estes resultados foram comparados com dois análogos de lisofosfolípidios, edelfosina e ilmofosina, os quais mostraram ser mais ativos que a MT, obtendo valores de  $IC_{50}$  menores. Já Paula *et al.* [149] encontraram um  $IC_{50}$  de  $21,39 \pm 1,18 \mu\text{M}$  para promastigotas de *L. (L.) amazonensis* expostas por 72 h a MT, mas não especificou a concentração de parasitos utilizada nos testes. Para as amastigotas no interior de macrófagos peritoneais de Balb/c o  $IC_{50}$  foi de  $4,15 \mu\text{M}$ , e para os macrófagos foi maior que  $100 \mu\text{M}$ . Os testes foram realizados para mais duas espécies de leishmânia (*L. (L.) braziliensis* e *L.(L.) major*), mostrando que o  $IC_{50}$  também depende da espécie de parasito analisada. Com experimentos semelhantes, foram encontrados valores de  $IC_{50}$  de  $11,8 \mu\text{g/mL}$  ( $28,95 \mu\text{M}$ ) para  $2 \times 10^6$  promastigotas/mL e

49,4  $\mu\text{g/mL}$  (121,2  $\mu\text{M}$ ) para  $2 \times 10^6$  células/mL de macrófagos peritoneais [150].

Para promastigotas de *Leishmania donovani* tem sido reportado valor de  $\text{IC}_{50}$  para MT de 13,6  $\mu\text{M}$  usando  $10^6$  parasitos/mL [151], 25  $\mu\text{M}$  para  $5 \times 10^6$  parasitos/mL [152] e 3,8  $\mu\text{M}$  para  $5 \times 10^5$  parasitos/mL [153], demonstrando correlação entre os valores de  $\text{IC}_{50}$  e a concentração de parasitos usada no ensaio. Neste último, os autores também avaliaram a inibição da proliferação provocada pela MT nos parasitos na forma amastigota em dois sistemas, amastigotas axênicas e ex-vivo. O valor de  $\text{IC}_{50}$  obtido, para  $10^6$  parasitos/mL, foi de  $0,4 \pm 0,2 \mu\text{M}$  para o primeiro caso e  $0,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  para o segundo. Já os valores de  $\text{IC}_{50}$  para estes parasitos no interior de macrófagos peritoneais foi de  $0,9 \pm 0,4 \mu\text{M}$  e  $4,3 \pm 1,1 \mu\text{M}$ , respectivamente [153]. Teixeira *et al.* encontraram 0,22  $\mu\text{M}$  para as amastigotas intracelulares. Estes avaliaram a citotoxicidade da MT em macrófagos peritoneais de Balb/c e obtiveram  $\text{IC}_{50}$  igual a 92,7  $\mu\text{M}$  para  $10^6$  células/mL com 68 h de exposição [148], valor distinto do que foi obtido em nosso trabalho. Para  $10^6$  macrófagos/mL obtivemos um valor de  $\text{IC}_{50}$  igual a 145,83  $\mu\text{M}$  para as células em meio com SFB e 23,65  $\mu\text{M}$  em meio sem SFB.

Valores de  $\text{IC}_{50}$  para MT em amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* têm sido reportados para  $2 \times 10^6$  parasitos/mL, demonstrando que 50% do crescimento dos parasitos foi inibido com  $5,9 \pm 1,2 \mu\text{M}$  de MT [154]. Para uma concentração de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL, nós encontramos um valor de  $\text{IC}_{50}$  igual a 12,97  $\mu\text{M}$  para as amastigotas em meio com SFB e 6,46  $\mu\text{M}$  em meio sem SFB. Esses resultados se aproximam ao analisar as proporções celulares, pois a quantidade de células utilizadas em [154] é 2,5 vezes menor que a utilizada em nosso trabalho, portanto o  $\text{IC}_{50}$  obtido por eles também foi menor (aproximadamente 2,2 vezes).

Dependendo da lipofilicidade da molécula teste, aspectos biofísicos importantes como os abordados neste trabalho precisam ser levados em conta. A atividade citotóxica de um fármaco geralmente está relacionada com sua afinidade por membrana. De acordo com a teoria de partição, a afinidade de um composto pela membrana celular pode ser numericamente representada pelo seu coeficiente de partição membrana-água,  $K$ . Devido ao fato do valor de  $K$  ser usualmente difícil de medir, o coeficiente de partição octanol-água

( $\text{Log } P_{o/w}$ ) tem sido largamente utilizado como uma estimativa de  $\text{Log } K$ . Para a MT tem sido reportado um  $\text{Log } P_{o/w} = 2,25$  ( $P_{o/w} = 178$ ) [155], o qual é bastante diferente dos valores obtidos neste trabalho. Para os parasitos amastigotas encontrou-se um  $\text{Log}K = 5,82 \pm 0,10$  utilizando meio de cultura sem SFB e  $\text{Log}K = 5,01 \pm 0,06$  em meio com 10% de SFB, portanto  $K = (6,78 \pm 1,47) \times 10^5$  e  $K = (1,02 \pm 0,15) \times 10^5$ , respectivamente. O coeficiente de partição membrana dos macrófagos-água obtido foi de  $K = (1,56 \pm 0,62) \times 10^5$  ( $\text{Log } K = 5,19 \pm 0,02$ ) em meio sem SFB e  $K = (0,19 \pm 0,04) \times 10^5$  ( $\text{Log}K = 4,27 \pm 0,08$ ) em meio com SFB. Para as promastigotas encontrou-se  $K = (0,36 \pm 0,02) \times 10^5$  ( $\text{Log}K = 4,57 \pm 0,03$ ) em meio com 10% de SFB. As membranas dos macrófagos peritoneais apresentaram os menores valores de coeficiente de partição, indicando uma menor afinidade da MT pela membrana destas células. Além disso, a concentração crítica na membrana que leva as células à morte foi maior para os macrófagos ( $2,7 \pm 0,4$  M) do que para as leishmânias nas formas amastigotas ( $1,40 \pm 0,20$  M) e promastigotas ( $0,6 \pm 0,1$  M) para a situação com SFB (Tabela 2). Os eritrócitos foram as células mais sensíveis a MT, apresentando os menores valores para  $c_w$  e  $c_m$  e também de  $K$ , mostrando menor afinidade pela MT com relação às outras células.

Recentemente, Alonso *et al.* (submetido) analisaram o potencial hemolítico da MT, mostrando que a concentração que provoca 50% de hemólise varia de  $\sim 600$   $\mu\text{M}$  usando  $\sim 5 \times 10^9$  células/mL em PBS a  $\sim 2,9$   $\mu\text{M}$  para  $\sim 5 \times 10^6$  células/mL. O coeficiente de partição membrana do eritrócito-água encontrado foi de  $K = 48000$  ( $\text{Log } K = 4,68$ ). No sangue, o coeficiente de partição membrana de eritrócito-plasma sanguíneo da MT foi igual a  $K_{M/P} = 59$ ,  $\text{Log } K_{M/P} = 1,77$ . Esta dependência entre a concentração de células usada no ensaio e a concentração do fármaco que agride às células é indicativo de uma ação do fármaco na membrana celular, mostrando no caso que o nível hemolítico de 50% é encontrado quando a MT atinge uma concentração crítica na membrana do eritrócito, neste caso de 110 mM [trabalho submetido]. Os dados experimentais de hemólise também indicaram que a concentração de MT no sangue total é 86% da concentração no plasma sanguíneo. Esta informação é importante, pois os dados da farmacocinética de um fármaco geralmente expressa sua concentração no plasma sanguíneo e não no sangue

total. Assim, a quantidade de fármaco que penetra na membrana dos eritrócitos e outras células do sangue é desprezada; esta aproximação não é boa se o fármaco tem alta afinidade pela membrana. Por exemplo, a farmacocinética clínica da MT em pacientes com leishmaniose cutânea tratada com 150 mg de MT/dia por 28 dias mostrou uma concentração média no plasma de 30,8 µg de MT/mL, durante a última semana de tratamento. O pico de concentração foi de 51,6 µg/mL [156]. Já para pacientes com leishmaniose visceral, encontrou-se pico de concentração de MT no plasma de ~90 µg/mL [157]. Esta última concentração é equivalente a ~77 µg/mL no sangue total. Nesta concentração a MT provocou  $2,8 \pm 1,9\%$  de hemólise e com 150 µg/mL em sangue total (175 µg/mL no plasma),  $5,4 \pm 2,9\%$  de hemólise.

## 7 Conclusão

- ✓ A MT provoca um aumento considerável na dinâmica dos lipídios e das proteínas da membrana das amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e dos macrófagos peritoneais;
- ✓ As concentrações de MT que causaram alterações na dinâmica da superfície celular dos parasitos e macrófagos também provocaram a lise e morte das células.
- ✓ Os valores de  $IC_{50}$  da MT são dependentes das concentrações de células utilizadas no ensaio. Quanto maior a concentração de células menor o  $IC_{50}$  em número de moléculas de MT por célula e maior em concentração molar. Além disso, os ensaios realizados em meio contendo SFB apresentaram valores de  $IC_{50}$  consideravelmente maiores daqueles realizados em meio sem SFB;
- ✓ A MT apresenta maior afinidade pela membrana das amastigotas (maior  $K$ ) sendo os macrófagos as células menos sensíveis a MT (maiores  $c_w$  e  $c_m$ ). As promastigotas apresentaram mesma sensibilidade à MT que as amastigotas (mesmo  $c_w$ ), embora os valores médios de  $c_m$  e  $K$  serem significativamente menores. A concentração de MT na solução ( $c_w$ ) das amostras em meio de cultura contendo SFB foi consideravelmente maior que a concentração no meio sem SFB. Em amostras com baixa concentração de células, os valores de  $c_w$  foram aproximadamente iguais aos valores de  $IC_{50}$ .
- ✓ Concentrações de MT menores que o  $IC_{50}$  para  $2 \times 10^9$  parasitos/ml provocaram lise e morte celular nas amastigotas em concentração semelhante a que provocou alterações na sua membrana. Para  $7 \times 10^7$  macrófagos/ml, concentrações de MT menores que o  $IC_{50}$  provocaram lise e morte das células, porém as alterações significativas nas membranas foram observadas para concentrações razoavelmente maiores;

✓ Um possível mecanismo de ação da MT é o ataque nas proteínas ligadas à membrana celular, provocando conformações mais expandidas e exposição ao solvente, sugerindo um efeito tipo detergente da MT. A MT deve penetrar na membrana através de seu componente lipídico e interagir com as cadeias laterais hidrofóbicas na interface lipídio-proteína. Assim, com uma ação do tipo detergente, a MT pode formar estruturas semelhantes a micelas em torno das cadeias polipeptídicas favorecendo conformações mais dinâmicas e expostas ao solvente. Este processo pode levar à ruptura da membrana devido à penetração de grupos hidrofílicos da MT no seu interior e, conseqüentemente, a morte das células;

## 8 Perspectivas

- Aprimoramento da metodologia desenvolvida para o estudo da ação da MT em macrófagos peritoneais infectados com *L. (L.) amazonensis*. Analisar as células infectadas em um microscópio eletrônico, o qual permite uma ampliação maior das células, possibilitando assim uma visualização mais detalhada da ação da MT na membrana plasmática;
- Utilizar a metodologia desenvolvida para o estudo da ação da MT na membrana da *Leishmania* e macrófagos por RPE para o estudo de sua ação em outros tipos de micro-organismos e células, como células tumorais, por exemplo, a fim de compreender bem o seu mecanismo de ação;
- Usar as metodologias desenvolvidas para estudar a interação de outros fármacos hidrofóbicos que poderiam ter ação na membrana plasmática, visando contribuir com a procura na biodiversidade por novos medicamentos mais eficientes e com menos efeitos colaterais.

## 9 Referências Bibliográficas

- [1] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
- [2] World Health Organization. 2015. *Leishmaniasis fact sheet no. 375*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>. [Acesso: 28 de Julho de 2015].
- [3] S. Singh and R. Sivakumar, “Challenges and New Discoveries in the Treatment of Leishmaniasis,” *J. Infect. Chemother.*, vol. 10, no. 6, pp. 307–315, 2004.
- [4] P. L. Olliaro, P. J. Guerin, S. Gerstl, A. A. Haaskjold, J.A. Rottingen, and S. Sundar, “Treatment Options for Visceral Leishmaniasis: a Systematic Review of Clinical Studies Done in India, 1980-2004.,” *Lancet Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, pp. 763–774, 2005.
- [5] B. Monge-Maillo and R. López-Vélez, “Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations,” *Rev. of Anti-Infec. Agents*, vol. 60, pp. 1398–1404, 2015.
- [6] S. K. Bhattacharya, P. K. Sinha, S. Sundar, C. P. Thakur, T. K. Jha, K. Pandey, V. R. Das, N. Kumar, C. Lal, N. Verma, V. P. Singh, A. Ranjan, R. B. Verma, G. Anders, H. Sindermann, and N. K. Ganguly, “Phase 4 Trial of Miltefosine for the Treatment of Indian Visceral Leishmaniasis.,” *J. Infect. Dis.*, vol. 196, pp. 591–598, 2007.
- [7] J. Soto, B. A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J. C. Vega, A. Diaz, M. Luz, P. Gutierrez, M. Arboleda, J. D. Berman, K. Junge, J. Engel, and H. Sindermann, “Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis.,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 38, pp. 1266–1272, 2004.
- [8] J. Soto, J. Toledo, L. Valda, M. Balderrama, I. Rea, R. Parra, J. Ardiles, P. Soto, A. Gomez, F. Molleda, C. Fuentelsaz, G. Anders, H. Sindermann, J. Engel, and J. Berman, “Treatment of Bolivian Mucosal Leishmaniasis with Miltefosine.,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 44, pp. 350–356, 2007.
- [9] S. Sundar and P. L. Olliaro, “Miltefosine in the Treatment of Leishmaniasis: Clinical Evidence for Informed Clinical Risk Management,” *Ther. Clin. Risk Manag.*, vol. 3, no. 5, pp. 733–740, 2007.
- [10] W. J. van Blitterswijk and M. Verheij, “Anticancer Alkylphospholipids: Mechanisms of Action, Cellular Sensitivity and Resistance, and Clinical Prospects.,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, no. 21, pp. 2061–2074, 2008.

- [11] T. P. C. Dorlo, M. Balasegaram, J. H. Beijnen, and P. J. de Vries, "Miltefosine: A review of its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, no. 11, pp. 2576–2597, 2012.
- [12] W. Moreira, P. Leprohon, and M. Ouellette, "Tolerance to Drug-induced Cell Death Favours the Acquisition of Multidrug Resistance in Leishmania.," *Cell Death Dis.*, vol. 2, no. 9, p. e201, 2011.
- [13] L. Alonso, S. A. Mendanha, C. A. Marquezin, M. Berardi, A. S. Ito, A. U. Acuña, and A. Alonso, "Interaction of Miltefosine with Intercellular Membranes of Stratum Corneum and Biomimetic Lipid Vesicles," *Int. J. Pharm.*, vol. 434, no. 1–2, pp. 391–398, 2012.
- [14] R. A. Moreira, S. A. Mendanha, D. Hansen, and A. Alonso, "Interaction of Miltefosine with the Lipid and Protein Components of the Erythrocyte Membrane," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, pp. 1661–1669, 2013.
- [15] R. A. Moreira, S. A. Mendanha, K. S. Fernandes, G. G. Matos, L. Alonso, M. L. Dorta, and A. Alonso, "Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in Leishmania Membranes at Similar Concentrations to those Needed for Cytotoxicity Activity.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 6, pp. 1–10, 2014.
- [16] K. Chang, G. Chaudhuri, and D. Fong, "Molecular Determinants of Leishmania Virulence.," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol.44, pp. 499–529, 1990.
- [17] D. M. Mosser and A. Brittingham, "Leishmania, Macrophages and Complement: a Tale of Subversion and Exploitation.," *Parasitology*, vol. 115, pp. S9–23, 1997.
- [18] SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico Clínico e Diferencial*. 1ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006.
- [19] S. D. A. Basano and L. M. A. Camargo, "Leishmaniose Tegumentar Americana: Histórico, Epidemiologia e Perspectivas de Controle," *Rev. Bras. Epidemiol.*, vol. 7, no. 3, pp. 328–337, 2004.
- [20] I. A. S. S. JUNIOR, "Avaliação da Metaciclologênese in Vitro de *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*," Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública) - Instituto de Patologias Tropicais e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- [21] B. Gontijo and M. L. R. de Carvalho, "Leishmaniose Tegumentar Americana," *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, vol. 36, no. 1, pp. 71–80, 2003.
- [22] L. Puig and R. Pradinaud, "Leishmania and HIV Co-infection: Dermatological Manifestations.," *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, vol. 97, no. 1, pp. 107–114, 2003.

- [23] O. L. S. Almeida and J. B. Santos, "Avanços no Tratamento da Leishmaniose Tegumentar do Novo Mundo nos Últimos Dez Anos: Uma Revisão Sistemática da Literatura," *An. Bras. Dermatol.*, vol. 86, no. 3, pp. 497–506, 2011.
- [24] FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. *Guia de Vigilância Epidemiológica*. 5ª edição. Brasília: FUNASA, 2, pp. 503-524, 2002.
- [25] C. S. GOSCH, "Imunobiologia da Leishmaniose," Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, 2002.
- [26] S. Sundar, D. K. More, M. K. Singh, V. P. Singh, S. Sharma, A. Makharia, P. C. Kumar, and H. W. Murray, "Failure of Pentavalent Antimony in Visceral Leishmaniasis in India: Report from the Center of the Indian Epidemic.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 4, pp. 1104–1107, 2000.
- [27] J. D. Berman, "Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 24, no. 4, pp. 684–703, 1997.
- [28] M. Ouellette, J. Drummelsmith, and B. Papadopoulou, "Leishmaniasis: Drugs in the Clinic, Resistance and New Developments," *Drug Resist. Updat.*, vol. 7, no. 4–5, pp. 257–266, 2004.
- [29] J. Soto, J. Toledo, P. Gutierrez, R. S. Nicholls, J. Padilla, J. Engel, C. Fischer, A. Voss, and J. Berman, "Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis with Miltefosine, an Oral Agent.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 5, pp. E57–E61, 2001.
- [30] R. J. Soares-bezerra, L. Leon, and M. Genestra, "Recentes Avanços da Quimioterapia das Leishmanioses: Moléculas Intracelulares como Alvo de Fármacos.," *Rev. Bras. Ciências Farm.*, vol. 40, no. 2, pp. 139–149, 2004.
- [31] P. Roosevelt, T. Romão, R. D. O. Dias, K. K. Cruz, F. C. de Souza, and M. C. Monteiro, "Leishmaniose: Resposta Imune e Mecanismos Antioxidantes de Escape," *Rev. Pesqui. e Extensão em Saúde (UNESC)*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2007.
- [32] F. T. Silveira, S. R. Muller, A. A. A. de Souza, R. Lainson, C. M. C. Gomes, M. D. Laurenti, and C. E. P. Corbett, "Revisão sobre a Patogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana na Amazônia, com Ênfase à Doença Causada por *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis*," *Rev. Para. Med.*, vol. 22, no. 1, pp. 9–20, 2008.
- [33] F. T. Silveira, R. Lainson, and C. E. P. Corbett, "Clinical and Immunopathological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis with Special Reference to the Disease in Amazonian Brazil - A review," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 99, no. 3, pp. 239–251, 2004.

- [34] M. A. B. Flores, *Parasitologia Médica*, 3<sup>a</sup> edição. México: McGRAW-HILL Interamericana Editores, 2011.
- [35] D. P. Neves, A. L. de Melo, P. M. Linardi, and R. W. A. Vitor, *Parasitologia Humana*, 11<sup>a</sup> edição. Atheneu, 2005.
- [36] C. Muskus and M. Villa, "Metacicloogénesis: Un proceso Fundamental en la Biología de Leishmania," *Biomédica*, vol. 22, no. 2, pp. 167–177, 2002.
- [37] M. Venturoli, M. M. Sperotto, M. Kranenburg, and B. Smit, "Mesoscopic Models of Biological Membranes," *Phys. Rep.*, vol. 437, no. 1–2, pp. 1–54, 2006.
- [38] J. Schumann. 2012. The Impact of Macrophage Membrane Lipid Composition on Innate Immune Response Mechanisms, Inflammation, Chronic Diseases na Cancer - Cell and Molecular Biology, Immunology and Clinical Bases, Dr. Mahin Khatami (Ed.). Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/inflammation-chronic-diseases-and-cancer-cell-and-molecular-biology-immunology-and-clinical-bases/the-impact-of-macrophage-membrane-lipid-composition-on-innate-immune-response-mechanisms>.
- [39] S. J. Singer and G. L. Nicolson, "The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes". *Science*, vol. 175, pp. 720-731, 1972.
- [40] P. J. Quinn and C. Wolf, "The liquid-ordered Phase in Membranes," *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, vol. 1788, no. 1, pp. 33–46, 2009.
- [41] P. Schneider, C. Bordier, and R. Etges, "Membrane Proteins and Enzymes of Leishmania.," *Subcell. Biochem.*, vol. 18, pp. 39–72, 1992.
- [42] M. K. Wassef, T. B. Fioretti, and D. M. Dwyer, "Lipid Analyses of Isolated Surface Membranes of *Leishmania Donovanii* Promastigotes," *Lipids*, vol. 20, no. 2, pp. 108–115, 1985.
- [43] K. Zhang and S. M. Beverley, "Phospholipid and Sphingolipid Metabolism in Leishmania," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 170, no. 2, pp. 55–64, 2010.
- [44] K. A. G. Yoneyama, A. K. Tanaka, T. G. V. Silveira, H. K. Takahashi, and A. H. Straus, "Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* Membrane Microdomains, and their Role in Macrophage Infectivity.," *J. Lipid Res.*, vol. 47, no. 10, pp. 2171–2178, 2006.
- [45] S. C. Ilgutz and M. J. McConville, "Function and Assembly of the Leishmania Surface Coat," *Int. J. Parasitol.*, vol. 31, no. 9, pp. 899–908, 2001.
- [46] A. Descoteaux and S. J. Turco, "Glycoconjugates in Leishmania Infectivity," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1455, no. 2–3, pp. 341–352, 1999.

- [47] T. Ilg, E. Handman and Y. D. Stierhof, "Proteophosphoglycans from *Leishmania* Promastigotes and Amastigotes," *Biochem. Soc.*, vol. 27, no. 4, pp. 518–525, 1999.
- [48] M. J. McConville and A. Bacic, "The Glycoinositolphospholipid Profiles of two *Leishmania major* Strains that Differ in Lipophosphoglycan Expression," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 38, no. 1, pp. 57–67, 1990.
- [49] M. J. McConville and J. M. Blackwell, "Developmental Changes in the Glycosylated Phosphatidylinositols of *Leishmania donovani*. Characterization of the Promastigote and Amastigote Glycolipids.," *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 23, pp. 15170–15179, 1991.
- [50] V. Bahr, Y.-D. Stierhof, T. Ilg, M. Demar, M. Quinten, and P. Overath, "Expression of Lipophosphoglycan, High-molecular Weight Phosphoglycan and Glycoprotein 63 in Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania mexicana*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 58, no. 1, pp. 107–121, 1993.
- [51] J. C. Neto, "Motilidade do Citoesqueleto de Macrófagos e sua Relação com o Processo de Fagocitose Estudados Através de Microscopia de Desfocalização," Tese (Doutorado em Ciências - Física), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.
- [52] B. Burke and C. E. Lewis, *The Macrophage*, 2ª edição. New York: Oxford University Press Inc., 2002.
- [53] K. Kaushansky, M. A. Lichtman, E. Beutler, T. J. Kipps, U. Seligsohn, and J. T. Prchal, *Williams Hematology*, 8ª edição. China:McGraw-Hill Companies, pp. 989-998, 2010.
- [54] L. A. M. Mota, "Macrófagos Peritoneais de Camundongo Cultivados com Soro Homólogo Apresentam Grande Número de Corpos Lipídicos e Ação Microbicida Reduzida contra o *Toxoplasma Gondii*," Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) - Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, 2009.
- [55] A. D. A. Cassado, M. R. D'Império Lima, and K. R. Bortoluci, "Revisiting Mouse Peritoneal Macrophages: Heterogeneity, Development, and Function," *Front. Immunol.*, vol. 6, pp. 1–9, 2015.
- [56] M. P. Moretão, "Propriedades Biomoduladoras da Arabinogalactana (Aragal) de *Anadenanthera colubrina* (Angico branco)," Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.
- [57] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, 7ª edição. Philadelphia: Elsevier Inc., 2012.
- [58] S. Gordon, "The Macrophage: Past, Present and Future" *Eur. J. Immunol.*, vol.37, pp. S9–S17, 2007.

- [59] J. H. Hartwig and P. Shevlin, "The Architecture of Actin Filaments and the Ultrastructural Location of Actin-binding Protein in the Periphery of Lung Macrophages," vol. 103, no. 3, pp. 1007-1020, 1986.
- [60] D. O. Adams and T. A. Hamilton, "The Cell Biology of Macrophage Activation," *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 2, pp. 283-318, 1984.
- [61] C. Bryant and K. A. Fitzgerald, "Molecular Mechanisms Involved in Inflammasome Activation," vol.19, no. 9, pp. 455-464, 2009.
- [62] L. B. Oliveros, A. M. Videla, and M. S. Giménez, "Effect of Dietary fat Saturation on Lipid Metabolism, Arachidonic Acid Turnover and Peritoneal Macrophage Oxidative Stress in Mice.," *Braz. J. Med. Biol. Res.*, vol. 37, no. 3, pp. 311-320, 2004.
- [63] Z. A. Cohn, "The Structure and Function of Monocytes and Macrophages," *Adv. Immunol.*, vol. 9, pp. 163-214, 1968.
- [64] A. A. Cassado, "Heterogeneidade dos Macrófagos Peritoneais," Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.
- [65] C. C. Akoh and R. S. Chapkin, "Composition of Mouse Peritoneal Macrophage Phospholipid Molecular Species.," *Lipids*, vol. 25, no. 10, pp. 613-617, 1990.
- [66] C. S. Chang and K. P. Chang, "Monoclonal Antibody Affinity Purification of a Leishmania Membrane Glycoprotein and its Inhibition of Leishmania-Macrophage Binding.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 83, no. 1, pp. 100-104, 1986.
- [67] M. C. de Almeida, V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto, "Leishmanial Infection: Analysis of its First Steps. A Review," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 98, no. 7, pp. 861-870, 2003.
- [68] M. G. Rittig and C. Bogdan, "Leishmania-host-cell Interaction: Complexities and Alternative Views," *Parasitol. Today*, vol. 16, no. 7, pp. 292-297, 2000.
- [69] C. Bogdan and M. Rölinghoff, "The Immune Response to Leishmania: Mechanisms of Parasite Control and Evasion," *Int. J. Parasitol.*, vol. 28, no. 1, pp. 121-134, 1998.
- [70] D. M. Mosser and L. A. Rosenthal, "Leishmania-Macrophage Interactions: Multiple Receptors, Multiple Ligands and Diverse Cellular Responses," *Semin Cell Biol.*, vol. 4, no. 5, pp. 315-322, 1993.
- [71] D. M. Mosser and P. J. Edelson, "The Third Component of Complement (C3) is Responsible for the Intracellular Survival of *Leishmania major*," *Nature*, vol. 327, no. 6120, pp. 329-331, 1987.

- [72] J. D. Esko, "Genetic Analysis of Proteoglycan Structure, Function and Metabolism," *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 3, no. 5, pp. 805–816, 1991.
- [73] D. J. Wyler, J. P. Sypek, and J. A. McDonald, "In vitro Parasite-Monocyte Interactions in Human Leishmaniasis: Possible Role of Fibronectin in Parasite Attachment," *Infect. Immun.*, vol. 49, no. 2, pp. 305–311, 1985.
- [74] E. Handman and J. W. Goding, "The Leishmania Receptor for Macrophages is a Lipid-containing Glycoconjugate.," *EMBO J.*, vol. 4, no. 2, pp. 329–336, 1985.
- [75] S. K. Perdomo, "Caracterização Funcional da Proteína LRR17 em *Leishmania ( Leishmania ) major*," Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- [76] J. Chan, T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen, and B. R. Bloom, "Microbial Glycolipids: Possible Virulence Factors that Scavenge Oxygen Radicals.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 86, no. 7, pp. 2453–2457, 1989.
- [77] Y. Eilam, J. El-On, and D. T. Spira, "*Leishmania major*: Excreted Factor, Calcium Ions, and the Survival of Amastigotes.," *Exp. Parasitol.*, vol. 59, no. 2, pp. 161–168, 1985.
- [78] H. W. Murray, "Susceptibility of *Leishmania* to Oxygen Intermediates and Killing by Normal Macrophages," *J. Exp. Med.*, vol. 153, no. 5, pp. 1302–1315, 1981.
- [79] S. L. Croft and J. Engel, "Miltefosine - Discovery of the Antileishmanial Activity of Phospholipid Derivatives," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 100, no. Suppl. 1, pp. 4–8, 2006.
- [80] H. Eibl and C. Unger, "Hexadecylphosphocholine: A New and Selective Antitumor Drug," *Cancer Treat. Rev.*, vol. 17, no. 2–3, pp. 233–242, 1990.
- [81] C. H. Smorenburg, C. Seynaeve, M. Bontenbal, A. Planting, H. Sindermann, and J. Verweij, "Phase II Study of Miltefosine 6 % Solution as Topical Treatment of Skin Metastases in Breast Cancer Patients," vol.11, no. 10, pp. 825–828, 2000.
- [82] S. Sundar and M. Chatterjee, "Visceral Leishmaniasis - Current Therapeutic Modalities.," *Indian J. Med. Res.*, vol. 123, no. 3, pp. 345–352, 2006.
- [83] Paladin Labs Inc. "Application for Inclusion of Miltefosine on WHO Model List of Essential Medicines." 2010. [http://www.who.int/selection\\_medicines/committees/expert/18/applications/Miltefosine\\_application.pdf](http://www.who.int/selection_medicines/committees/expert/18/applications/Miltefosine_application.pdf). [Accesso: 03 de setembro de 2015].

- [84] World Health Organization, "WHO Model List of Essential Medicines - 17<sup>th</sup> List." 2011. [http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2011/a95053_eng.pdf). [Accesso: 03 de setembro de 2015]
- [85] S. L. Croft, R. A. Neal, W. Pendergast, and J. H. Chan, "The Activity of Alkyl Phosphorylcholines and Related Derivatives Against *Leishmania donovani*," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 36, no. 16, pp. 2633–2636, 1987.
- [86] A. Kuhlencord, T. Maniera, H. Eibl, and C. Unger, "Hexadecylphosphocholine: Oral Treatment of Visceral Leishmaniasis in Mice," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 36, no. 8, pp. 1630–1634, 1992.
- [87] J. Mishra, A. Saxena, and S. Singh, "Chemotherapy of Leishmaniasis: Past, Present and Future," vol. 14, no. 10, pp. 1153–1169, 2007.
- [88] L. Kedzierski, A. Sakthianandeswaren, J. M. Curtis, P. C. Andrews, P. C. Junk, and K. Kedzierska, "Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 16, no. 5, pp. 599–614, 2009.
- [89] A. Ponte-Sucre, E. Díaz, and M. Padrón-Nieves, *Drug Resistance in Leishmania Parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments*, 1<sup>a</sup> edição. Springer, 2013.
- [90] M. Rakotomanga, M. Saint-Pierre-Chazalet, and P. M. Loiseau, "Alteration of Fatty Acid and Sterol Metabolism in Miltefosine-Resistant *Leishmania donovani* Promastigotes and Consequences for Drug-Membrane Interactions," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 7, pp. 2677–2686, 2005.
- [91] F. J. Pérez-Victoria, S. Castanys, and F. Gamarro, "*Leishmania donovani* Resistance to Miltefosine Involves a Defective Inward Translocation of the Drug," *Antimicrob. Agents Chemother.* vol. 47, no. 8, pp. 2397–2403, 2003.
- [92] T. Pomorski, J. C. Holthuis, A. Herrmann, and G. van Meer, "Tracking Down Lipid Flippases and their Biological Functions," vol. 117, no. Pt 6, pp. 805–813, 2004.
- [93] M. J. Mcconville, K. A. Mullin, S. C. Ilgoutz, and R. D. Teasdale, "Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites," *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 66, no. 1, pp. 122–154, 2002.
- [94] F. J. Pérez-Victoria, M. P. Sánchez-Cañete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, and F. Gamarro, "Mechanisms of Experimental Resistance of *Leishmania* to Miltefosine: Implications for Clinical Use," *Drug Resist. Updat.*, vol. 9, no. 1–2, pp. 26–39, 2006.
- [95] S. L. Croft and G. H. Coombs, "Leishmaniasis - Current Chemotherapy and Recent Advances in the Search for Novel Drugs," *Trends Parasitol.*, vol. 19, no. 11, pp. 502–508, 2003.

- [96] J. M. Pérez-Victoria, F. J. Pérez-Victoria, A. Parodi-Talice, I. A. Jiménez, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro, "Alkyl-Lysophospholipid Resistance in Multidrug-Resistant *Leishmania tropica* and Chemosensitization by a Novel P-Glycoprotein-Like Transporter Modulator," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 9, pp. 2468–2474, 2001.
- [97] E. Palumbo, "Oral Miltefosine Treatment in Children with Visceral Leishmaniasis: a Brief Review.," *Braz. J. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 1, pp. 2–4, 2008.
- [98] J. M. Jiménez-López, P. Ríos-Marco, C. Marco, J. L. Segovia, and M. P. Carrasco, "Alterations in the Homeostasis of Phospholipids and Cholesterol by Antitumor Alkylphospholipids.," *Lipids Health Dis.*, vol. 9, no. 33, pp.1-10, 2010.
- [99] T. Wieder, W. Reutter, C. E. Orfanos, and C. C. Geilen, "Mechanisms of Action of Phospholipid Analogs as Anticancer Compounds," *Prog. Lipid Res.*, vol. 38, no. 3, pp. 249–259, 1999.
- [100] D. Berkovic, J. H. Wernicke, and E. a M. Fleer, "Effects of Etherlipid Analogs on Cell Membrane Functions," *J. Exp. Ther. Oncol.*, vol. 3, no. 4, pp. 185–193, 2003.
- [101] H. Lux, N. Heise, T. Klenner, D. Hart, and F. R. Opperdoes, "Ether-Lipid (Alkyl-phospholipid) Metabolism and the Mechanism of Action of Ether-lipid Analogues in *Leishmania*," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 111, no. 1, pp. 1–14, 2000.
- [102] J. R. Luque-Ortega and L. Rivas, "Miltefosine (hexadecylphosphocholine) Inhibits Cytochrome c Oxidase in *Leishmania donovani* Promastigotes," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 51, no. 4, pp. 1327–1332, 2007.
- [103] H. W. Murray, C. Montelibano, R. Peterson, and J. P. Sypek, "Interleukin-12 Regulates the Response to Chemotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis.," *J. Infect. Dis.*, vol. 182, no. 5, pp. 1497–1502, 2000.
- [104] H. Sindermann and J. Engel, "Development of Miltefosine as an Oral Treatment for Leishmaniasis," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 100, no. Suppl. 1, pp. S17–S20, 2006.
- [105] J. Berman, "Miltefosine to Treat Leishmaniasis.," *Expert Opin. Pharmacother.*, vol. 6, no. 8, pp. 1381–1388, 2005.
- [106] S. Sundar, T. K. Jha, C.P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson, J. Berman, "Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis," *N Engl J Med*, vol. 347, no. 22, pp. 1739–1746, 2002.
- [107] D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis*, 6ª edição. Belmont: Thomson Brooks/Cole, 2007.

- [108] A. A. X. Leal, C. A. Henriques, and A. S. Luna, "Validação e Estimativa da Incerteza do Método de Determinação de Fósforo por Espectrofotometria UV-Vis," *Rev. Analítica*, vol. 32, pp. 28–34, 2008.
- [109] J. M. G. Martinho, "Espectroscopia de Absorção no Ultra-Violeta e Visível," *Química*, vol 52, pp. 44 - 48, 1994.
- [110] F. R. P. Rocha and L. S. G. Teixeira, "Estratégias para Aumento de Sensibilidade em Espectrofotometria UV-VIS," *Quim. Nova*, vol. 27, no. 5, pp. 807–812, 2004.
- [111] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, *Fundamentos De Química Analítica*, 8ª edição. São Paulo: Thomson, 2006.
- [112] D. L. Pavia, G. M. Lampman, G. S. Kriz, and J. R. Vyvyan, *Introduction to Spectroscopy*, 4ª edição. Belmont: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2009.
- [113] H. M. Swartz, J. R. Bolton, and D. C. Borg, *Biological Applications of Electron Spin Resonance*, 1ª edição. New York: John Wiley & Sons, 1972.
- [114] A. Abragam and B. Bleaney, *Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions*, 1ª edição. Oxford: Clarendon Press, 1970.
- [115] J. R. Perussi, A. C. Ruggiero, and M. Tabak, "O Método de Marcadores de Spin Aplicado a Bioquímica," *Química nova*, vol. 8, no. 4. pp. 313–324, 1985.
- [116] D. M. Murphy, "EPR ( Electron Paramagnetic Resonance ) Spectroscopy of Polycrystalline Oxide Systems". Em: S. D. Jackson and J. S. J. Hargreaves, *Metal Oxide Catalysis*, 1ª edição. New York: Wiley-VCH, 2009.
- [117] M. Brustolon and E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- [118] S. A. Dikanov and A. R. Crofts, "Electron Paramagnetic Resonance." Em: D. R. Vij, *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*, 1ª edição. New York: Springer, 2006.
- [119] I. D. Sahu, R. M. Mccarrick, and G. A. Lorigan, "Use of Electron Paramagnetic Resonance To Solve Biochemical Problems," *Biochemistry*, vol. 52, no. 35, pp. 5967–5984, 2013.
- [120] P. M. Plonka, "Electron Paramagnetic Resonance as a Unique Tool for Skin and Hair Research," *Exp. Dermatol.*, vol. 18, no. 5, pp. 472–484, 2009.
- [121] C. E. G. Salmon, D. S. Neto, M. Tabak, and A. J. Costa-Filho, "Simulação de Espectros de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) Através do Programa NLSL," *Química nova*, vol. 30, no. 5, pp. 1240–1248, 2007.

- [122] J. P. Klare and H. J. Steinhoff, "Spin labeling EPR," *Photosynth. Res.*, vol. 102, no. 2-3, pp. 377–390, 2009.
- [123] S. Schreier, "Estudos estruturais e dinâmicos de membranas pelo método do marcador de spin," Tese de livre docência, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.
- [124] H. S. de Camargos, "Estudo de Membranas Modelo e Efeitos de Terpenos em Membranas de Leishmania por Ressonância Paramagnética Eletrônica," Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- [125] J. L. V. Anjos, "Interações da Albumina de Soro Bovino com Surfactantes e Efeitos de Antioxidantes sobre a Oxidação de Lipoproteínas de Baixa Densidade Induzida por Íons de Cobre," Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.
- [126] P. P. Borbat, A. J. Costa-Filho, K. A. Earle, J. K. Moscicki, and J. H. Freed, "Electron Spin Resonance in Studies of Membranes and Proteins," *Science*, vol. 291, no. 5502, pp. 266–269, 2001.
- [127] J. C. P. Poole, *Electron Spin Resonance - A comprehensive treatise on experimental techniques*, 2<sup>a</sup> edição. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1983.
- [128] W. R. Hagen, *Biomolecular EPR Spectroscopy*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2009.
- [129] P. H. Rieger, *Electron Spin Resonance: Analysis and Interpretation*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2007.
- [130] M. C. Teixeira, R. J. Santos, R. B. Sampaio, L. Pontes-de-Carvalho, and W. L. dos-Santos, "A Simple and Reproducible Method to Obtain Large Numbers of Axenic Amastigotes of Different Leishmania Species," *Parasitol. Res.*, vol. 88, no. 8, pp. 963–968, 2002.
- [131] L. Cysne-Finkelstein, R. M. Temporal, F. A. Alves, and L. L. Leon, "Leishmania amazonensis: Long-term Cultivation of Axenic Amastigotes is Associated to Metacyclogenesis of Promastigotes.," *Exp. Parasitol.*, vol. 89, no. 1, pp. 58–62, 1998.
- [132] E. T. de Almeida, A. E. Mauro, A. M. Santana, A. V. G. Netto, and I. Z. Carlos, "Emprego de Compostos Organometálicos Mononucleares de Paládio(ii) na Ativação de Macrófagos Peritoneais de Camundongos," *Quim. Nova*, vol. 28, no. 3, pp. 405–408, 2005.
- [133] H. S. Camargos, R. A. Moreira, S. A. Mendanha, K. S. Fernandes, M. L. Dorta, and A. Alonso, "Terpenes Increase the Lipid Dynamics in the Leishmania Plasma Membrane at Concentrations Similar to their IC50 Values," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, pp. e104429, 2014.

- [134] A. M. Sieuwerts, J. G. Klijn, H. A. Peters, and J. A. Foekens, "The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures in Vitro for the Assessment of Growth Characteristics, IC50-Values and Cell Survival.," *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, vol. 33, no. 11, pp. 813–823, 1995.
- [135] V. H. Hodgkinson, L. Soong, S. M. Duboise, and D. McMahon-Pratt, "*Leishmania amazonensis*: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms.," *Exp. Parasitol.*, vol. 83, no. 1, pp. 94–105, 1996.
- [136] A. Alonso, J. V. da Silva, and M. Tabak, "Hydration Effects on the Protein Dynamics in Stratum Corneum as Evaluated by EPR Spectroscopy," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1646, no. 1-2, pp. 32–41, 2003.
- [137] S. G. do Couto, M. S. Oliveira, and A. Alonso, "Dynamics of Proteins and Lipids in the Stratum Corneum: Effects of Percutaneous Permeation Enhancers," *Biophys. Chem.*, vol. 116, no. 1, pp. 23–31, 2005.
- [138] A. Alonso, W. P. dos Santos, S. J. Leonor, J. G. dos Santos, and M. Tabak, "Stratum Corneum Protein Dynamics as Evaluated by a Spin-label Maleimide Derivative: Effect of Urea.," *Biophys. J.*, vol. 81, no. 6, pp. 3566–3576, 2001.
- [139] M. W. Vaughn, K. T. Huang, L. Kuo, and J. C. Liao, "Erythrocyte Consumption of Nitric Oxide: Competition Experiment and Model Analysis.," *Nitric Oxide*, vol. 5, no. 1, pp. 18–31, 2001.
- [140] P. C. Jost, O. H. Griffith, R. A. Capaldi, and G. Vanderkooi, "Evidence for Boundary Lipid in Membranes.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 70, no. 2, pp. 480–484, 1973.
- [141] R. A. Moreira, S. A. Mendanha, D. Hansen, and A. Alonso, "Interaction of Miltefosine with the Lipid and Protein Components of the Erythrocyte Membrane.," *J. Pharm. Sci.*, vol. 102, no. 5, pp. 1661–1669, 2013.
- [142] J. L. Anjos, P.S. Santiago, M. Tabak, A. Alonso. "On the Interaction of Bovine Serum Albumin with Ionic Surfactants: Temperature Induced EPR Changes of a Maleimide Nitroxide Reflect Local Protein Dynamics and Probe Solvent Accessibility," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 88, no. 1, pp. 463–470, 2011.
- [143] F. Widmer, L. C. Wright, D. Obando, R. Handke, R. Ganendren, D. H. Ellis, and T. C. Sorrell, "Hexadecylphosphocholine ( Miltefosine ) Has Broad-Spectrum Fungicidal Activity and Is Efficacious in a Mouse Model of Cryptococcosis," vol. 50, no. 2, pp. 414–421, 2006.
- [144] S. L. Croft, K. Seifert, and M. Duchêne, "Antiprotozoal Activities of Phospholipid Analogues," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 126, no. 2, pp. 165–172, 2003.

- [145] G. A. Ruiter, S. F. Zerp, H. Bartelink, W. J. van Blitterswijk, and M. Verheij, "Anti-cancer Alkyl-lysophospholipids Inhibit the Phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB Survival Pathway.," *Anticancer Drugs*, vol. 14, no. 2, pp. 167–173, 2003.
- [146] D. C. Ayres, L. A. Pinto, and S. Giorgio, "Efficacy of Pentavalent Antimony, Amphotericin B, and Miltefosine in *Leishmania amazonensis*-Infected Macrophages Under Normoxic and Hypoxic Conditions.," *J. Parasitol.*, vol. 94, no. 6, pp. 1415–1417, 2008.
- [147] E. Morais-Teixeira, Q. S. Damasceno, M. K. Galuppo, A. J. Romanha, and A. Rabello, "The in Vitro Leishmanicidal Activity of Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) Against Four Medically Relevant *Leishmania* Species of Brazil," *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 106, no. 4, pp. 475–478, 2011.
- [148] R. M. Santa-Rita, A. Henriques-Pons, H. S. Barbosa, and S. L. de Castro, "Effect of the Lysophospholipid Analogues Edelfosine, Ilmofosine and Miltefosine Against *Leishmania amazonensis*.,," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 54, no. 4, pp. 704–10, 2004.
- [149] D. T. S. de Paula, G. S. G. de Carvalho, A. C. Almeida, M. Lourenço, A. D. da Silva, and E. S. Coimbra, "Synthesis , Cytotoxicity and Antileishmanial Activity of Aza-stilbene Derivatives," *Mediterranean Journal of Chemistry*, vol. 2, no. 3, pp. 493–502, 2013.
- [150] L. M. Antinarelli, N.C. Pinto, E. Scio, and E. S. Coimbra, "Antileishmanial Activity of Some Brazilian Plants , with Particular Reference to *Casearia sylvestris*," *An. Acad. Bras. Cienc.*, vol. 87, no. 2, pp. 733–742, 2015.
- [151] C. Paris, P. M. Loiseau, C. Bories, and J. Bréard, "Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 3, pp. 852–859, 2004.
- [152] N. K. Verma, G. Singh, and C. S. Dey, "Miltefosine Induces Apoptosis in Arsenite-resistant *Leishmania donovani* Promastigotes through Mitochondrial Dysfunction," *Exp. Parasitol.*, vol. 116, no. 1, pp. 1–13, 2007.
- [153] M. Vermeersch, R. I. da Luz, K. Tote, J. P. Timmermans, P. Cos, and L. Maes, "In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 9, pp. 3855–3859, 2009.
- [154] R. E. Varela-M, J. A. Villa-Pulgarin, E. Yepes, I. Müller, M. Modolell, D. L. Muñoz, S. M. Robledo, C. E. Muskus, J. López-Abán, A. Muro, I. D. Vélez, and F. Mollinedo, "In Vitro and In Vivo Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 4, p. e1612, 2012.

[155] Chemicalize.org - Chem-Axon. Online. "<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Miltefosine>." [Acesso: 26 de dezembro de 2015].

[156] T. P. Dorlo, P. P. van Thiel, A. D. Huitema, R. J. Keizer, H. J. de Vries, J. H. Beijnen, and P. J. de Vries, "Pharmacokinetics of Miltefosine in Old World Cutaneous Leishmaniasis Patients.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 52, no. 8, pp. 2855–2860, 2008.

[157] T. P. Dorlo, A. D. Huitema, J. H. Beijnen, and P. J. de Vries, "Optimal Dosing of Miltefosine in Children and Adults with Visceral Leishmaniasis.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 7, pp. 3864–3872, 2012.

# Apêndice

## Artigos Publicados

1 - R. A. Moreira, S. A. Mendanha, **K. S. Fernandes**, G. G. Matos, L. Alonso, M. L. Dorta, and A. Alonso, "Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in Leishmania Membranes at Similar Concentrations to those Needed for Cytotoxicity Activity.," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, no. 6, pp. 1–10, 2014.

### Miltefosine Increases Lipid and Protein Dynamics in *Leishmania amazonensis* Membranes at Concentrations Similar to Those Needed for Cytotoxicity Activity

Rodrigo Alves Moreira,<sup>1</sup> Sebastião Antonio Mendanha,<sup>2</sup> Kelly Souza Fernandes,<sup>2</sup> Grazielle Guimarães Matos,<sup>2</sup> Luis Alonso,<sup>2</sup> Miriam Leandro Dorta,<sup>2</sup> Antonio Alonso<sup>2</sup>

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Imunologia e Patologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Miltefosine (MT) is a membrane-active alkylphospholipid licensed for the topical treatment of breast cancer skin metastases and the oral treatment of leishmaniasis, although its mechanism of action remains unclear. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of a spin-labeled lipid and a thiol-specific spin label in the plasma membrane of *Leishmania* promastigotes showed that MT causes dramatic increases in membrane dynamics. Although these alterations can be detected using a spin-labeled lipid, our experimental results indicated that MT interacts predominantly with the protein component of the membrane. Cell lysis was also detected by analyzing the supernatants of centrifuged samples for the presence of spin-labeled membrane fragments and cytoplasmic proteins. Using a method for the rapid incorporation of MT into the membrane, these effects were measured immediately after treatment under the same range of MT concentrations that cause cell growth inhibition. Cytotoxicity, estimated via microscopic counting of living and dead cells, indicated ~70% cell death at the concentration of MT at which EPR spectroscopy detected a significant change in membrane dynamics. After this initial impact on the number of viable parasites, the processes of cell death and growth continued during the first 4 h of incubation. The EPR spectra of spin-labeled membrane-bound proteins were consistent with more expanded and solvent-exposed protein conformations, suggesting a detergent-like action. Thus, MT may form micelle-like structures around polypeptide chains, and proteins with a higher hydrophobicity may induce the penetration of hydrophilic groups of MT into the membrane, causing its rupture.

2 - H. S. Camargos, R. A. Moreira, S. A. Mendanha, **K. S. Fernandes**, M. L. Dorta, and A. Alonso, "Terpenes Increase the Lipid Dynamics in the Leishmania Plasma Membrane at Concentrations Similar to their IC50 Values," *PLoS One*, vol. 9, no. 8, pp. e104429, 2014.

OPEN ACCESS Freely available online



### Terpenes Increase the Lipid Dynamics in the *Leishmania* Plasma Membrane at Concentrations Similar to Their IC<sub>50</sub> Values

Heverton Silva Camargos<sup>1,2</sup>, Rodrigo Alves Moreira<sup>1</sup>, Sebastião Antonio Mendanha<sup>1</sup>, Kelly Souza Fernandes<sup>1</sup>, Miriam Leandro Dorta<sup>2</sup>, Antonio Alonso<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil; <sup>2</sup> Engenharia Biológica, Fundação Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO, Brazil; <sup>3</sup> Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Imunologia e Patologia Geral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, Brazil

#### Abstract

Although many terpenes have shown antitumor, antibacterial, antifungal, and antiparasitic activity, the mechanism of action is not well established. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy of the spin-labeled 5-doxyl stearic acid revealed remarkable fluidity increases in the plasma membrane of terpene-treated *Leishmania amazonensis* promastigotes. For an antiproliferative activity assay using  $5 \times 10^6$  parasites/mL, the sesquiterpene nerolidol and the monoterpenes (+)-limonene,  $\alpha$ -terpineol and 1,8-cineole inhibited the growth of the parasites with IC<sub>50</sub> values of 0.008, 0.549, 0.678 and 4.697 mM, respectively. The IC<sub>50</sub> values of these terpenes increased as the parasite concentration used in the cytotoxicity assay increased, and this behavior was examined using a theoretical treatment of the experimental data. Cytotoxicity tests with the same parasite concentration as in the EPR experiments revealed a correlation between the IC<sub>50</sub> values of the terpenes and the concentrations at which they altered the membrane fluidity. In addition, the terpenes induced small amounts of cell lysis (4–9%) at their respective IC<sub>50</sub> values. For assays with high cell concentrations ( $2 \times 10^7$  parasites/mL), the incorporation of terpene into the cell membrane was very fast, and the IC<sub>50</sub> values observed for 24 h and 5 min-incubation periods were not significantly different. Taken together, these results suggest that terpene cytotoxicity is associated with the attack on the plasma membrane of the parasite. The *in vitro* cytotoxicity of nerolidol was similar to that of miltefosine, and nerolidol has high hydrophobicity; thus, nerolidol might be used in drug delivery systems, such as lipid nanoparticles to treat leishmaniasis.