



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Novas estratégias terapêuticas para a
leishmaniose : Efeitos do *p* -cimeno e 2-
nitro-*p* -cimeno em *Leishmania*
Infantum

Mariana Vagos Ribeiro

2011



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose : Efeitos do *p* -cimeno e 2- nitro-*p* -cimeno em *Leishmania* *Infantum*

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria do Céu Rodrigues de Sousa (Universidade de Coimbra) e do Professor Doutor José Barata Custódio (Universidade de Coimbra)

Mariana Vagos Ribeiro

2011

ÍNDICE

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	Pag. 8
ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS	Pag. 10
ABREVIATURAS	Pag. 13
I.- RESUMO	Pag. 16
II - INTRODUÇÃO	Pag. 20
1.- <i>Leishmania</i> e a leishmaniose	Pag. 20
1.1- Classificação taxonómica de <i>L. infantum</i>	Pag. 20
1.2- Morfologia e ciclo biológico.....	Pag. 21
1.3- Fisiopatologia da leishmaniose.....	Pag. 23
1.3.1- Leishmaniose visceral.....	Pag. 24
1.3.2- Leishmaniose cutânea.....	Pag. 25
1.3.3 - Leishmaniose muco-cutânea.....	Pag. 26
1.4- Epidemiologia.....	Pag. 26
1.5- Terapêutica.....	Pag. 28
2- Os óleos essenciais e actividade biológica	Pag. 30
3.- Estrutura e funções da mitocôndria	Pag. 31
3.1- Fisiologia, ultra estrutura e funções metabólicas das mitocôndrias	Pag. 31
3.2- O sistema de transporte de electrões e a fosforilação oxidativo....	Pag. 33
3.3- Envolvimento da mitocôndria nos mecanismos de morte celular...	Pag. 36
3.3.1- Importância da mitocôndria nos processos apoptóticos.....	Pag. 37
3.4 - Acção da mitocôndria na homeostase do Ca ²⁺ celular.....	Pag. 40
3.5- Permeabilidade transitória mitocondrial.....	Pag. 43

III- OBJECTIVOS.....	Pag. 47
IV - MATERIAL E MÉTODOS.....	Pag. 49
1- Susceptibilidade de <i>Leishmania infantum</i> ao 2-nitro-<i>p</i>-cimeno e <i>p</i>-cimeno.....	Pag. 49
1.1- Origem das estirpes e manutenção das culturas.....	Pag. 49
1.2- Determinação do crescimento.....	Pag. 49
1.3- Estudos de viabilidade celular.....	Pag. 50
1.4- Estudos morfológicos.....	Pag. 52
2- Avaliação dos efeitos do 2-nitro-<i>p</i>-cimeno e do <i>p</i>-cimeno na bioenergética mitocondrial.....	Pag. 53
2.1- Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato.....	Pag. 53
2.2- Determinação da concentração de proteína.....	Pag. 54
2.3- Determinação do consumo de oxigênio.....	Pag. 54
2.4- Determinação do potencial de membrana das mitocôndrias.....	Pag. 56
3- Avaliação dos efeitos do 2-nitro-<i>p</i>-cimeno e do <i>p</i>-cimeno na permeabilidade transitória mitocondrial.....	Pag. 57
4- Avaliação de efeitos do 2-nitro-<i>p</i>-cimeno e do <i>p</i>-cimeno na integridade das mitocôndrias.....	Pag. 58
5- Estudo estatístico.....	Pag. 58

V – RESULTADOS	Pag. 60
1- Actividade anti-<i>Leishmania</i> do 2-nitro-<i>p</i>-cimeno e do <i>p</i>-cimeno	Pag. 60
1.1- Estudo do crescimento de promastigotas de <i>L. infantum</i>	Pag. 60
1.2- Efeitos na viabilidade de promastigotas de <i>L. infantum</i>	Pag. 61
1.3- Efeitos na morfologia de promastigotas de <i>L. infantum</i>	Pag. 62
2- Efeitos na bioenergética mitocondrial	Pag. 64
2.1- Efeitos do <i>p</i> -cimeno no consumo de oxigénio e potencial de membrana mitocondrial.....	Pag. 64
2.2- Efeitos do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno no consumo de oxigénio e potencial de membrana mitocondrial.....	Pag. 70
3- Efeitos do <i>p</i>-cimeno e do 2-nitro-<i>p</i>-cimeno na permeabilidade transitória mitocondrial	Pag. 77
VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	Pag. 81
VII - BIBLIOGRAFIA	Pag. 86

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Maria do Céu Sousa por tudo que me ensinou e transmitiu, pelo apoio, paciência, disponibilidade, incentivo e constante acompanhamento ao longo deste trabalho.

Ao Professor Doutor José Custódio por me fazer ver mais além a área da bioenergética, pelo apoio, incentivo e disponibilidade pronta com que me acompanhou ao longo de todo este trabalho.

À Doutora Marisa Machado por me ter integrado na dinâmica de laboratório, por toda a ajuda, disponibilidade, apoio e boa disposição com que sempre me brindou.

Ao João Vítor e à Mariana Ponte Ribeiro pela ajuda e companheirismo preciosos.

A toda a equipa dos laboratórios de Bioquímica e Microbiologia da Faculdade de Farmácia pelo companheirismo, ajuda e momentos de boa disposição.

A todos os meus amigos por estarem sempre ao meu lado quando preciso.

Aos meus pais e irmão pela paciência e motivação inesgotáveis, por continuarem a acreditar em mim mesmo quando eu tinha dúvidas, sem vocês seria muito mais difícil.

ÍNDICES DE FIGURAS E TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 - Forma promastigota (A) e amastigota (B) (adaptado de Pace D et al/ 2011) de <i>Leishmania infantum</i>	Pag. 21
Figura 2 - Ciclo de biológico de <i>Leishmania sp.</i> (adaptado de Marques et al 2007).....	Pag. 22
Figura 3 - Manifestação clínica de Leishmaniose Cutânea (adaptado de Malekpour M et al 2010).....	Pag. 25
Figura 4 - Manifestação clínica de Leishmaniose muco-cutânea (adaptado de www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous_leishmaniasis).....	Pag. 26
Figura 5 - Distribuição geográfica mundial dos casos de leishmaniose, bem como dos casos de co-infecção com VIH 1990 a 1998.....	Pag. 27
Figura 6 - Mecanismos de acção dos fármacos anti- <i>Leishmania</i> .(adaptado de Croft and Coombs, 2003).....	Pag. 28
Figura 7 - Estrutura química do <i>p</i> -cimeno e do seu derivado sintético 2-nitro- <i>p</i> -cimeno.....	Pag. 30
Figura 8 - Estrutura da mitocôndria: modelo clássico e estrutura com locais de contacto nas membranas mitocondriais.....	Pag. 32
Figura 9 - Representação esquemática do sistema de transporte de electrões (complexos I, II, III, IV) e do sistema fosforilativo (complexo V).....	Pag. 35
Figura 10 - Relação entre a mitocôndria e a morte celular, evidenciando a importância da quantidade de ATP nos processos apoptóticos e necróticos.....	Pag. 39
Figura 11 - Representação esquemática dos complexos respiratórios; FoF1 Sintetase; e dos componentes do poro de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME).....	Pag. 44
Figura 12 - Câmara de Neubauer para contagem de células.....	Pag. 50
Figura 13 - Redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais.....	PAG. 50
Figura 14 – Esquema de uma preparação em gota pendente usando a lâmina de Koch.....	PAG. 52
Figura 15 – Representação esquemática de um registo típico obtido a partir de experiências com eléctrodo de TPP ⁺	Pag. 57

Figura 16- Curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	Pag. 60
Figura 17- Efeitos do <i>p</i> -cimeno e do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno na viabilidade celular de promastigotas de <i>L. infantum</i>	Pag. 61
Figura 18. Observação das formas promastigotas de <i>L. infantum</i> a fresco por microscopia de contraste de fases.....	Pag. 62
Figura 19 - Observação por microscopia óptica de promastigotas de <i>L. infantum</i> incubadas durante 24 horas na presença e ausência dos compostos em estudo, após coloração de Giemsa.....	Pag. 63
Figura 20 - Efeito do <i>p</i> -cimeno (PCy) nos estados 2, 3 e 4 da respiração de mitocôndrias de fígado induzido por glutamato/malato.....	Pag. 64
Figura 21 - Efeito do <i>p</i> -cimeno (PCy) no ICR (A) e no quociente ADP/O (B).	Pag.66
Figura 22 - Efeitos do <i>p</i> -cimeno (PCy) no intumescimento mitocondrial..	Pag. 67
Figura 23 - Efeito do <i>p</i> -cimeno (PCy) e do ATP (A) no estado 2 e no estado 4 da respiração, na presença de oligomicina (St4-olig) (B).....	Pag.68
Figura 24 - Efeito das várias concentrações de 2-nitro- <i>p</i> -cimeno (NPCy) nos estados 2, 3 e 4 da respiração de mitocôndrias de fígado de rato.....	Pag. 71
Figura 25. Efeito do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno (NPCy) no índice de controlo respiratório (IRC) (A) e no quociente ADP/O (B).....	Pag. 73
Figura 26 - Efeitos do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno (NPCy) no intumescimento mitocondrial.....	Pag. 74
Figura 27- Efeito do <i>p</i> -cimeno (NPCy) e do ATP (A) no estado 2 e no estado 4 da respiração, na presença de oligomicina (St4-olig) (B).....	Pag. 75
Figura 28- Efeitos do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno (NPCy) no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e na fosforilação oxidativa de mitocôndrias de fígado de rato.....	Pag. 76
Figura 29 - Efeitos do <i>p</i> -cimeno (PCy) nos fluxos de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas.....	Pag.78
Figura 30 - Efeitos do 2-nitro- <i>p</i> -cimeno (NPCy) nos fluxos de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas.....	Pag. 79

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Efeitos of <i>p</i> -Cymeno (<i>p</i> Cy) em parâmetros da fosforilação oxidativa de mitocôndrias de fígado de rato.....	Pag. 69
--	---------

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

Abs	Absorvência
ADP	Adenosina 5'- difosfato
ADP/O	Razão entre as nanomoles de ADP fosforiladas e os nanoátomos de oxigénio consumidos
AMP	Adenosina 5'-monofosfato
ANT	Transportador de nucleótidos de adenina
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BSA	Albumina bovina sérica
CoQ	Coenzima Q
CyA	Ciclosporina A
Cyt.c	Citocromo c
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
$\Delta\Psi$	Potencial eléctrico transmembranar
Δp	Força protomotriz
ΔpH	Gradiente de pH
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicoltetracético
FCCP	carbonildiciano- <i>p</i> -trifluoro-metoxifenil-hidrazona
F1	Subunidade catalítica da ATP sintase
Fo	Subunidade da ATP sintase inibida por oligomicina
HEPES	Ácido N-2-hidroietil-piperazina-N'-2-etanossulfónico
ICR	Índice de controlo respiratório (definido como o quociente entre os estados 3 e 4 da respiração)
MON-1	Monpellier-1
MPT	Permeabilidade transitória mitocondrial
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida adenina (oxidado)
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina (reduzido)
NADP⁺	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (oxidado)
NADPH	Dinucleótido de fosfato de nicotinamida adenina (reduzido)

nAtg	Nano átomos grama
NPCy	2-nitro- <i>p</i> -cimeno
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCy	<i>p</i> -cimeno
Pi	Fosfato inorgânico
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
SBF	Soro Fetal Bovino
SD	Desvio padrão
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TPP+	Catião tetrafenilfosfónio
UCPs	Proteínas dissociadoras (do inglês, <i>uncoupling proteins</i>)
UQ	Ubiquinona ou coenzima Q
UV	Ultravioleta

RESUMO

I - Resumo

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária que afecta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o Mundo, bem como animais domésticos e selvagens, ocorrendo, predominantemente, em regiões tropicais e subtropicais. O agente etiológico é um parasita intracelular obrigatório do género *Leishmania* e o hospedeiro infectado pode desenvolver lesões cutâneas, mucocutâneas ou viscerais, dependendo da espécie infectante, bem como da resposta imunitária do hospedeiro. O zimodemo de *Leishmania infantum* mais frequente na zona mediterrânica é o MON-1, sendo responsável pela grande maioria dos casos diagnosticados de leishmaniose visceral e por alguns casos de leishmaniose cutânea. Em Portugal, as leishmanioses humana e canina têm uma prevalência significativa, estando as zonas de Trás-os-Montes e Alto Douro, Bacia hidrográfica do Mondego, Região metropolitana de Lisboa e Algarve identificadas como zonas endémicas.

Segundo a OMS a leishmaniose visceral tem vindo a surgir com uma complicação associada a doenças que comprometem o sistema imunitário, como o VIH. Dos primeiros 1700 casos reportados de co-infecção até 1998, em 33 países, 85% foram registados em Espanha, Itália, França e Portugal, sendo esta uma problemática emergente e prioritária na procura de novas terapêuticas

Actualmente, a quimioterapia constitui a principal terapêutica no controlo da leishmaniose, não sendo, no entanto, suficientemente eficaz. Os fármacos mais utilizados no tratamento das leishmanioses são os compostos antimoniais pentavalentes, o alopurinol e a anfotericina B, mas estes, para além de serem caros, têm mostrado elevada toxicidade, resistência dos parasitas aos medicamentos e, na maioria dos casos, têm um sucesso limitado. É, portanto, necessário desenvolver terapias alternativas e caracterizar novos alvos terapêuticos para obter tratamentos mais eficientes, específicos e menos tóxicos.

Na procura de alternativas terapêuticas, os óleos essenciais e/ou os seus componentes, têm vindo a ganhar visibilidade devido à sua acção antibacteriana, antiparasitária, antifúngica e antiviral, representando um grupo de moléculas que podem ser altamente eficazes na leishmaniose. Estudos *in vitro*

demonstram que o monoterpeneo *p*-cimeno tem uma acção antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Com o objectivo de estudar a actividade anti-*Leishmania* do *p*-cimeno e do seu derivado sintético 2-nitro-*p*-cimeno, foram realizados ensaios de viabilidade celular e de morfologia de promastigotas de *L. infantum*. O *p*-cimeno não induziu perda de viabilidade celular nem alterações morfológicas. No entanto, o 2-nitro-*p*-cimeno teve efeitos significativos na redução da viabilidade celular, com um IC₅₀ de 145 µg/ml. Estes resultados sugerem que a introdução do grupo nitro na estrutura química do *p*-cimeno foi determinante na actividade anti-*Leishmania*.

O modo de acção dos monoterpeneos está relacionado com vários alvos na célula e embora os mecanismos específicos de actividade e os efeitos citotóxicos permaneçam por caracterizar, estudos recentes sugerem que estes compostos deverão actuar promovendo perturbações na permeabilidade de membranas, ou até mesmo afectar a integridade membranar dos microrganismos, interferindo com todas as suas funções.

A mitocôndria tem uma importância fundamental nos processos de sobrevivência e morte celular, dado que é essencial para a produção de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa, sendo também o principal organelo responsável pela formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio e mecanismo de regulação celular. Assim, as alterações na estrutura e funções mitocondriais induzidas pelo *p*-cimeno e pelo 2-nitro-*p*-cimeno foram também avaliadas através de ensaios sobre a bioenergética de mitocôndrias de rato, bem como na permeabilidade transitória mitocondrial. Os resultados sugerem efeitos significativos de ambos os compostos na bioenergética mitocondrial, com maior actividade do 2-nitro-*p*-cimeno, induzidos por mecanismos diferentes. Nas mitocôndrias incubadas com o *p*-cimeno, a estimulação induzida no estado 4 da respiração é significativamente diminuída na presença de oligomicina, indicativo de que as perturbações na capacidade fosforilativa e aumento do estado 4 da respiração se devem à fuga de prótons ao nível da fracção Fo da ATP sintase. A estimulação do estado 4 da respiração induzido pelo 2-nitro-*p*-cimeno não foi significativamente alterada por oligomicina, não ocorrendo também alterações no intumescimento, sugerindo que aumento do estado 4, a diminuição do estado 3 da respiração e

consequente diminuição do índice de controlo respiratório, bem como diminuição do potencial de membrana se devem à permeabilização da membrana interna mitocondrial a prótons. Embora através de mecanismos diferentes, ambos os compostos induzem perturbações na permeabilidade membranar, com consequente diminuição do potencial membranar e diminuição da síntese de ATP. Todavia, ambos os compostos apresentam diferentes efeitos na capacidade de regulação do Ca^{2+} pela mitocôndria, verificando-se alterações apenas na presença de 2-nitro-*p*-cimeno.

Em conclusão, os resultados sugerem que a presença do grupo nitro é fundamental na activação de mecanismos que interferem com a viabilidade celular, homeostase do Ca^{2+} e bioenergética mitocondrial. O grupo nitro, conferindo um carácter anfipático ao composto, permitirá ao 2-nitro-*p*-cimeno maior facilidade em partilhar e atravessar as membranas celulares podendo afectar os vários organelos intracelulares, incluindo o complexo mitocondrial. Esta característica poderá explicar as diferenças observadas entre os dois compostos e ser responsável pela indução dos mecanismos de morte celular.

INTRODUÇÃO

II - INTRODUÇÃO

1 - *Leishmania* e a leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa parasitária que afecta cerca de 12 milhões de pessoas em 88 países de todo o Mundo, bem como animais domésticos e selvagens. Apesar de hoje ser considerada uma das principais doenças parasitárias tropicais (Organização Mundial de Saúde, 2009), a leishmaniose foi durante muito tempo uma doença negligenciada, com muitos casos por diagnosticar. Com uma elevada taxa de mortalidade e de prevalência em zonas tropicais e sub-tropicais, esta doença é causada por um parasita, intracelular obrigatório, do género *Leishmania* (Santos *et al.*, 2008) e o hospedeiro infectado pode desenvolver lesões cutâneas, muco-cutâneas ou viscerais. O desenvolvimento da doença depende do vector de transmissão, várias espécies de flebótomos, da espécie infectante e da resposta imunitária do hospedeiro (Barral *et al.* 1991; Grimaldi *et al.* 1991; Liew and O'Donnel 1993). Existem cerca de 350 milhões de pessoas expostas ao risco de infecção por *Leishmania*, sobretudo em países em vias de desenvolvimento, e os casos de co-infecção com o vírus da imunodeficiência humana têm sido cada vez mais evidentes e preocupantes.

Actualmente, a quimioterapia constitui a principal ferramenta no controlo das leishmanioses, no entanto este tipo de terapêutica é, geralmente, muito prolongado, caro e com elevados níveis de toxicidade.

1.1 - Classificação taxonómica de *L. infantum*

Em 1903, Leishman e Donovan descreveram, em separado, uma protozoário agora designado de *L. donovani* em tecido de baço de pacientes com uma doença crónica agora descrita como leishmaniose visceral (Herdwaldt, 1999). Na bacia mediterrânica, *L. infantum*, espécie pertencente ao mesmo género está descrita como sendo responsável por 90% dos casos de leishmaniose visceral.

A espécie *Leishmania infantum* pertence ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcocystophora, sub-filo, Mastigophora, classe

Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastidae, sub-ordem Trypanossomatina, família Tripanossomatidae e ao género *Leishmania*.

Actualmente, a identificação e caracterização dos sub-géneros e sub-espécies dos isolamentos de *Leishmania* é feita por tipagem isoenzimática (Marques *et al.*, 2007) Neste contexto surge a designação de zimodemo, unidades taxonómicas que agrupam estirpes com perfis enzimáticos semelhantes. O zimodemo de *Leishmania infantum* mais frequente na zona mediterrânica é o MON-1, sendo responsável pela grande maioria dos casos diagnosticados de leishmaniose visceral e por alguns casos de leishmaniose cutânea (Cardoso *et al.*, 2002)

1.2 - Morfologia e ciclo biológico

Durante o seu ciclo biológico, todas as espécies de *Leishmania* alternam entre duas formas celulares morfologicamente bem distintas. A forma promastigota encontra-se no tracto digestivo do vector de transmissão e caracteriza-se por ser uma célula móvel, alongada e fusiforme, de tamanho variável, entre 10 e 20 µm de comprimento, com um flagelo na região anterior. A forma amastigota é oval ou redonda, intracelular, sem flagelo e sem mobilidade diferenciando-se e multiplicando-se no sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado (Dedet *et al.*, 1999)

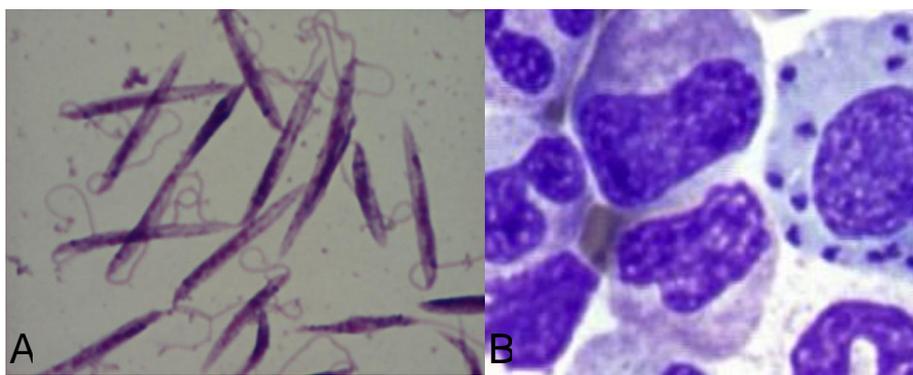


Figura 1 - Forma promastigota (A) e amastigota (B) (adaptado de Pace D *et al* 2011) de *Leishmania infantum*.

Os vectores de transmissão da leishmaniose são pequenos insectos pertencentes á ordem Díptera, família Psychodidae e género *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo. Com uma distribuição disseminada por climas temperados e tropicais, estes insectos de reduzidas dimensões alimentam-se de sangue e são mais activos durante a noite, aproveitando o dia para descansar em casas, adegas, caves e grutas (Hirotoimo *et al.*, 2010). Ao contrário dos mosquitos, os flebótomos voam de forma silenciosa em direcção ao alvo e somente as fêmeas se alimentam de sangue necessário para a produção de ovos.

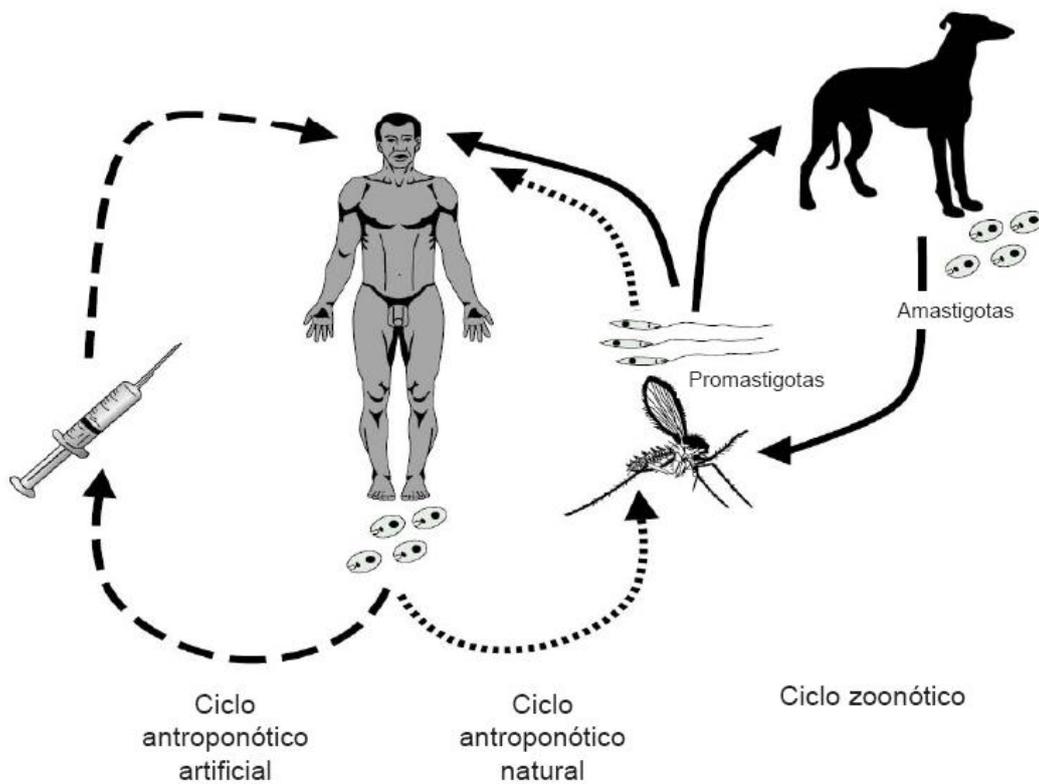


Figura 2 - Ciclo de biológico de *Leishmania* sp. (adaptado de Marques et al 2007)

O ciclo de vida de *Leishmania* sp inicia-se com a picada da fêmea do flebótomo ao hospedeiro vertebrado infectado, ingerindo os parasitas na forma amastigota. Uma vez no interior do vector, as amastigotas migram para o intestino onde se diferenciam em formas promastigotas infectantes e se multiplicam (Bates, 2006). Na próxima refeição sanguínea, as fêmeas infectadas inoculam no hospedeiro vertebrado as formas promastigotas do

parasita. Sendo detectadas como agentes invasores, as formas promastigotas são rapidamente fagocitadas por macrófagos. Já dentro dos macrófagos as promastigotas diferenciam-se em amastigotas e proliferam, provocando a ruptura do macrófago infectado e a libertação das amastigotas no organismo do hospedeiro que vão ser fagocitados por outros macrófagos (Chang, 2005).

Os macrófagos infectados podem então migrar para os tecidos subcutâneos ou atingir o fígado, baço, medula e gânglios linfáticos, conduzindo ao desenvolvimento de leishmaniose cutânea ou visceral, respectivamente. Assim, o desenvolvimento da doença depende da eficiência do parasita no que diz respeito à sua diferenciação na forma amastigota, tal como, da espécie infectante e da resposta imunitária do hospedeiro (Barral *et al.*, 1991; Grimaldi *et al.*, 1991; Liew and O'Donnell 1993).

Pensa-se que o Homem tenha começado por ser um hospedeiro devido a uma exposição acidental ao ciclo biológico do parasita. Inicialmente a leishmaniose visceral seria uma zoonose de animais selvagens que funcionavam como reservatórios, permitindo a manutenção a longo prazo dos parasitas na Natureza (Ashford, 1996). Com a quebra dos limites das zonas endémicas devido a pressões antropogénicas, o Homem e o cão doméstico terão ficado expostos ao ciclo de transmissão de *Leishmania*, passando o cão doméstico a ser um reservatório destes parasitas. A proximidade com o Homem em zonas endémicas dos flebotomos permite a transmissão da doença e o fecho do ciclo biológico do parasita.

1.3 - Fisiopatologia da leishmaniose

No Homem, as espécies de *Leishmania* causam uma variedade de doenças clínicas dependendo da capacidade do parasita proliferar em tecidos profundos ou superficiais. As várias manifestações clínicas da leishmaniose têm sido usadas pela OMS para classificar as leishmanioses em três formas clínicas distintas de acordo com a sintomatologia e sistemas fisiológicos afectados: leishmaniose cutânea, muco-cutânea e visceral.

Além da exposição ao ciclo biológico do parasita na presença do vector, existem alguns outros factores que podem aumentar o risco de infecção e

agravar o prognóstico, como a pobreza, a desnutrição e actualmente a co-infecção com outras doenças, nomeadamente com o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (Desjeux, 2001). A leishmaniose é, ainda, uma doença associada à pobreza em particular em países em desenvolvimento e portanto a disseminação real da doença permanece camuflada em grande parte porque os mais afectados vivem em áreas isoladas, mas também devido ao estigma social que conduz a que os pacientes se resguardem, devido às cicatrizes e deformações físicas que a doença pode causar.

1.3.1 - Leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é a forma mais grave da doença, sendo a que apresenta maior taxa de mortalidade caso não seja devidamente tratada. A forma visceral tem as consequências mais severas e pode ser causada apenas por três das cerca de 20 espécie de *Leishmania* conhecidas: *L. donovani* na Índia e na África Oriental; *L. infantum* na Europa e na bacia do mediterrâneo; *L. chagasi* na América Central e do Sul. O parasita atinge as células do sistema mononuclear fagocitário, especialmente do fígado, baço, medula e dos gânglios linfáticos. A infecção pode permanecer assintomática ou desenvolver-se de forma aguda, sub-aguda e crónica conduzindo ao aparecimento de febre, hepatomegalia e esplenomegalia, perda acentuada de peso, cansaço e anemia (Hiroto, 2010). Em indivíduos não tratados, a morte ocorre maioritariamente devida a infecções secundárias devido ao comprometimento do sistema imunitário e da desnutrição.

Segundo a OMS a leishmaniose visceral tem vindo a surgir com uma complicação associada a doenças que comprometem o sistema imunitário, como o VIH. Dos primeiros 1700 casos reportados de co-infecção até 1998, em 33 países, 85% foram registados em Espanha, Itália, França e Portugal, sendo esta uma problemática emergente e prioritária na procura de novas terapêuticas (Marques *et al.*, 2007).

1.3.2 - Leishmaniose cutânea

Leishmaniose cutânea pode ter vários graus de severidade podendo não manifestar-se durante um período variável de tempo após a infecção. Geralmente as lesões caracterizam-se pelo aparecimento de úlceras simples ou difusas na pele, deixando cicatrizes e, podendo mesmo, causar desfiguração e mutilação do paciente. A leishmaniose cutânea localizada manifesta-se maioritariamente como um nódulo localizado que ulcera e cicatriza de forma natural, mas acaba por deixar marcas e alterações na pigmentação da pele (Fig. 3). No caso da leishmaniose cutânea difusa, a lesão inicial não ulcera mas as formas infectantes migram para vários pontos da superfície cutânea, acabando por se disseminar e ulcerar mais tarde, apresentando um tempo de incubação que vai de alguns dias a vários anos. Esta forma da doença pode regredir espontaneamente ou evoluir requerendo, então, de tratamento (Grimaldi *et al.*, 1991).

Na bacia do mediterrâneo 20% dos casos de leishmaniose cutânea estão descritos como sendo causados pela espécie *Leishmania infantum* MON-1, pelo que se coloca a questão da influência da estirpe na manifestação clínica exibida pelo paciente. As lesões cutâneas causadas por *L. infantum* podem ser localizadas ou difusas e a sua evolução é crónica.



Figura - 3. Manifestação clínica de Leishmaniose Cutânea (adaptado de Malekpour M et al 2010).

1.3.3 - Leishmaniose muco-cutânea

As lesões muco-cutâneas resultam, geralmente, da disseminação dos amastigotas desde a pele até à mucosa naso-orofaríngea. Na maioria dos casos, as manifestações muco-cutâneas tornam-se evidentes alguns anos após o desaparecimento das lesões cutâneas, mas podem também aparecer enquanto estas ainda não estão curadas, devido a uma metastização secundária pelo organismo. Pressupõe-se, então, que o tratamento adequado das lesões cutâneas diminui o risco de aparecimento de lesões muco-cutâneas. Geralmente, esta variante da doença torna-se evidente devido aos sintomas nasais crônicos, que passam pela destruição da mucosa naso-orofaríngea devido a uma sobre-estimulação do sistema imunitário (Fig. 4).



Figura 4 - Manifestação clínica de Leishmaniose muco-cutânea (adaptado de www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous_leishmaniasis)

1.4 - Epidemiologia

A leishmaniose é uma zoonose disseminada por todo o Mundo com uma maior incidência em zonas tropicais, sub-tropicais e temperadas em que as diferentes combinações de parasitas, reservatórios e vectores co-existam (Fig. 5).

De acordo com a OMS, existem cerca de 350 milhões de pessoas em 88 países em risco de infecção, com uma incidência anual de 12 milhões de casos (Chang, 2005). Hoje em dia é considerada umas das maiores doenças

tropicais, apesar de durante muitos anos ter sido negligenciada e muitos casos não terem sido reportados e tratados. O aumento da incidência de casos de leishmaniose poderá estar relacionado com o aumento dos factores de risco, principalmente nos países em vias de desenvolvimento.

A co-infecção de leishmaniose visceral com o VIH tem vindo a aumentar, provavelmente devido a alterações no ciclo de transmissão da leishmaniose. A partilha de seringas por indivíduos toxicodependentes pode ser um importante factor neste aumento dos casos de co-infecção. Este cenário poderá vir a agravar-se rapidamente na Ásia e na África, cujos dados de prevalência e detecção da co-infecção ainda não são conhecidos (Alvar *et al.*, 2008)

No Sul da Europa, *Leishmania infantum* é o agente etiológico da leishmaniose visceral, sendo o cão o principal reservatório do ciclo doméstico (Moreno e Alvar, 2002). Em Portugal, as leishmanioses humana e canina têm uma prevalência significativa, estando as zonas de Trás-os-Montes e Alto Douro, Bacia hidrográfica do Mondego, Região metropolitana de Lisboa e Algarve identificadas como zonas endémicas.

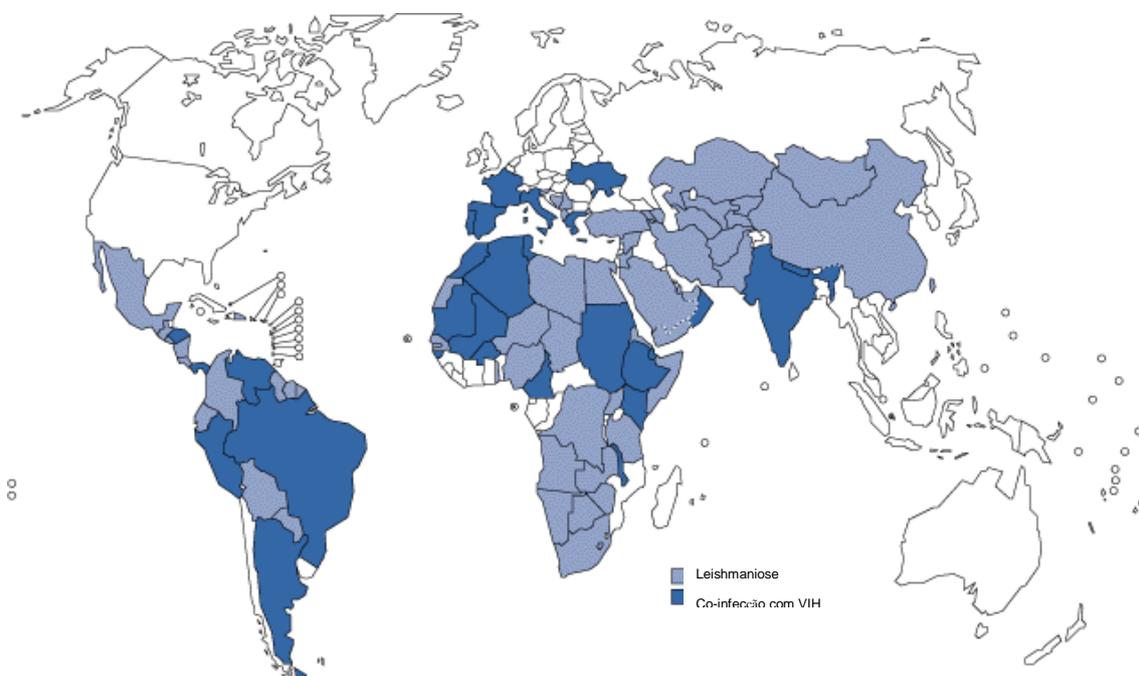


Figura 5 - Distribuição geográfica mundial dos casos de leishmaniose, bem como dos casos de co-infecção com VIH 1990 a 1998 (adaptado de WHO/NTD/IDM HIV/AIDS, Tuberculosis and Malaria (HTM) World Health Organization, 2010)

1.5 - Terapêutica

Actualmente, a quimioterapia constitui a principal ferramenta no controlo das leishmanioses, no entanto este tipo de terapêutica é, geralmente, muito prolongado, caro e com elevados níveis de resistência e toxicidade.

As drogas mais utilizadas contra a leishmaniose são os compostos antimoniais pentavalentes, o alopurinol, a anfotericina B, ou uma combinação de antimoniato de meglumina e alopurinol (Croft e Coombs, 2003).

Compostos	Mecanismos de acção
Antimoniais pentavalentes (Glucantime e Pentostam)	Têm estruturas moleculares pouco caracterizadas e a sua acção interfere directamente com a bioenergética mitocondrial das formas amastigotas de <i>Leishmania sp.</i> Estes produtos ligam-se a diferentes proteínas do parasita inibindo-as, especialmente a enzimas envolvidas na glicólise e no metabolismo dos ácidos gordos
Pentamidina	Derivado aromático da diamidina, tóxico para vários protozoários através da sua ligação ao DNA cinetoplastidial e comportando, portanto, também efeitos secundários mais graves.
Anfotericina B	Agente antifúngico com uma acção eficiente, este composto liga-se á membrana plasmática aumentando a sua permeabilidade
Paramomicina	Em bactérias inibe a síntese proteica através da sua ligação à subunidade 30s dos ribossomas, causando erros de leitura e finalização precoce da tradução do mRNA. Em leishmania a paramomicina também afecta a mitocôndria
Miltefosina	Possivelmente inibe ou modela a transdução de sinal e a homeostase do cálcio
Imiquimod	Estimula a produção de óxido nítrico em macrófagos

Figura 6 – Mecanismos de acção dos fármacos anti-*Leishmania*.(adaptado de Croft and Coombs, 2003)

Os compostos antimoniais pentavalentes têm estruturas moleculares pouco caracterizadas e actuam directamente na bioenergética mitocondrial das formas amastigotas de *Leishmania*. Estes compostos ligam-se a diferentes proteínas do parasita inibindo-as, especialmente a enzimas envolvidas na glicólise e no metabolismo dos ácidos gordos. Nos casos de leishmaniose visceral em que o tratamento com os compostos antimoniais não é suficiente

pode usar-se a pentamidina, derivado aromático da diamidina, com alternativa. A anfotericina B é um agente antifúngico com uma acção eficiente. Este composto liga-se á membrana plasmática aumentando a sua permeabilidade (Chan-Bacab M and Peña-Rodríguez L., 2001). Embora estudos recentes tenham permitido desenvolver uma nova formulação de anfotericina B incorporada em lipossomas que permite uma acção melhorada deste fármaco, os feitos secundários são ainda bastantes e os custos de produção desta nova formulação são muito elevados. É, portanto, necessário desenvolver terapias alternativas e caracterizar novos alvos terapêuticos para obter tratamentos mais eficientes, específicos e menos tóxicos.

Na procura de novos compostos leishmanicidas, os produtos derivados de plantas têm ganho algum relevo e recentemente foi evidenciada a acção anti-*Leishmania* de óleos essenciais e de alguns dos seus constituintes (Rosa *et al.*, 2003; Monzote *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010).

2 - Os óleos essenciais e actividade biológica

Várias actividades biológicas com potencial terapêutico têm sido atribuídas aos óleos essenciais e aos seus componentes, destacam-se a actividade anti-espasmódica, anti-inflamatória, anti-convulsivante, anti-oxidante (Sakurada, *et al.*, 2009) e actividades biocidas como a antiviral, antibacteriana, antifúngica e antiparasitária (Edris, 2007; Bakkali, *et al.*, 2008; Gutierrez, *et al.*, 2008 ; Hemaiswarya, *et al.*, 2008).

A actividade antimicrobiana de óleos essenciais, ricos em compostos fenólicos, foi observada em fracções contendo timol e carvacrol (Lambert *et al.*, 2001) e estudos *in vitro* demonstram que o monoterpene *p*-cimeno tem uma acção antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Cristani *et al.*, 2007; Mimran Shapira, 2007). Foram também observados efeitos sinérgicos entre os monoterpenos carvacrol e timol com o seu precursor *p*-cimeno (Vardar-Unlu *et al.*, 2003). Além disso, diversos estudos têm demonstrado que *p*-cimeno e seus derivados monoterpenos apresentam actividade antioxidante e anti-cancerígena, estando aprovados nos Estados Unidos e na Europa para preservar e dar sabor aos alimentos (Burt, 2004).

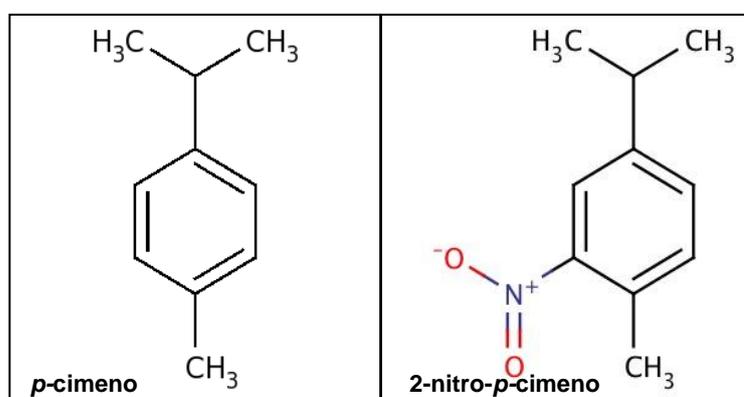


Figura 7 - Estrutura química do *p*-cimeno e do seu derivado sintético 2-nitro-*p*-cimeno.

O modo de acção dos monoterpenos está relacionado com vários alvos na célula, embora os mecanismos específicos de actividade e os efeitos citotóxicos permaneçam por caracterizar. A actividade antimicrobiana está, geralmente, associada à presença de pequenas moléculas oxigenadas, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio, exemplos do timol, do carvacrol, do eugenol, do linalol, do geraniol, do neral ou do geranial. Estes compostos

actuam por modificação da membrana dos microrganismos, muitas das vezes com perda da integridade membranar que deverá afectar todas as suas funções.

3 - Estrutura e funções da mitocôndria

3.1 - Fisiologia, ultra estrutura e funções metabólicas das mitocôndrias

As mitocôndrias são organitos intracelulares com cerca de 2 μm e existentes nas células eucarióticas. O seu número por célula encontra-se relacionado com as necessidades energéticas das células. Os órgãos metabolicamente activos, como o fígado, o cérebro e os músculos cardíaco e esquelético contêm um maior número de mitocôndrias, e apresentam maior susceptibilidade ao efeito de fármacos que actuam nas mitocôndrias e a determinadas patologias, designadas como patologias mitocondriais (Szewczyk e Wojtczak, 2002). De acordo com a imagem clássica, a estrutura da mitocôndria (Fig. 8 (A)) a membrana mitocondrial externa, que constitui uma barreira de permeabilidade para as moléculas existentes no citossol maiores que 1500Da e separa o espaço intermembranar do citossol; 2) o espaço intermembranar, cuja composição iónica é semelhante à do citossol e contém um distinto grupo de proteínas incluindo o citocromo c; 3) a membrana mitocondrial interna paralela à membrana externa, apenas permeável ao oxigénio, dióxido de carbono e água, ou de pequenas porções desta membrana invaginam para o interior da matriz como cristas, designadas por cristas mitocondriais, onde está localizado o sistema de electrões, o sistema fosforilativo e os transportadores membranares; 4) a matriz mitocondrial que contém as enzimas metabólicas, o DNA e RNA mitocondrial. Este genoma tem unicamente genes que codificam para algumas proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa (Lesnefsky et al., 2001).

No entanto, e segundo outros estudos, a estrutura mitocondrial não é assim tão simples, (Mannella, 2000) tendo sido demonstrado que as cristas não são simples invaginações da membrana mitocondrial interna, mas sim estruturas independentes e que podem ou não estar ligadas à membrana mitocondrial interna (Fig.8-B). De salientar que as mitocôndrias não têm uma

forma única mas podem ter diferentes formas de acordo com o tecido onde se localizam. Apesar das membranas mitocondriais interna e externa serem estruturas bem definidas, cada uma delas possuindo diferentes conjuntos de enzimas e desempenhando diferentes funções, foram identificados locais de contacto íntimo entre as duas membranas quer a nível morfológico quer a nível funcional (Mannella, 2001).

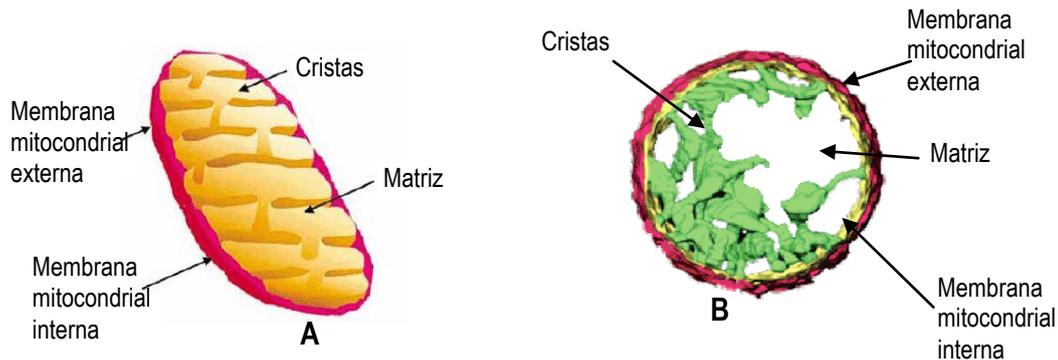


Figura 8 – Estrutura da mitocôndria: modelo clássico e estrutura com locais de contacto nas membranas mitocondriais.

(A)- Modelo clássico da mitocôndria, a mitocôndria é constituída pela membrana externa; pela membrana interna que forma invaginações para o espaço intermembranar, originando as cristas e pela matriz mitocondrial.

(B)- Mitocôndria visualizada por tomografia electrónica em que as cristas são estruturas internas que podem ou não estar ligadas à membrana mitocondrial interna (Adaptado de Lesnefsky et al., 2001;Mannella, 2001)

A maior parte do ATP (aproximadamente 95%) que a célula necessita é produzida pelas mitocôndrias, sendo conhecidas como as centrais energéticas da célula. A mitocôndria está envolvida em vários processos e vias metabólicas, nomeadamente: 1) a conversão do piruvato a acetil-CoA, processo este catalisado pelo complexo da desidrogenase do piruvato; 2) o ciclo do ácido cítrico; 3) fosforilação oxidativa que resulta do funcionamento conjunto da cadeia respiratória acoplada à síntese de ATP; 4) a β oxidação (degradação dos ácidos gordos); 5) parte do ciclo da ureia; 6) o fornecimento de intermediários metabólicos ao resto da célula; 7) o armazenamento de

cálcio, de forma a manter a concentração de cálcio citoplasmático a um nível baixo e constante; 8) a síntese de DNA, RNA e proteínas; 9) a reparação do DNA; 10) a formação de espécies reactivas de oxigénio e 11) nalguns casos a termogénese (Pedersen, 1999). A função mais importante das mitocôndrias consiste na degradação de substratos energéticos (ácidos gordos, piruvato, aminoácidos), provenientes do citoplasma. Obtendo-se como produtos finais, CO_2 , H_2O e a síntese de ATP. As reacções do ciclo do ácido cítrico levam à oxidação dos compostos de carbono, com formação de CO_2 e também fornecem equivalentes redutores, temporariamente ligados a coenzimas. A maioria destes processos ocorrem a nível da matriz mitocondrial é na cadeia respiratória que se encontra na membrana mitocondrial interna que se dá a reoxidação das coenzimas reduzidas. A cadeia respiratória utiliza compostos redutores (NADH e ubiquinol), dadores de electrões, para reduzir o O_2 a H_2O . A esta reacção está associado o transporte de protões (H^+) da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, processo que origina a formação do gradiente electroquímico de H^+ através da membrana mitocondrial interna, o qual é aproveitado pela mitocôndria para sintetizar ATP a partir de ADP e P_i , via sintase do ATP.

3.2 - O sistema de transporte de electrões e a fosforilação oxidativa

Nas células animais o processo de fosforilação oxidativa requer numerosas proteínas, verificando-se que mais de 60 proteínas estão associadas ao sistema de transporte de electrões, 16 com o complexo da sintase de ATP e 2 proteínas constituem os transportadores do ADP/ATP e do H^+/P_i . A cadeia respiratória mitocondrial é constituída por quatro complexos enzimáticos transmembranares o complexo I (NADH-desidrogenase), complexo II (succinato desidrogenase), complexo III (citocromo redutase) e o complexo IV (citocromo oxidase). Os dinucleótidos de nicotinamida adenina (NADH) e o succinato conduzem os electrões para os complexos I e II da cadeia respiratória, respectivamente, resultando na libertação de protões para o interior da matriz e na transferência de electrões para o transportador mais próximo na cadeia respiratória, a Coenzima Q (CoQ), que transfere os

electrões entre estes dois complexos e o complexo III. Posteriormente, os electrões são transferidos para o citocromo c e finalmente para o complexo IV onde ocorre mais entrada de protões. É no complexo IV que o O_2 , fornecido na respiração pelo sistema circulatório, funciona como receptor de electrões e se liga aos protões existentes na matriz levando à formação de H_2O (Fig 9). Assim, o transporte de electrões através dos complexos respiratórios tem como finalidade a transferência de energia dos substratos energéticos existentes na matriz mitocondrial para uma forma de energia (gradiente electroquímico de H^+) que poderá ser utilizada para fosforilar o ADP. As mitocôndrias produzem ATP através da associação entre o gradiente de protões, gerado pela respiração, e a fosforilação oxidativa do ADP pelo complexo V (F_0F_1 ATPase ou ATPsintase). O complexo V é constituído por duas subunidades: a subunidade F_0 , correspondente a um segmento hidrofóbico que atravessa a membrana mitocondrial interna e que funciona como canal a protões do complexo, e a subunidade F_1 que corresponde à cabeça esférica do complexo virada para o lado da matriz e possui uma função catalítica na síntese de ATP (Fig. 9). Situada entre estas duas subunidades existe uma proteína que confere sensibilidade à oligomicina (OSCP “oligomycin sensibility conferring proteín”), fazendo com que a ATP sintetase seja inibida por este composto. Pelo facto de a membrana mitocondrial interna ser impermeável a protões, ocorre a sua acumulação no espaço intermembranar gerando a formação do gradiente electroquímico de H^+ . Quando o ADP e o P_i , componentes necessários à síntese de ATP, estão disponíveis na matriz mitocondrial, eles ligam-se à fracção catalítica do complexo V, permitindo a abertura da fracção F_0 e a consequente entrada de protões para o interior da matriz. A energia libertada no influxo de protões através da fracção F_0 é usada na fosforilação do ADP para sintetizar ATP pela fracção F_1 .

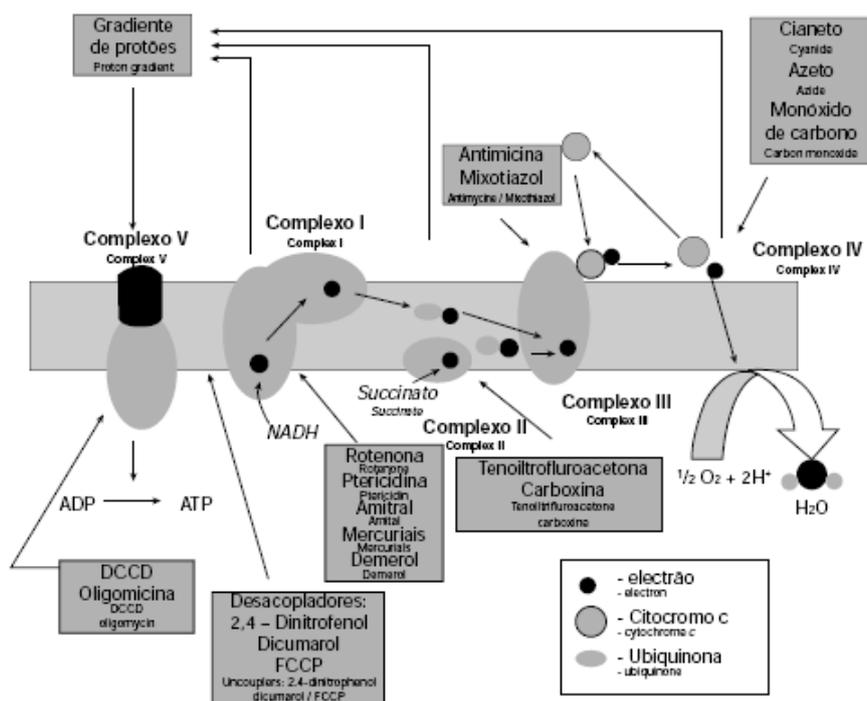


Figura 9 – Representação esquemática do sistema de transporte de electrões (complexos I, II, III, IV) e do sistema fosforilativo (complexo V), com os respectivos substratos e inibidores. (Monteiro P et al 2003).

A associação entre a oxidação de substratos pela cadeia respiratória e a fosforilação designa-se por teoria quimiosmótica e foi proposta por Peter Mitchell em 1961. Na cadeia respiratória, o fluxo de electrões gera energia redox suficientemente elevada para ser utilizada para ejectar prótons do compartimento mitocondrial interno, para o espaço intermembranar. O gradiente electroquímico de prótons assim gerado, também designado por força protomotriz (Δp), constitui a força motriz capaz de fazer o retorno dos prótons através do complexo ATPsintase. Este gradiente é composto de um componente eléctrico, o potencial transmembranar ($\Delta \Psi$) e de um gradiente químico, o gradiente de pH (ΔpH). Como resultado, as mitocôndrias são organelos celulares únicos que conseguem desenvolver um $\Delta \Psi$ de cerca de 180 mV (negativo no interior) e cujo meio interno mantém um valor de pH de cerca de 8. Em consequência disto, as mitocôndrias conseguem não só acumular compostos de carácter catiónico, que sejam capazes de atravessar as membranas, como também internalizar ácidos fracos na sua forma aniónica. (Szewczyk e Wojtczak, 2002).

3.3 - Envolvimento da mitocôndria nos mecanismos de morte celular

Existem diferentes estudos que demonstram que a mitocôndria controla a vida e a morte celular. A permeabilização da membrana mitocondrial precede o processo de morte celular por apoptose ou necrose, que é dependente do tipo de célula ou do estímulo indutor do tipo de morte da célula, e esta permeabilização constitui um dos principais factores indicador de morte celular. De facto, existe um número elevado de factores pró-apoptóticos que actuam a nível da membrana mitocondrial induzindo a permeabilização da membrana e que, por sua vez, activam os compostos anti-apoptóticos da família Bcl-2 a interagir com proteínas da membrana mitocondrial evitando a sua permeabilização. Outro facto que reforça o envolvimento da mitocôndria na morte celular é a existência de intervenções farmacológicas específicas, isto é, através de compostos que actuam a nível das proteínas mitocondriais que evitam ou retardam a morte celular. (Loeffler e Kroemer, 2000)

A necrose ou morte accidental pode ser desencadeada por um profundo dano celular ou por stresse. Ocorre então, um rápido colapso da homeostase interna sendo acompanhada de lise da membrana citoplasmática e das membranas internas com libertação de restos celulares para o espaço extracelular, promovendo um processo inflamatório. É caracterizada morfológicamente pela formação de protuberâncias na membrana plasmática seguida pela eventual ruptura de algumas delas e a consequente libertação de componentes citosólicos (Monteiro P et al 2003).

A apoptose é um tipo de morte celular programada e trata-se de um processo fisiológico essencial, necessário ao desenvolvimento normal e à manutenção da homeostase dos tecidos (Fumarola C et al 2004). No entanto, a apoptose está também envolvida em diversos processos patológicos dos quais se destacam as doenças neurodegenerativas, doenças imunológicas e processos cancerígenos. Assim, após um sinal apoptótico as células sofrem uma série de alterações que culminam na sua morte, sem que ocorra a libertação dos seus conteúdos celulares (Monteiro P et al 2003). Este tipo de morte celular funcionará como uma espécie de triagem da população celular eliminando as células danificadas, mutadas, envelhecidas ou potencialmente perigosas, tendo também um papel importante na regulação de programas de

crescimento e diferenciação celular e tecidual. A apoptose é caracterizada por uma diminuição do volume da célula acompanhada da formação de protuberâncias na membrana plasmática, estas acabam por se desprender da membrana originando fragmentos membranares que são fagocitados pelas células vizinhas.

Outra das grandes diferenças entre a necrose e a apoptose reside a nível da bioenergética. Verificando-se que em células necróticas os níveis de ATP baixam drasticamente e esta perda das reservas energéticas será a principal causa deste tipo de morte celular (Malhi H et al 2006). Contrariamente, as células em apoptose mantêm, parcialmente, as suas reservas de ATP, necessárias para o controlo dos mecanismos de apoptose, sendo um processo totalmente dependente de energia. Deste modo, a mitocôndria é um elemento fundamental nos processos de morte celular por apoptose e/ou necrose e poderá determinar o tipo de morte celular.

3.3.1 - Importância da mitocôndria nos processos apoptóticos

Estudos realizados com vários sistemas mitocondriais demonstram um papel importante da mitocôndria nos mecanismos de indução da apoptose (Lemasters et al., 1999). Actualmente, é aceite que em muitas células apoptóticas a libertação de proteínas do espaço intermembranar constitui um dos primeiros eventos da apoptose. A mitocôndria perante um estímulo apoptótico (danos no DNA, isquémia, radiações ultravioletas e mecanismos vários de stress oxidativo) é “desviada” do seu papel original, que é o da manutenção da vida celular, para um papel oposto, o de facilitar a morte celular (Fig 9). Existem vários factores responsáveis por esta alteração, nomeadamente, o cálcio, a ceramida, o óxido nítrico, as caspases (proteínas cisteínicas que actuam em resíduos de aspartato), as ROS e membros da família Bcl-2). O efeito final de muitos destes factores é a libertação de duas proteínas do espaço intermembranar, o citocromo c e o factor indutor de apoptose (AIF). Estas duas proteínas participam em eventos pós-mitocondriais necessários para completar o programa de morte celular. A forma como estes factores “forçam” a mitocôndria a participar no programa de morte celular ainda

não é inteiramente claro, contudo a hipótese mais provável envolve a PTM. Numerosos dados experimentais sugerem que vários dos factores que induzem a PTM são membros da família das proteínas Bcl-2. A proteína Bcl-2 é um oncogene que tem um efeito inibitório da PTM, enquanto outro membro da família, a Bax, pode formar complexos com a Bcl-2 anulando desta forma o efeito inibitório exercido por Bcl-2 na PTM e, quando atinge determinadas concentrações, estimula a MPT (Danial et al 2004). A PTM é seguida da perda do $\Delta\Psi$ (pelo menos temporariamente), intumescimento da mitocôndria e, finalmente, ruptura da membrana mitocondrial externa com libertação do citocromo c e do AIF.

O citocromo c é a proteína cuja libertação parece ser mais crítica para a iniciação dos processos de apoptose (Desagher S et al 2000). No entanto, o mecanismo pelo qual ocorre a sua libertação da mitocôndria não se encontra ainda perfeitamente esclarecido, podendo ocorrer de um modo controlado através de poros na membrana externa ou por ruptura física desta membrana. O citocromo c na presença de ATP ou dATP, forma um complexo com o apaf-1 e a procaspase 9. A formação deste complexo designado por apoptossoma cliva a procaspase 9 com libertação da caspase 9 activa que cliva e activa a procaspase 3. Por sua vez, a caspase 3 activa induz a clivagem proteolítica de uma série de proteínas alvo no citosol, núcleo e membrana plasmática responsáveis pela morfologia característica da apoptose (Parone et al 2002). Vários estudos têm demonstrado que a mitocôndria está também envolvida na indução da apoptose por mecanismos independentes das caspases. Durante este processo, ocorre libertação de proteínas designadas por factor indutor da apoptose (AIF) e endonuclease G do espaço intermembranar mitocondrial para o citosol, desencadeando este tipo de morte celular sem activar a cascata apoptótica. Durante a apoptose, o AIF desloca-se da membrana mitocondrial externa para o citosol e, posteriormente, para o núcleo onde induz condensação da cromatina e fragmentação do DNA (Daugas et al., 2000).

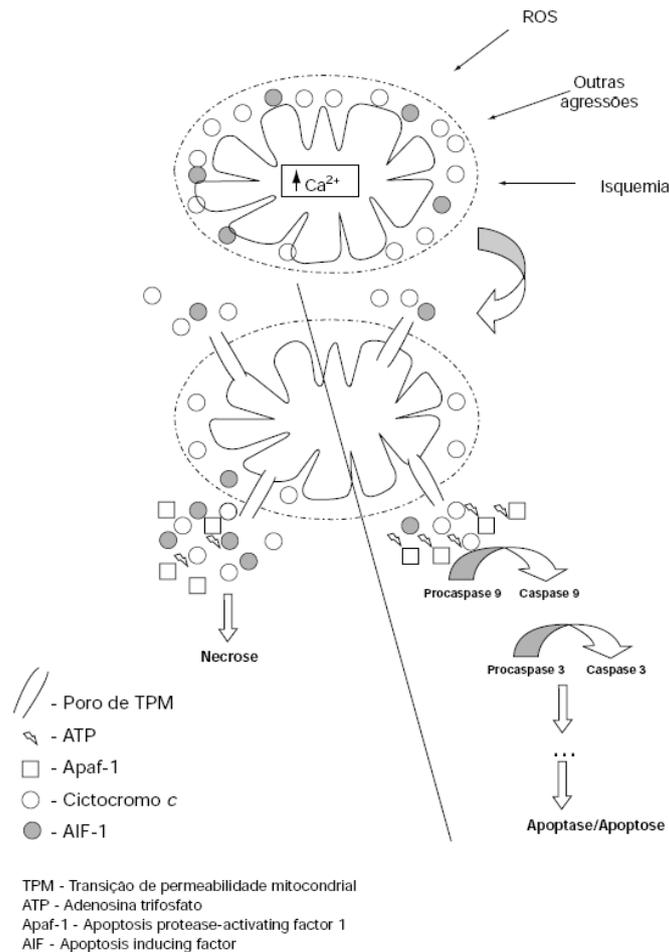


Figura.10 – Relação entre a mitocôndria e a morte celular, evidenciando a importância da quantidade de ATP nos processos apoptóticos e necróticos. Na morte celular por necrose, ocorre depleção de ATP e há ruptura da membrana plasmática. A outra via de morte celular é por apoptose, sendo os níveis de ATP da célula mantidos parcialmente. A apoptose é caracterizada por uma diminuição do volume da célula acompanhada da formação de protuberâncias da membrana plasmática (Monteiro P et al 2003)

Adicionalmente, o AIF induz a exposição da fosfatidilserina na monocamada externa (geralmente localizada na monocamada interna), facto que possibilita o reconhecimento e posterior remoção das células apoptóticas por células vizinhas. De modo idêntico, a endonuclease G, cuja função está implicada na replicação do DNA mitocondrial, induz a fragmentação do DNA nuclear após ser libertado do espaço intermembranar durante a apoptose.

No decurso morte celular por necrose, as células, as mitocôndrias e outros organitos aumentam de volume, como consequência da perda da integridade física das membranas plasmática e mitocondrial, não sendo, no entanto, observadas quaisquer modificações nucleares no decorrer deste processo. (Desagher e Martinou, 2000). A mitocôndria é responsável pela maior parte (cerca de 80-90%) da síntese de ATP através da fosforilação oxidativa, que usa a energia resultante da respiração mitocondrial. Assim, factores que alterem a associação do sistema fosforilativo com o sistema de transporte de electrões constituem mecanismos responsáveis pela diminuição da eficiência fosforilativa das mitocôndrias e, conseqüentemente, por um abaixamento dos níveis de ATP necessários à viabilidade celular. As alterações estruturais induzem um aumento da permeabilidade mitocondrial a solutos de baixa massa molecular. Este processo conhecido por PTM é acompanhado por um intumescimento da mitocondrial e a mitocôndria perde a sua capacidade para manter estáveis o $\Delta\Psi$ e o gradiente de protões (isto é ocorre uma dissociação total ou parcial da fosforilação oxidativa). Ao ocorrer uma permeabilização membranar passiva constante, ocorre a hidrólise contínua do ATP pela ATPsintase, promovendo o esgotamento das reservas energéticas celulares e conduzindo à morte celular por necrose (Fig 10). Adicionalmente, há perturbação contínua dos equilíbrios iónicos, especialmente do Ca^{2+} , que exacerbará os danos devido à activação de enzimas degradativas como as fosfolipases, proteases e nucleases. A activação da PTM é facilitada na presença de oxidantes e espécies reactivas de oxigénio (ROS) e azoto (RNS) (Zoratti et al 2005). Por sua vez, a acumulação de ROS e RNS facilita a indução da PTM (Pedersen, 1999).

3.4 - Acção da mitocôndria na homeostase do Ca^{2+} celular

A mitocôndria desempenha uma acção vital na regulação do Ca^{2+} citosólico, possuindo várias proteínas envolvidas na acumulação e libertação de Ca^{2+} pelo que, a mitocôndria actua como um reservatório de Ca^{2+} . Adicionalmente, a mitocôndria fornece a maior parte do ATP usado pelas Ca^{2+} -ATPases do retículo endoplasmático e da membrana plasmática. (Saris e Carafoli 2005). Por outro lado, a adição de Ca^{2+} a uma suspensão de

mitocôndrias energizadas resulta na estimulação da cadeia respiratória, efluxo de prótons da matriz e influxo de Ca^{2+} para dentro da mitocôndria. As mitocôndrias são capazes de acumular cálcio para a matriz através do gradiente electroquímico sem que ocorra hidrólise do ATP ou ocorra cotransporte com qualquer outro ião ou seja o influxo de Ca^{2+} é um processo puramente electrogénico movido pela componente eléctrica, o Ψ da força protomotriz (ΔH^+). A proteína responsável pela acumulação de cálcio é o *uniporter de cálcio*, no entanto, em mitocôndrias isoladas a sua constante de afinidade é baixa, o que sugere que este não será o mecanismo de influxo de Ca^{2+} quando as mitocôndrias são expostas a rápidos e intensos pulsos de cálcio intracelular. Uma via alternativa de influxo de Ca^{2+} é o designado por *RAM* (do inglês *rapid mode uptake*), através do qual ocorrerá a rápida captação de Ca^{2+} . Apesar de a captação de Ca^{2+} pelas mitocôndrias ser apontada essencialmente como um dispositivo de segurança em situações de sobrecarga intracelular transitória de Ca^{2+} os fluxos mitocondriais de Ca^{2+} fazem parte da sinalização celular do Ca^{2+} (Orrenius et al., 2003). Uma vez dentro da mitocôndria, o Ca^{2+} têm vários efeitos nomeadamente, a estimulação de desidrogenases na matriz mitocondrial sensíveis ao Ca^{2+} , que por sua vez são locais de produção de NADH para a cadeia respiratória e como tal para a estimulação do metabolismo energético mitocondrial (Orrenius et al., 2003).

Todavia, as mitocôndrias não conseguem captar quantidades ilimitadas de Ca^{2+} tendo por isso de o libertar a uma velocidade comparável à do influxo. O efluxo de Ca^{2+} da mitocôndria para o citosol pode ocorrer através de diferentes mecanismos. Assim, pode ocorrer através de um mecanismo de *antiporte com Na^+ ou H^+* , isto é, de um transporte dependente de Na^+ ou de outro independente de Na^+ , que troca Ca^{2+} por Na^+ ou por H^+ , respectivamente por reversão do uniporta de influxo de Ca^{2+} , por alterações na fase lipídica da membrana, através de vias de libertação mediadas por canais ou pela combinação de dois ou mais destes mecanismos. Adicionalmente, a libertação de Ca^{2+} da mitocôndria pode também ocorrer por oxidação de nucleótidos de nicotinamida adenina da matriz a ADP-ribose nicotinamida ou por oxidação de grupos -SH de proteínas membranares que se encontram associados com a regulação da dinâmica de Ca^{2+} da mitocôndria. Outro mecanismo independente de sódio e fundamental no efluxo de Ca^{2+} , é a formação de um poro de

permeabilidade transitória o (PMPT), em cujo estado de baixa condutância é responsável pela “descarga” de Ca^{2+} para valores de concentração abaixo dos limites (Bernardi P et al 1998) no entanto em estados mais avançados dá origem a um megacanal designada de MPT que constitui igualmente um mecanismo importante para a libertação de cálcio da mitocôndria como se descreverá mais adiante.

Em conclusão, apesar de a mitocôndria poder não ter um papel determinante na homeostase de cálcio celular em condições de repouso, ela é determinante na forma e na duração de um pico concentracional de cálcio após estimulação celular. Adicionalmente o posicionamento da mitocôndria junto do retículo endoplasmático pode ser condicionante da sua capacidade tamponizante. Além do mais a acumulação elevada de Ca^{2+} é deletéria para a função mitocondrial e celular tendo sido proposto que o Ca^{2+} citosólico desempenha um papel importante na estimulação de sinais apoptóticos, através da regulação de enzimas específicas que, uma vez activadas, conduzem à morte celular, como por exemplo as endonucleases. Paralelamente, a excitação-contracção no músculo esquelético e cardíaco dependem dos níveis de Ca^{2+} citosólico.

O potencial de membrana ($\Delta\Psi$) é gerado através da ejeção de prótons pelos complexos enzimáticos do sistema de transporte de electrões. O $\Delta\Psi$ constitui a força motriz para a fosforilação do ADP pela F1Fo ATPase. Adicionalmente a captação de Ca^{2+} através do uniporta de Ca^{2+} é dependente do $\Delta\Psi$, e a dissipação deste potencial anula a captação de Ca^{2+} mitocondrial. A composição molecular exacta do uniporta não é conhecida e pensa-se que pode existir uma configuração alternativa para o poro e que será o responsável pela rápida captação de Ca^{2+} (RAM) através da qual a mitocôndria pode rapidamente acumular quantidades limitadas de Ca^{2+} . O efluxo de Ca^{2+} ocorre através do antiporta $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ que troca 2 iões de Na^+ por cada Ca^{2+} . Em algum tipo de células podem também existir um transportador de Ca^{2+} e de H^+ . A PTM é um mega canal e é constituído por várias proteínas mitocondriais que podem ser induzidas pela acumulação de Ca^{2+} , pelo stress oxidativo. Uma vez induzido o poro de PTM permite a passagem de todas as moléculas superiores a 1500Da. Contudo, ocorrem aberturas rápidas e reversíveis da PTM e estas podem ter um papel primordial no controlo do Ca^{2+} mitocondrial. O influxo de

Ca²⁺ associado à sua libertação mediada pelos sistemas de troca constitui um ciclo de Ca²⁺ dissipador de energia mitocondrial. (Jacobson et al 2004).

3.5 - Permeabilidade transitória mitocondrial

A PTM consiste na abertura de uma via de permeabilidade inicialmente reversível e que permite a difusão de solutos até 1500Da da matriz mitocondrial para o espaço extramitocondrial e vice-versa. Trata-se de um processo complexo do qual já se conhecem vários indutores moduladores e inibidores, alguns dos quais serão mencionados de seguida. A PTM é causada pela formação e abertura de poros proteicos na membrana interna mitocondrial os designados poros transitórios de permeabilidade mitocondrial. Apesar de ainda ser um assunto muito discutido na literatura, existe algum consenso sobre o que poderá iniciar a condição de permeabilidade transitória mitocondrial. É sabido que a entrada maciça de cálcio para o interior da mitocôndria, associada a um incremento da geração de espécies reactivas de oxigénio no interior daquele organelo pode levar à formação dos PTM, rompendo a barreira de impermeabilidade característica e necessária da membrana interna mitocondrial (Zoratti M et al., 2005). Algum consenso existe também sobre as possíveis consequências para a mitocôndria uma vez que a abertura de poros de PTM provoca a despolarização mitocondrial, dissociação da fosforilação oxidativa, libertação de solutos intramitocondriais perdendo este organelo a capacidade de produção de energia e a capacidade de tomada de cálcio. A PTM está também associada á indução de um aumento de volume mitocondrial, causando um rompimento da membrana externa e podendo mesmo levar à libertação de factores indutores da apoptose, como o citocromo c, ou, em última análise, a necrose da célula. Os poros de PTM são complexos multiproteicos que se formam nas zonas de união entre a membrana externa e interna da mitocôndria, apesar da identidade molecular deste complexo multiproteico não se encontrar ainda completamente definida, alguns dos seus componentes centrais foram já identificados (Fig 11) e incluem proteínas citoplasmáticas como a hexocinase (HK) e a creatina cinase (CK) que se encontra localizada no espaço intermembranar, proteínas da membrana externa o canal aniónico dependente de voltagem (VDAC) e o receptor das

benzodiazepinas (BPR), proteínas da membrana interna o transportador dos nucleótidos da adenina (ANT) e proteínas da matriz mitocondrial a ciclofilina D.

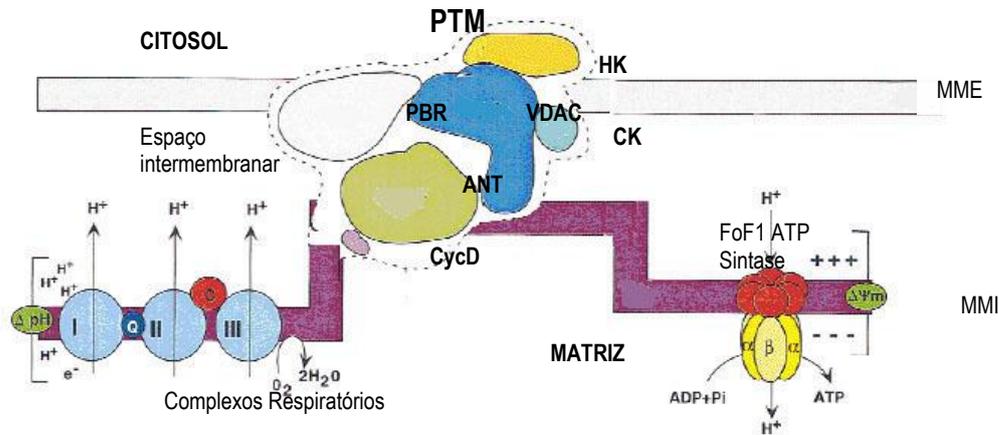


Figura 11 - Representação esquemática dos complexos respiratórios; FoF1 Sintetase; e dos componentes do poro de permeabilidade transitória na membrana mitocondrial interna (MMI) e membrana mitocondrial externa (MME).

Em condições fisiológicas o poro permanece fechado até que o Ca^{2+} aumente substancialmente. A PTM é especificamente inibida por ciclosporina A (CyA) que se liga à CphD impedindo a sua ligação às restantes proteínas constituintes do poro e, como tal, a sua formação. A CphD é uma peptidilprolil *cis-trans* isomerase da matriz mitocondrial que em situações de sobrecarga de Ca^{2+} e de stresse oxidativo, se liga às proteínas constituintes do poro induzindo a sua activação e abertura conferindo-lhe sensibilidade à inibição pela CyA. A indução da PTM é modulada por diferentes factores, sendo favorecida em condições de elevada acumulação de Ca^{2+} na mitocôndria, por aumento do quociente NAD^+/NADH , por prooxidantes, por pH elevado, por peroxidação lipídica e pelo o stresse oxidativo devido às ROS e/ou à depleção mitocondrial de GSH (Colell et al 2004). A PTM induzida por Ca^{2+} pode ser estimulada por uma grande variedade de compostos com diferentes características químicas, incluindo o Pi, agentes oxidantes, reagentes ditiólicos, protonóforos e ligandos do ANT, quando acompanhada por concentrações matriciais elevadas de Ca^{2+} e stresse oxidativo. Nestas condições, ocorre oxidação de grupos -SH de proteínas membranares mitocondriais, NAD(P)H , GSH matricial e depleção de nucleótidos de adenina (Halestrap et al., 2002). Ichas e Mazat em 1998, propuseram que existe uma alternância entre um estado de baixa condutância

do poro de PTM que resulta de aberturas transitórias do poro e um estado de alta condutância que resulta de aberturas de longa duração e que conduzem ao estado completamente aberto do poro. A alternância entre os dois estados é controlada pela ligação do Ca^{2+} ao poro conduzindo ao intumescimento e consequente disfunção mitocondrial, o que ocorre perante situações de sobrecarga de Ca^{2+} . Adicionalmente, muitas são as evidências que sugerem a existência de dois modos de abertura do poro de MPT: um modo regulado e outro desregulado (Lemasters, 2002). As aberturas transitórias do poro de MPT resultam na dissipação temporária do gradiente de prótons e na despolarização mitocondrial (Bernardi P e tal 1998) e são dependentes do pH e permitem a difusão de pequenas moléculas como o Ca^{2+} e H^+ . O estado de alta condutância, que permite a difusão não selectiva de grandes moléculas, tem aberturas estáveis, conduzindo à dissipação do $\Delta\Psi$ e à ruptura da estrutura mitocondrial. A importância fisiológica da PTM continua por esclarecer, todavia, em condições patológicas, um ou vários dos factores reguladores da PTM podem contribuir para alterar a susceptibilidade à sua indução. Assim, a PTM constitui um elemento chave no controlo da viabilidade da célula independentemente do fenótipo da morte celular verificando-se que agentes que previnem ou induzem a PTM regulam a vida ou morte da célula (Zoratti M et al., 2005).

III - OBJETIVOS

III - OBJECTIVOS

Os produtos derivados de plantas têm ganho algum relevo e, recentemente, foi evidenciada a acção anti-*Leishmania* de óleos essenciais e de alguns dos seus constituintes.

Dado o papel central da mitocôndria nas funções celulares e a sua relevância num vasto número de doenças, estes organelos têm sido considerados como um dos principais alvos terapêuticos. A mitocôndria tem uma importância fundamental nos processos de sobrevivência e morte celular, dado que é essencial para a produção de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa, sendo também o principal organelo responsável pela formação intracelular de espécies reactivas de oxigénio. Além disso, a mitocôndria é também muito importante no controlo das vias de sinalização que conduzem à morte celular por apoptose e necrose. Assim, as alterações na estrutura e funções mitocondriais podem funcionar como alvos primários na avaliação da toxicidade e morte celular induzidas pelos compostos em avaliação.

Assim, o objectivo deste trabalho foi estudar a actividade anti-*Leishmania* do *p*-cimeno, um constituinte de óleos essenciais, e do seu derivado sintético 2-nitro-*p*-cimeno, para esclarecer possíveis mecanismos de acção e toxicidade usando a mitocôndria como modelo celular.

Assim com este objectivo geral foram realizados estudos com os seguintes objectivos específicos:

► Avaliar os efeitos do *p*-cimeno, constituinte dos óleos essenciais, e do seu derivado sintético, 2-nitro-*p*-cimeno na viabilidade celular de promastigotas de *L. infantum*;

► Avaliar os efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na morfologia e mobilidade dos promastigotas de *L. infantum*;

► Avaliar os efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na bioenergética e permeabilidade transitória mitocondrial.

► Avaliar a relação função/estrutura química do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Susceptibilidade de *Leishmania infantum* ao 2-nitro-*p*-cimeno e *p*-cimeno

1.1 - Origem das estirpes e manutenção das culturas

As culturas de promastigotas de *Leishmania infantum* Nicolle (zimodemo MON-1) foram mantidas em ambiente estéril, a 26°C em meio de cultura Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 tamponado com Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-1-etanosulfônico (HEPES) suplementado com 10% de SFB inativado a 56°C e penicilina G (250 µg/ml) e sulfato de estreptomicina (250 µg/ml).

1.2 - Determinação do crescimento

Com o objectivo de definir os tempos de incubação para a realização dos estudos de actividade anti-*Leishmania*, foi feito o estudo do crescimento populacional das promastigotas de *L. infantum*.

Em microrganismos unicelulares o crescimento populacional envolve um aumento do número de células ou biomassa como consequência do crescimento e da divisão celular. Os estudos de crescimento são representativos das condições de todas as células de uma população e não de variações individuais. O crescimento populacional é, portanto, avaliado seguindo a variação do número de células ao longo do tempo como consequência do crescimento ou da divisão celular. No presente trabalho, o crescimento de *L. infantum* foi avaliado por contagem de células totais em câmara de Neubauer (Fig. 12), ao longo do tempo de incubação.

As promastigotes de *L. infantum* (10^6 células/ml) foram incubadas a 26°C, em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES suplementado com 10% de SFB inativado a 56°C e penicilina G (250 µg/ml) e sulfato de estreptomicina (250 µg/ml). Em intervalos de 24 horas retiram-se da estufa duplicados e alíquotas de cada tubo foram fixadas com uma solução de formaldeído 10% em PBS. A contagem do número de células totais foi

realizada em câmara de Neubauer ao microscópio óptico. A partir da curva de crescimento foi calculada a taxa de crescimento e o tempo de geração ou duplicação.



Figura 12 - Câmara de Neubauer para contagem de células.

1.3 - Estudos de viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Denizot et al, 1986). O catião do MTT é um sal hidrossolúvel de cor amarela que as desidrogenases mitocondriais reduzem a uma formazana insolúvel de cor azul que absorve a 530 nm. O ensaio baseia-se no facto de que só as células viáveis reduzem o MTT, podendo quantificar a extensão dessa redução por espectrofotometria a 530 nm (Fig.13)..

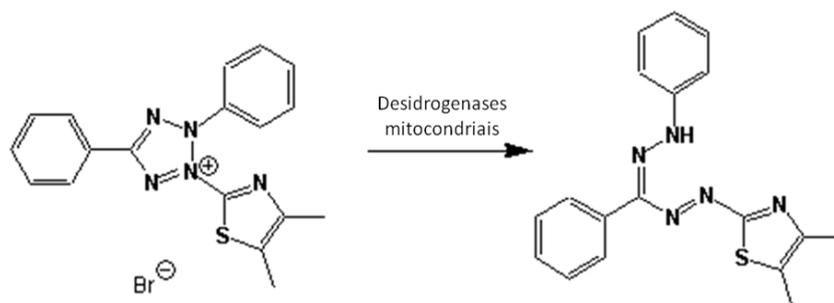


Fig.13 - Redução do brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pelas desidrogenases mitocondriais.

O 2-nitro-*p*-cimeno, *p*-cimeno foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) a 100 mg/ml e, posteriormente, em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES suplementado com 10% de SFB inativado a 56°C de modo a obter uma gama de concentrações de 25 a 400 µg/ml. A concentração máxima de DMSO nos ensaios não excedeu os 0,4%, concentração que não interfere de forma significativa no crescimento celular.

As promastigotes de *L. infantum* (10⁶/ml) em fase de crescimento logarítmica foram incubadas em tubos de 1,5ml a 26°C durante 24h, em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES suplementado com 10% de SFB inativado a 56°C, na presença de várias concentrações *p*-cimeno e 2-nitro-*p*-cimeno. Em paralelo e nas mesmas condições, foram realizados ensaios de controlo na presença do solvente (DMSO), mas sem a adição dos compostos.

Após as 24 horas, os tubos foram centrifugados a uma velocidade de 2500 rpm/5 minutos, de modo a permitir a sedimentação das promastigotes. De seguida, o sobrenadante foi aspirado, as células foram lavadas com tampão PBS (pH 7,2) e incubadas a 37°C durante duas horas com 450 µl de PBS e 50 µl de uma solução de MTT (5 mg/ml). Depois da incubação, as células foram novamente sedimentadas, o meio foi eliminado por aspiração e os cristais redissolvidos em 500 µl de DMSO. De cada amostra foram retirados 300 µl para uma placa de leitura tipo ELISA e a absorvência das amostras foi lida a 530 nm num leitor de placas (Synergy HT, Bio-TEK). Os resultados obtidos foram expressos em percentagem de absorvência relativamente ao controlo.

As experiências foram sempre realizadas em triplicado, tendo-se determinado a média e erro padrão dos resultados obtidos.

As concentrações que induzem a perda de viabilidade a 50% (IC₅₀) foram obtidas por interpolação de regressões dose-resposta extrapoladas pelo GraphPad Prism 5.

1.4 - Estudos morfológicos

Os efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na morfologia das promastigotes de *L. infantum* foram estudados em preparações a fresco por microscopia óptica de contraste de fases (Eclipse E400, Nikon) acoplado com câmara digital (165 DN100, Nikon) e por microscopia óptica de fase normal, após coloração de Giemsa.

Os estudos a fresco permitiram avaliar a forma, o tamanho e a mobilidade celular utilizando a técnica da gota pendente, na qual, as células não fixadas ficam suspensas numa lâmina escavada (lâmina de Koch) (Fig 14).

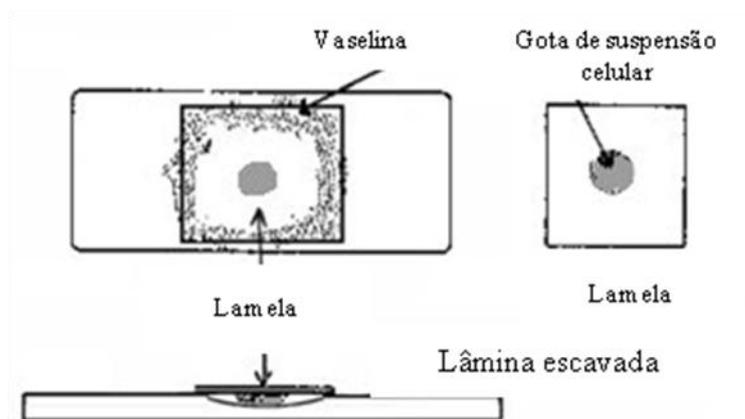


Figura.14 – Esquema de uma preparação em gota pendente usando a lâmina de Koch.

A observação dos esfregaços corados permitiram estudar as alterações na morfologia e nas estruturas das promastigotas de *L. infantum*.

Para os estudos morfológicos, as promastigotas em fase logarítmica foram incubadas durante 24h, em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES suplementado com 10% de SFB inactivado, adicionadas de soluções do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno nas concentrações correspondentes ao IC₅₀. Tal como nos estudos de viabilidade, os controlos foram realizados ao mesmo tempo e nas mesmas condições, substituindo as soluções dos compostos por DMSO, na concentração correspondente à presente nas soluções dos compostos. Após o período de incubação, as células foram sedimentadas, o meio rejeitado e substituído por meio de cultura fresco. Retirou-se uma alíquota

para observação microscópica directa em lâmina de Koch e outra alíquota foi usada para execução de um esfregaço e posterior coloração por Giemsa. Após a execução do esfregaço, as células foram fixadas em metanol puro e coradas com uma solução aquosa de Giemsa (1/10, V/V) durante 10 minutos, em seguida as lâminas foram lavadas e deixadas a secar ao ar.

2 - Avaliação dos efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno na bioenergética mitocondrial

2.1 - Isolamento de mitocôndrias de fígado de rato

As fracções mitocondriais foram isoladas a partir de fígado de ratos Wistar, de acordo com o método descrito por Gazotti e colaboradores (1979) com algumas modificações. Os animais, mantidos em jejum, foram sujeitos a deslocamento cervical e posteriormente decapitados de forma a sangrarem rapidamente. O abdómen dos animais foi aberto com recurso a uma tesoura e o fígado foi rapidamente removido e colocado em meio de homegeneização contendo 250 mM de sacarose, 10 mM de HEPES, 1 mM de EGTA, pH 7,4 e albumina sérica bovina (BSA) deslipidificada (0,1%) (Fernandes et al., 2008). Com o auxílio de uma tesoura, o fígado foi rapidamente triturado e o sobrenadante rejeitado de forma a remover o sangue. Em seguida o tecido foi ressuspensão em cerca de 60 ml de meio de homogeneização e transferido para um homogeneizador de vidro tipo “Potter-Elvehjen”. Com o recurso a um pistão de teflon ligado a um berbequim, a suspensão foi homogeneizada por 6 cursos do pistão a 250 rpm. A suspensão foi transferida para dois tubos de centrifuga equilibrados que foram centrifugados a 4°C durante 10 minutos a uma velocidade de 2500 rpm. O sobrenadante foi então transferido para novos tubos e centrifugado a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C, obtendo-se assim, um sedimento composto pela fracção mitocondrial. O sobrenadante foi eliminado por aspiração e o sedimento ressuspensão em 1 ml de meio de lavagem constituído por 250 mM sacarose, e 10 mM de HEPES com pH de 7,2 (Fernandes et al., 2008). A suspensão mitocondrial foi transferida para novos tubos de centrifuga e diluída em 45 ml de meio de lavagem seguida de duas

centrifugações sequenciais de 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. A fracção mitocondrial purificada foi ressuspensa em 2 ml de meio de lavagem e mantida num eppendorff a 4°C ao longo dos ensaios experimentais.

2.2 - Determinação da concentração de proteína

A concentração de proteína da fracção mitocondrial foi determinada pelo método colorimétrico do biureto (Gornall et al., 1949). A reacção do biureto permite a determinação quantitativa de proteínas por formação de um quelato de cobre com ligações peptídicas da proteína a pH alcalino apresentando uma coloração violeta e absorvência a 550 nm. A redução do Cu(II) a Cu(I) é acompanhada por uma mudança de cor, consoante o conteúdo proteico da amostra. A concentração de proteína foi então quantificada através de uma curva de calibração construída a partir de padrões de BSA. Assim, cerca de 50 µl da suspensão mitocondrial foram colocados num tubo de ensaio contendo 0,95 ml de uma solução de NaCl e 25 µl de SDS a 20%. Em simultâneo foram também preparados os padrões de BSA com um volume final de 2 ml acertado com NaCl e SDS a 20%. Após a preparação de todos os tubos foram adicionados a cada um deles 1,5 ml de reagente de biureto, estes foram incubados a 37°C durante 20 minutos e a absorvência lida a 550 nm.

2.3 - Determinação do consumo de oxigénio

O consumo de oxigénio mitocondrial associado à fosforilação de ADP foi avaliado à temperatura de 30°C, recorrendo a um eléctrodo de oxigénio tipo Clark (YSI Model 5331, Yellow Spring Instruments) ligado a um registador e o eléctrodo foi calibrado de acordo com Rickwood e colaboradores (1987). Os ensaios foram realizados numa câmara de reacção e a suspensão mitocondrial, composta por 1 mg de proteína diluída em 1 ml de meio de respiração contendo 130 mM de sacarose, 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 0,1 mM de EGTA, 5 mM de KH₂PO₄ e 10 mM de Hepes com pH 7,4, foi mantida sob agitação ao longo dos ensaios.

Os ensaios foram iniciados com a adição de 5 mM glutamato/ 2,5 malato, substrato respiratório que induz um pequeno aumento no consumo do oxigénio pelas mitocôndrias (estado 2 da respiração), após cerca de 1 minuto foram adicionadas 150 nmoles de ADP à suspensão, o que originou, nas situações controlo, um aumento acentuado no consumo de oxigénio (estado 3 da respiração). Após o consumo de todo o ADP adicionado, o consumo de oxigénio pelas mitocôndrias retornou para valores próximos do inicial (estado 4 da respiração). Em seguida foram adicionados mais 150 nmol de ADP imediatamente seguida da adição de oligomicina 1 μ M (estado 4 oligomicina) que bloqueia a fracção F₀ da ATP sintase e nos permitiu avaliar a fuga de electrões através desta. Para finalizar os ensaios, adicionou-se FCCP (ionóforo de protões) 1 μ M à suspensão (estado 4 FCCP). Na presença deste dissociador da fosforilação oxidativa, a permeabilidade da membrana mitocondrial aos protões é máxima e, conseqüentemente, os consumos de oxigénio são fortemente estimulados, pelo que, variações na velocidade de consumo de oxigénio registadas após a adição do FCCP são indicadoras de que poderá existir perturbações no sistema de transporte de electrões.

Para avaliação dos efeitos dos compostos no consumo de oxigénio, as suspensões mitocondriais foram previamente incubadas com as diferentes concentrações dos vários compostos durante 3 minutos antes do início da energização com o substrato respiratório.

A velocidade do consumo de oxigénio foi calculada para cada estado da respiração, tendo por base a calibração do eléctrodo que foi feita de modo a que a concentração de oxigénio de 240 nmoles/ml de meio de respiração, a 30°C, correspondesse a 300 mm de papel de registador. Os resultados obtidos a partir destes ensaios permitiram-nos determinar, o índice de controlo respiratório (ICR) que avalia a integridade das mitocôndrias e é calculado pelo quociente entre a velocidade de consumo de oxigénio na presença de ADP (estado 3) e a velocidade de consumo de oxigénio após o consumo do ADP adicionado (estado 4). A eficiência fosforilativa é calculada pelo quociente entre o ADP adicionado e a quantidade de oxigénio consumido para o fosforilar.

2.4 - Determinação do potencial de membrana das mitocôndrias

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) foi determinado indirectamente com um eléctrodo de tetrafenilfosfónio (TPP⁺) selectivo ao catião lipofílico TPP⁺ e como eléctrodo de referência foi usado o eléctrodo de calomelanos (Ag/AgCl₂) (modelo MI 402; microeléctrodos, Inc., Bedford, NH). Os eléctrodos foram ligados a um aparelho de pH (Crison micro pH 2001) e o sinal correspondente à diferença de potencial gerada entre os eléctrodos foi debitado num registador Kipp & Zonen, após ter passado por um circuito de compensação de voltagem basal.

O potencial de membrana é calculado assumindo que a distribuição do TPP⁺ entre a mitocôndria e o meio respeita a equação de Nernst, como o descrito por Kamo e colaboradores (1979), de acordo com a seguinte equação:

$$\Delta\Psi(\text{mV}) = 59 \log (v/V) - 59 \log (10^{\Delta E/59} - 1),$$

em que v , V e ΔE representam, respectivamente, o volume mitocondrial, o volume do meio de incubação e a deflexão do potencial de eléctrodo desde a linha basal. Como volume da matriz mitocondrial foi tomado o valor de 1,1 $\mu\text{l}/\text{mg}$ de proteína (Massini et al., 1984).

A determinação do potencial foi efectuada numa câmara de reacção aberta, termostatzada a 30°C, em 1 ml de meio de reacção contendo 130 mM sacarose, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mM EGTA, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM HEPES a pH 7,4 (Fernandes et al., 2008) suplementado com 3 μM TPP⁺ e 5 mM glutamato/2,5 mM malato. As reacções foram iniciadas por adição das mitocôndrias isoladas de fígado (1 mg proteína) permitindo o desenvolvimento do potencial máximo de polarização (Fig.15 Polarização) sendo a despolarização induzida por adição de 150 nmoles de ADP. Após a fosforilação de todo o ADP adicionado ocorre a repolarização da membrana mitocondrial interna e o restabelecimento do potencial membranar (Fig.15-Repolarização).

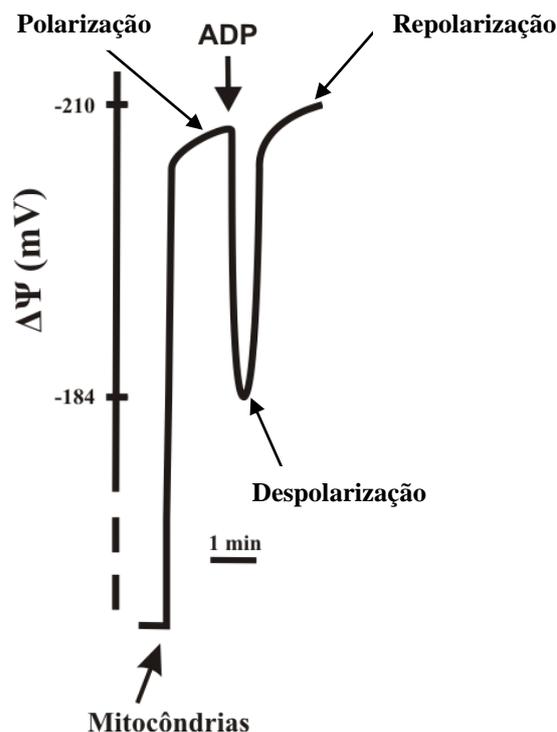


Figura 15 - Representação esquemática de um registo típico obtido a partir de experiências com eléctrodo de TPP⁺

3 - Avaliação dos efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno na permeabilidade transitória mitocondrial

A sonda Cálcio Green 5-N é uma sonda fluorescente específica para o cálcio, de tal forma que a intensidade de fluorescência será proporcional à quantidade de cálcio presente ou libertado para o meio por indução da PTM.

As reacções decorreram em cuvetes de espectrofluorimetria, a 30°C e sob agitação contínua. A suspensão mitocondrial (0,25 mg/ml) foi adicionada a 2 ml de meio de reacção composto por 200 mM de sacarose, 1 mM de KH₂PO₄, 10 μM de EGTA, 10 mM de Tris-Mops, a pH 7,4 o qual foi suplementado com rotenona (2 μM) oligomicina (0,5 mg/ml) e Calcium-Green (100 μM)

A observação e registo dos movimentos de cálcio foi feita tendo por base a emissão de fluorescência da sonda quando ligada ao cálcio. A monitorização foi realizada pela emissão de fluorescência usando um λ de excitação de 506 nm (fenda 4 m) e um λ de emissão de 531 nm (fenda 10 nm) utilizando um espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50 B. Esta avaliação da fluorescência foi feita durante um minuto na ausência de cálcio e substratos respiratórios

(obtenção de uma linha basal), após o qual foi adicionado o cálcio. Decorrido mais um minuto, as mitocôndrias foram energizadas com succinato (5 mM) seguido de cerca de 10 minutos de monitorização contínua. Os compostos em estudo e a CyA foram adicionados à suspensão de membranas e incubados durante 3 minutos antes da adição do cálcio.

4 - Avaliação de efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno na integridade das mitocôndrias

Para esclarecer os efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno na integridade da membrana mitocondrial, foram avaliadas as variações dos volumes osmóticos por monitorização espectrofotométrica da absorvência aparente da suspensão a 540 nm, num espectrofotómetro Perkin-Elmer, lambda 6 UV/VIS (Custódio *et al.*, 1998). As experiências decorreram em 2 ml de meio de respiração contendo sacarose 130 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, EGTA 0,1 mM, KH₂PO₄ 5 mM e HEPES 5 mM, pH 7,4, suplementado com rotenona 2 µM. A suspensão mitocondrial (1 mg) foi adicionada ao meio de respiração na presença de substratos respiratórios, à temperatura de 30 °C e sob agitação magnética constante, tendo sido feita a leitura contínua da absorvência a 540 nm durante 30 minutos. Para esclarecer os efeitos dos compostos, a suspensão de mitocôndrias foi incubada durante 3 minutos na ausência (controlo) e na presença de diferentes concentrações de 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno, antes de iniciar a leitura da absorvência a 540 nm.

5 - Estudo estatístico

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad Prism 4. O significado estatístico entre os ensaios foi avaliado pelo teste ANOVA (não paramétrico) seguido do teste de Turkey, para efectuar comparações entre grupos. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão (média \pm SE) de pelo menos 3 ensaios em diferentes preparações mitocondriais.

V - RESULTADOS

V - RESULTADOS

1 - Actividade anti-*Leishmania* do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno

1.1 - Estudo do crescimento de promastigotas de *L. infantum*

O crescimento de *L. infantum* foi determinado através da variação do número de promastigotes ao longo do tempo de incubação em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES e suplementado com 10% de SFB. A Figura 1 representa a curva de crescimento de *L. infantum*. Observa-se que *L. infantum* é um microrganismo de crescimento lento, apresentando uma fase exponencial entre os 2-3 dias e uma fase estacionária entre os 3 e 5 dias de incubação. Com base nos dados do crescimento, as 24h foram escolhidas como o tempo de incubação óptimo para a realização dos ensaios de *screening* de actividade do 2-nitro-*p*-cimeno e do *p*-cimeno, uma vez que as células se encontram em plena fase logarítmica de crescimento.

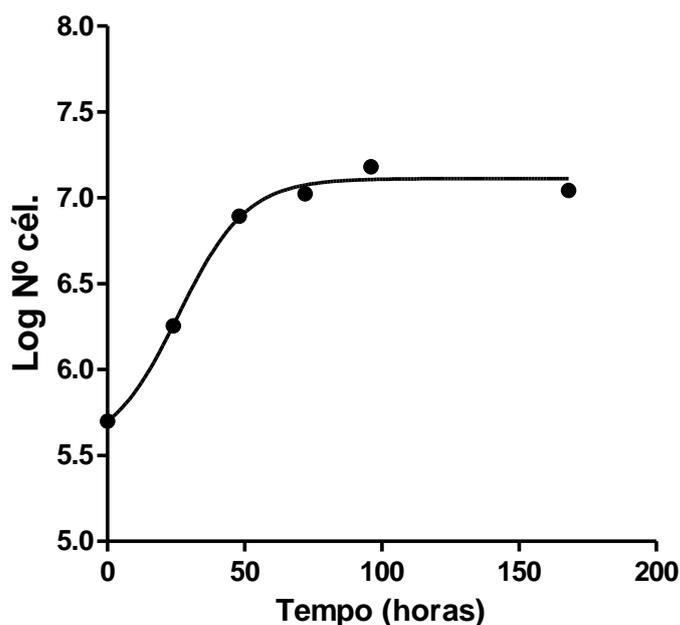


Figura 16 - Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania infantum*. A taxa de crescimento obtida foi de $0,052 \text{ h}^{-1}$ com um tempo de duplicação de 13,27 h. As células (10^6 células/ml) em fase logarítmica (10^6) foram incubadas a 26°C , em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES, suplementado com 10% de SFB (inactivado a 56°C). Os duplicados foram retirados da estufa ao fim de 24, 48, 72 e 96 horas e o número total de células foi determinado por contagem em câmara de Neubauer a partir da realização de seis ensaios independentes.

1.2 - Efeitos na viabilidade de promastigotas de *L. infantum*

O estudo dos efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno em promastigotas de *L. infantum* foi realizado avaliando a viabilidade celular pelo método do MTT (Denizot, e tal., 1986). Nestes ensaios, as promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram incubadas, em triplicados, durante 24h com concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$ de cada um dos compostos. Após o período de incubação, as suspensões celulares foram submetidas ao método de MTT conforme descrito na secção Material e Métodos e a absorvência foi lida a 530 nm.

Os resultados, expressos em percentagem de células viáveis relativamente ao controlo, não revelaram efeitos significativos na viabilidade celular das promastigotas incubadas na presença do *p*-cimeno. Em contraste, o 2-nitro-*p*-cimeno induziu uma diminuição significativa da viabilidade celular das promastigotas para todas as concentrações. Para este composto, a viabilidade celular às 24horas variou entre 80% e 40% de células viáveis relativamente ao controlo. A análise estatística obtida através do GraphPad Prism 5 revelou um IC_{50} de 145 $\mu\text{g/ml}$ no que se refere à acção do 2-nitro-*p*-cimeno.

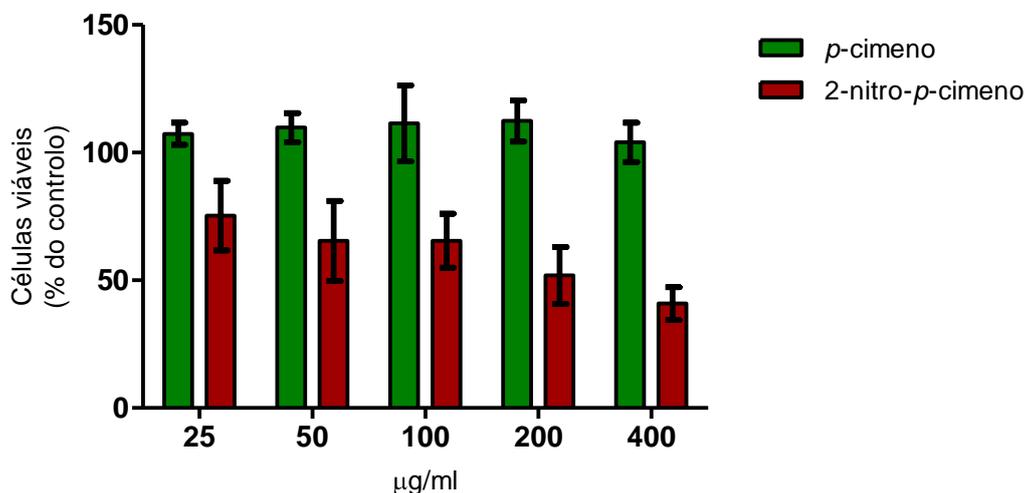


Figura 17 - Efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na viabilidade celular de promastigotas de *L. infantum*. As células (10^6) foram incubadas com *p*-cimeno e 2-nitro-*p*-cimeno em concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g/ml}$. A incubação de 24horas decorreu a 26°C, em meio de cultura RPMI 1640 tamponado com HEPES, suplementado com 10% de SFB inactivado a 56°C. Os valores de média e erro padrão foram calculados tendo por base, em seis ensaios independentes ($n=6$).

1.3 - Efeitos na morfologia de promastigotas de *L. infantum*

A observação das formas promastigotas de *L. infantum* a fresco, por microscopia de contraste de fases, permitiu avaliar as alterações induzidas pelos compostos na forma, tamanho e mobilidade das células. No controlo (Fig. 18 A), as formas promastigotas de *L. infantum* apresentavam o seu aspecto fusiforme característico, com flagelo bem visível na região anterior das células e com mobilidade típica destes protozoários.

A incubação das promastigotas com 145 µg/ml de 2-nitro-*p*-cimeno (IC₅₀) (Fig. 18 C) induziu alterações significativas na forma, mobilidade e tamanho do flagelo apresentando-se mais arredondada e com uma diminuição significativa na mobilidade. No que se refere à incubação das promastigotas com 200 µg/ml de *p*-cimeno, a observação microscópica não revelou alterações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados (Fig 18 B).

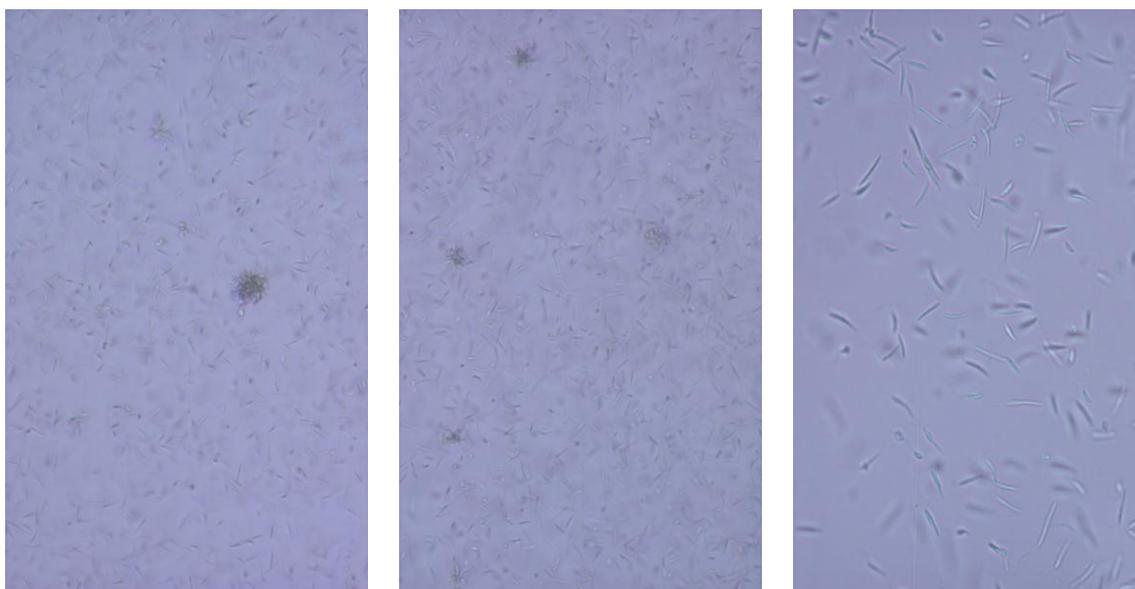


Figura 18 - Observação das formas promastigotas de *L. infantum* a fresco por microscopia de contraste de fases, após incubação de 24 horas, nas condições experimentais descritas na secção Material e Métodos. (A) Promastigotas sem tratamento (controlo com DMSO) (ampliação de 100x); (B) Promastigotas incubadas com 200 µg/ml de *p*-cimeno (ampliação de 100x); (C) Promastigotas incubadas com 145 µg/ml de 2-nitro-*p*-cimeno (ampliação de 400x).

Os estudos de microscopia óptica após coloração de Giemsa, não evidenciaram alterações estruturais significativas nas células incubadas com *p*-cimeno (Fig 19 B), contrariamente ao observado nas promastigotas incubadas com 145 µg/ml de 2-nitro-*p*-cimeno (IC₅₀) (Figura 19 C). De facto, as células apresentaram-se arredondadas e com encurtamento e enovelamento do flagelo quando comparadas com o controlo, em que as células se apresentaram tipicamente fusiformes, com cinetoplasto bem definido e com um flagelo anterior comprido e distendido.

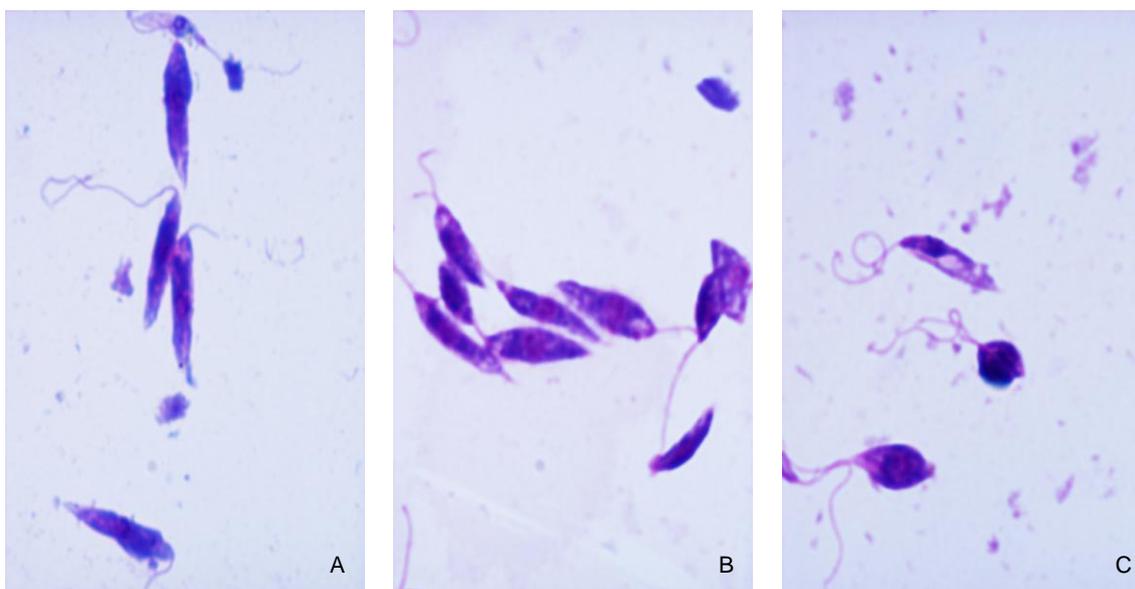


Figura 19 - Observação por microscopia óptica de promastigotas de *L. infantum* incubadas durante 24 horas na presença e ausência dos compostos em estudo, após coloração de Giemsa. (A) Promastigotas sem tratamento (controlo com DMSO); (B) Promastigotas incubadas com 200 µg/ml de *p*-cimeno); (C) Promastigotas incubadas com 145 µg/ de 2-nitro-*p*-cimeno. (Ampliação de 1000x).

2- Efeitos na bioenergética mitocondrial

2.1 - Efeitos do *p*-cimeno no consumo de oxigénio e potencial de membrana mitocondrial

Este estudo permitiu-nos avaliar os efeitos do *p*-cimeno na cadeia respiratória mitocondrial e na eficiência fosforilativa das mitocôndrias de fígado de rato. A energização das mitocôndrias com glutamato/malato, na ausência do *p*-cimeno (controlo) induziu um ligeiro aumento no consumo de oxigénio (estado 2 respiração) (Fig. 20), devido à activação da cadeia respiratória.

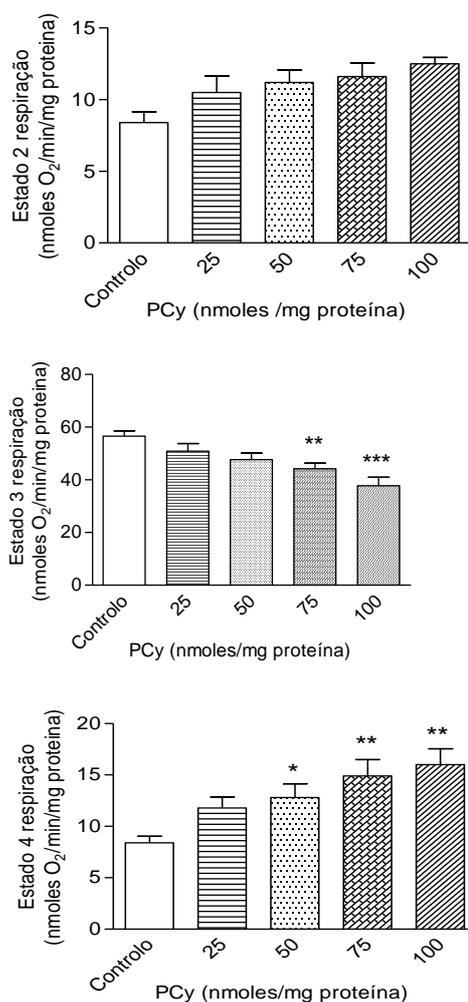


Figura 20 - Efeito do *p*-cimeno (PCy) nos estados 2, 3 e 4 da respiração de mitocôndrias de fígado induzido por glutamato/malato. A respiração mitocondrial foi determinada através do consumo de O₂, usando um eléctrodo tipo Clark. Os dados apresentados representam a média ± SD de seis ensaios independentes. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs controlo.

A incubação das mitocôndrias com 25, 50, 75 e 100 nmoles *p*-cimeno/mg de proteína não induziu um aumento significativo no estado 2 da respiração em comparação com mitocôndrias incubadas na ausência de *p*-cimeno (Fig. 20).

A adição de ADP à suspensão mitocondrial induziu um forte consumo de oxigénio (56,6 nmoles O₂/min/mg de proteína) (estado 3 respiração) (Fig. 20 Controlo) em contraste com o observado no estado 2 da respiração (8,4 nmoles O₂/min/mg de proteína) (Fig. 20 Controlo). A pré-incubação das mitocôndrias com 25 e 50 nmoles *p*-cimeno/mg de proteína não diminuiu significativamente a taxa de fosforilação de ADP (estado 3 da respiração) (Fig.20). No entanto, o estado 3 da respiração foi significativamente menor quando as mitocôndrias foram incubadas com *p*-cimeno em concentrações acima de 75 nmoles/mg de proteína (Fig. 19), sugerindo que *p*-cimeno afecta a capacidade fosforilativa das mitocôndrias.

Após a fosforilação de todo o ADP, as mitocôndrias regressaram ao estado 4 da respiração (8,4 nmoles O₂/min/mg de proteína) (Fig. 20), onde o consumo de oxigénio é menor do que no estado 3 (Fig. 29) e semelhante ao observado em o estado 2 (8,4 nmoles O₂/min/mg de proteína) (Fig. 20). A incubação da suspensão mitocondrial com *p*-cimeno (25 nmoles/mg de proteína) não induziu alterações significativas no estado 4 da respiração. No entanto para concentrações de *p*-cimeno acima de 50 nmoles/mg de proteína verificou-se uma estimulação significativa do estado 4 da respiração (Fig. 20), sugerindo que *p*-cimeno induz uma fuga de protões através dos componentes da membrana mitocondrial interna.

Para avaliar o efeito inibidor sobre a capacidade de fosforilação das mitocôndrias de fígado observada na presença do *p*-cimeno, foi determinado o índice de controlo respiratório (estado 3/estado 4) e a razão ADP/O. Como pode ser observado na figura 21, concentrações de *p*-cimeno \geq 25 nmoles/mg de proteína provocam uma diminuição significativa do ICR, comparativamente à situação controlo.

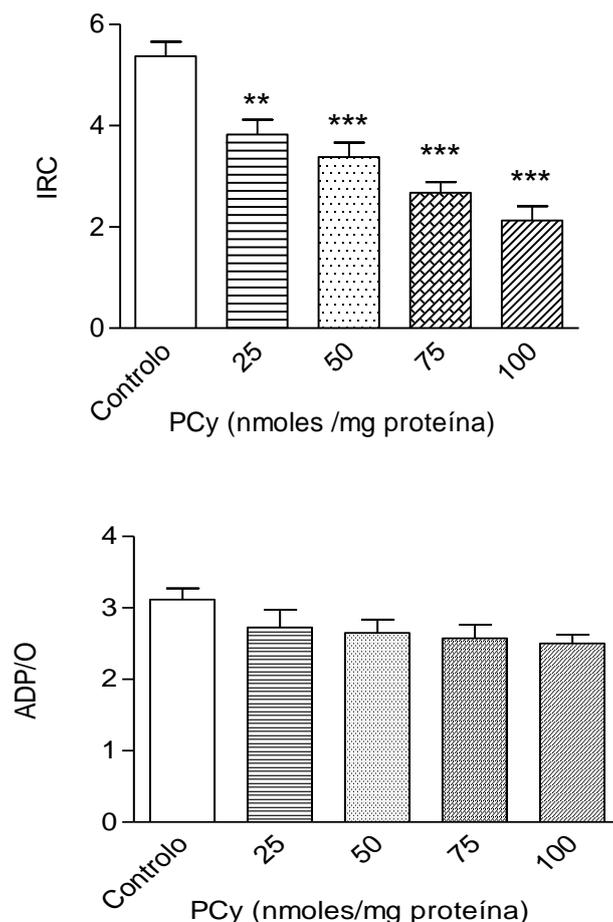


Figura 21 - Efeito do *p*-cimeno (PCy) no ICR (A) e no quociente ADP/O (B). Os índices foram determinados como descrito na secção Material e Métodos e os valores foram expressos em média \pm SD de seis ensaios independentes. ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$ vs controlo;

Este efeito ocorre essencialmente como consequência da inibição do estado 3 e estimulação estado 4 da respiração. Embora tenhamos observado uma diminuição no estado 3 da respiração das mitocôndrias incubadas com o, *p*-cimeno, a razão ADP/O não foi estatisticamente diferente quando comparada com o controlo (Fig. 21). A estimulação do estado 4 da respiração induzida pelo *p*-cimeno poderá resultar de uma permeabilização da membrana a prótons como consequência de disrupção membranar ou fuga de prótons através da fracção F_o da ATP sintase. A fim de esclarecer este mecanismo, foram avaliados os efeitos do *p*-cimeno na integridade da membrana mitocondrial através da monitorização da diminuição da absorvência aparente a 540 nm (Fig. 22). A adição de Triton X-100, que induz a destruição da integridade da

membrana celular devido à sua acção de detergente, causou uma forte diminuição na absorvência aparente a 540 nm da suspensão mitocondrial, evidenciando um elevado intumescimento e efeito lítico nas mitocôndrias. (Fig. 22). A incubação das mitocôndrias com concentrações de *p*-cimeno que estimulam o estado 4 da respiração, 75 e 150 nmoles *p*-cimeno/mg de proteína, não diminuiu significativamente a dispersão da luz em mitocôndrias não energizadas, comparativamente ao observado com os efeitos do Triton X-100, sugerindo que o *p*-cimeno nas concentrações estudadas, não induz a ruptura da membrana mitocondrial (Fig. 22).

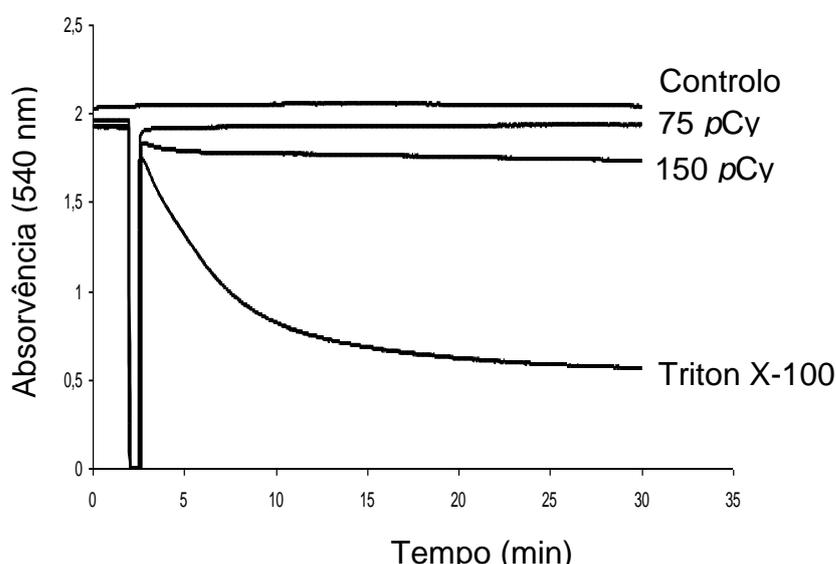


Figura 22 - Efeitos do *p*-cimeno (PCy) no intumescimento mitocondrial. Os registos foram obtidos através da avaliação da absorvência aparente a 540 nm das suspensões mitocondriais. Os dados apresentados correspondem a ensaios típicos de 4 experiências independentes.

Apesar de não se observar uma estimulação significativa do estado 2 da respiração induzida pelo *p*-cimeno em mitocôndrias energizadas com glutamato /malato (antes da adição ADP) (Fig. 20), o estado 4 da respiração, isto é, após fosforilação do ADP, foi estimulado por este composto (Fig. 20). Quando avaliámos o efeito do *p*-cimeno no estado 2 da respiração na presença de ATP, observou-se que a adição do composto em concentrações abaixo de 50 nmol/mg de proteína não induziu um aumento significativo no estado 2 da respiração (Fig. 20). No entanto, as mitocôndrias incubadas com ATP na presença de 75 e 100 nmoles de *p*-cimeno/mg de proteína sofreram uma

estimulação do estado 2 da respiração, em comparação com o controlo (Fig. 20). Este efeito do *p*-cimeno é semelhante ao observado no estado 4 da respiração (Fig. 20), sugerindo que este composto induz um efeito estimulador da cadeia respiratória na presença de ATP exógeno ou sintetizado pelo sistema fosforilativo ou complexo V.

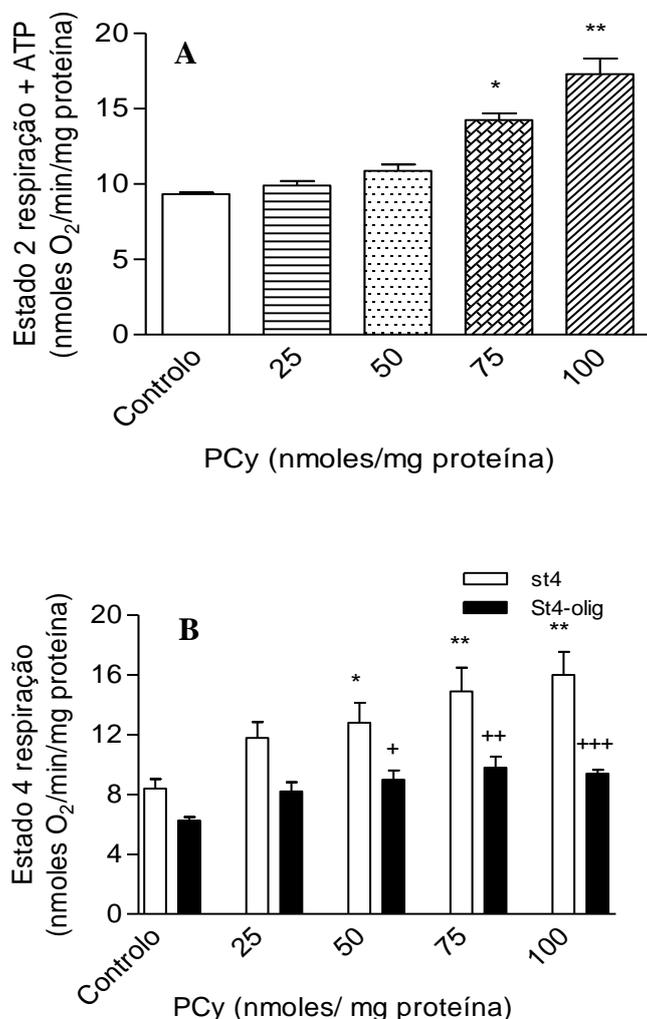


Figura 23 - Efeito do *p*-cimeno (PCy) e do ATP (A) no estado 2 e no estado 4 da respiração, na presença de oligomicina (St4-olig) (B). O estado 2 da respiração foi determinado após a energização da suspensão mitocondrial com glutamato/malato e o estado 4 da respiração após a fosforilação do ADP. O estado 4 da respiração na presença de oligomicina (St4 olig) foi induzido pela adição de ADP e oligomicina após a estabilização do consumo de oxigénio característico do estado 4. Os dados apresentados representam a média \pm SD de seis experiências independentes. * P <0,05; ** p <0,01 vs controlo; + p <0,05, ++ p <0,01, +++ p <0,001 vs estado 4 na ausência de oligomicina (St4).

Para esclarecer os diferentes efeitos do ATP nas alterações respiratórias induzidas pelo *p*-cimeno, foram efectuadas outras experiências com oligomicina, um inibidor do canal de prótons através da fracção Fo da ATP sintase (Fig. 23). A adição de oligomicina às mitocôndrias incubadas com 25 nmoles *p*-cimeno /mg de proteína não induziu uma diminuição significativa no estado 4 da respiração ($p > 0,05$). Para concentrações de *p*-cimeno acima de 50 nmoles/mg de proteína, a adição de oligomicina à suspensão mitocondrial durante o estado 4 da respiração, provocou uma diminuição no consumo de O₂ estimulado pelo *p*-cimeno em função da concentração (Fig. 22). Estes resultados sugerem que o *p*-cimeno, na presença de ATP induz a fuga de H⁺ através da fracção Fo do complexo V da cadeia respiratória.

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) é fundamental para o fenómeno da fosforilação oxidativa, ou seja, para a conversão do ADP a ATP pela ATP sintase. As bombas de H⁺ existentes na cadeia respiratória mitocondrial promovem o transporte dos prótons da matriz mitocondrial através da membrana mitocondrial interna. O gradiente de H⁺ origina um potencial electroquímico (Δp), resultando numa variação de pH (ΔpH) e num gradiente eléctrico ($\Delta\Psi$) através da membrana mitocondrial interna. A dissipação do Δp devido à permeabilização da membrana a H⁺ diminui a eficiência da fosforilação oxidativa das mitocôndrias.

Tabela 1- Efeitos of *p*-Cymeno (*p*Cy) em parâmetros da fosforilação oxidativa de mitocôndrias de fígado de rato

nmoles <i>p</i> Cy/ mg proteína	Controlo	25	50	75	100	75+ATP
$\Delta\Psi$ (-mV)	223±1.85	219±2.15	216±2.34	202±2.99*	194±1.38**	180±4.87***
Despolarização por ADP (-mV)	32.4±1.93	31.9±1.75	32.1±2.53	28.3±2.10*	23.9±1.34**	15.3±2.89***
Tempo de fosforilação (min)	1.32±0.07	1.34±0.15	1.42±0.11	2.06±0.15**	2.67±0.35**	ND

Os valores representam a média±SD de 4 experiências independentes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ quando comparado com o controlo

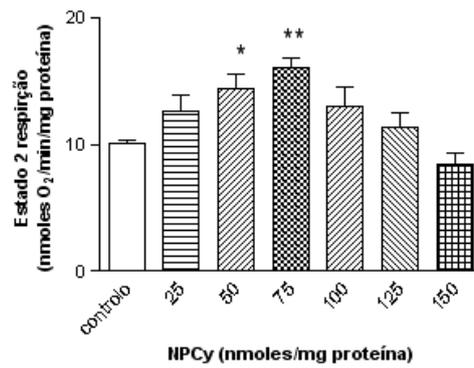
O $\Delta\Psi$ desenvolvido pela mitocôndria após a energização com glutamato/malato foi de cerca de -223 mV (negativo no interior) (Tabela 1). A

incubação com *p*-cimeno em concentrações abaixo de 50 nmoles/mg de proteína não induziu alterações significativas no $\Delta\Psi$ nem no ciclo fosforilativo do ADP. No entanto, observou-se que para concentrações acima de 75 nmoles/mg de proteína a despolarização induzida pelo ADP e o tempo de fosforilação (tempo necessário para a fosforilação ADP) (Tabela 1) foram significativamente alterados, observando-se uma diminuição do potencial desenvolvido e um aumento no tempo de fosforilação. Estes efeitos foram potenciados na presença de ATP (Tabela 1).

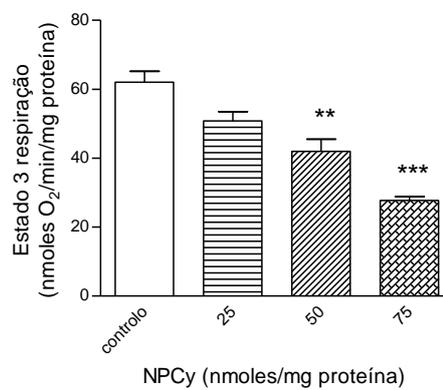
2.2 - Efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno no consumo de oxigénio e potencial de membrana mitocondrial.

As mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram energizadas com glutamato/malato, na ausência do 2-nitro-*p*-cimeno induzindo um ligeiro aumento no consumo de oxigénio (estado 2 respiração) (Fig 24-controlo), devido à estimulação da cadeia respiratória. A incubação das suspensões mitocondriais com 2-nitro-*p*-cimeno em concentrações de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 nmoles/mg de proteína, só revelou efeitos estimulantes significativos no estado 2 da respiração nas concentrações de 50 e 75 nmoles/mg de proteína comparativamente à suspensão incubada na ausência de 2-nitro-*p*-cimeno (Controlo) (Fig. 24).

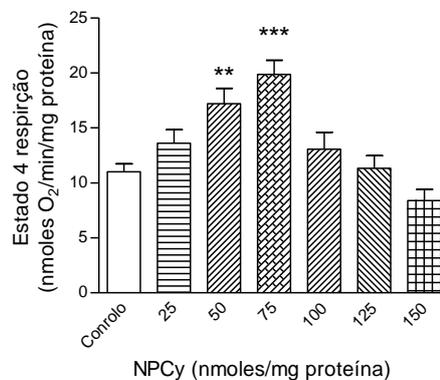
A adição de ADP à suspensão mitocondrial induziu um aumento significativo do consumo de oxigénio (62,06 nmoles O₂/min/mg de proteína) (estado 3 respiração) (Fig. 24 Controlo) em contraste com o observado no estado 2 da respiração (10,6 nmoles O₂/min/mg de proteína) (Fig. 24 Controlo). A incubação das mitocôndrias com 25 nmoles 2-nitro-*p*-cimeno/mg de proteína não induziu alterações significativas na sua capacidade fosforilativa (estado 3 da respiração) (Fig. 24). No que se refere ao estado 3, consumo de oxigénio foi significativamente menor na presença de 2-nitro-*p*-cimeno em concentrações acima de 50 e 75 nmoles/mg de proteína (Fig. 24), sugerindo que a estas concentrações, o 2-nitro-*p*-cimeno afecta a capacidade fosforilativa das mitocôndrias.



** p < 0.01 vs Controlo
* p < 0.05 vs Controlo



*** p < 0.001 vs Controlo
** p < 0.01 vs Controlo



*** p < 0.001 vs Controlo
** p < 0.01 vs Controlo

Figura 24 - Efeito das várias concentrações de 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) nos estados 2, 3 e 4 da respiração de mitocôndrias de fígado de rato. A energização das mitocôndrias foi induzida por adição de glutamato/malato e a avaliação das taxas de respiração efectuou-se usando um eléctrodo tipo Clark para determinação do consumo de de O₂. Os dados apresentados representam a média ± SD de seis ensaios independentes. * P <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 vs controlo.

As mitocôndrias regressam ao estado 4 da respiração (11 nmoles O_2 /min/mg de proteína) (Fig. 24) após a fosforilação de todo o ADP e o consumo de oxigénio diminui relativamente ao estado 3 (Fig. 24) aproximando-se do observado no estado 2 (10,6 nmoles O_2 /min/mg de proteína) (Fig. 24). Quando incubadas com 25 nmoles de 2-nitro-*p*-cimeno/mg de proteína, não se registaram alterações significativas no estado 4 da respiração. Pelo contrário para concentrações de 2-nitro-*p*-cimeno de 50 e 75 nmoles/mg de proteína observou-se uma estimulação significativa do estado 4 da respiração (Fig. 24), pelo que o 2-nitro-*p*-cimeno poderá induzir uma fuga de protões através dos componentes da membrana mitocondrial interna.

O índice de controlo respiratório (estado 3/estado 4) e a razão ADP/O foram determinados com o objectivo de esclarecer o efeito inibidor do 2-nitro-*p*-cimeno sobre a capacidade fosforilativa mitocondrial. Os resultados evidenciados na figura 25 indicam que, qualquer uma das concentrações de 2-nitro-*p*-cimeno provoca uma diminuição significativa do ICR, comparativamente à situação controlo. Isto poderá dever-se essencialmente à inibição do estado 3 e estimulação estado 4 da respiração. Embora tenhamos observado uma diminuição no estado 3 da respiração das mitocôndrias incubadas com 50 e 75 nmoles de 2-nitro-*p*-cimeno, a razão ADP/O só se revelou significativamente diferente do controlo no que respeita à concentração de 75 nmoles/mg de proteína (Fig. 25). A estimulação do estado 4 da respiração induzida pelo 2-nitro-*p*-cimeno poderá dever-se à permeabilização da membrana a protões como consequência de uma fuga dos mesmos através da fracção F_o da ATP sintase ou devido a uma disrupção da membrana.

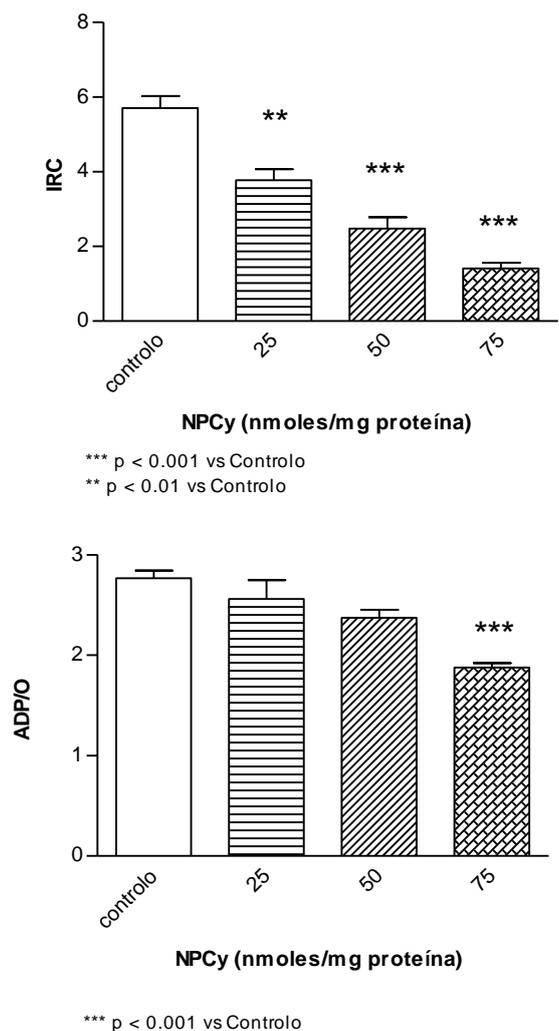


Figura 25 - Efeito do 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) no índice de controlo respiratório (IRC) (A) e no quociente ADP/O (B), determinados como descrito na secção de Material e Métodos. Os valores obtidos representam a média ± SD de seis experiências independentes realizadas em diferentes suspensões mitocondriais. ** P <0,01, *** p <0,001 vs controlo;

Com o objectivo de clarificar este mecanismo, os efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno sobre a integridade da membrana mitocondrial foram avaliados através de uma monitorização da diminuição da absorvência aparente a 540 nm (Fig 26). O Triton X-100 induz alterações que comprometem a integridade membranar, e como tal, a sua adição à suspensão mitocondrial induziu uma forte diminuição na dispersão da luz da preparação evidenciando um elevado intumescimento das mitocôndrias (Fig 26). Nestes ensaios, a incubação das

mitocôndrias foi feita com a maior concentração de 2-nitro-*p*-cimeno que induz estimulação do estado 4 da respiração (75 nmoles/mg de proteína). Uma vez que a concentração de 2-nitro-*p*-cimeno usada não induziu efeitos no intumescimento mitocondrial, fez-se uma nova incubação com uma concentração de 2-nitro-*p*-cimeno duas vezes superior (150 nmoles/mg de proteína). Em ambos os ensaios não se registaram alterações significativas na dispersão da luz das preparações sugerindo que a diminuição da capacidade fosforilativa das mitocôndrias na presença do 2-nitro-*p*-cimeno não se deve a alterações na permeabilidade e da integridade membranas.

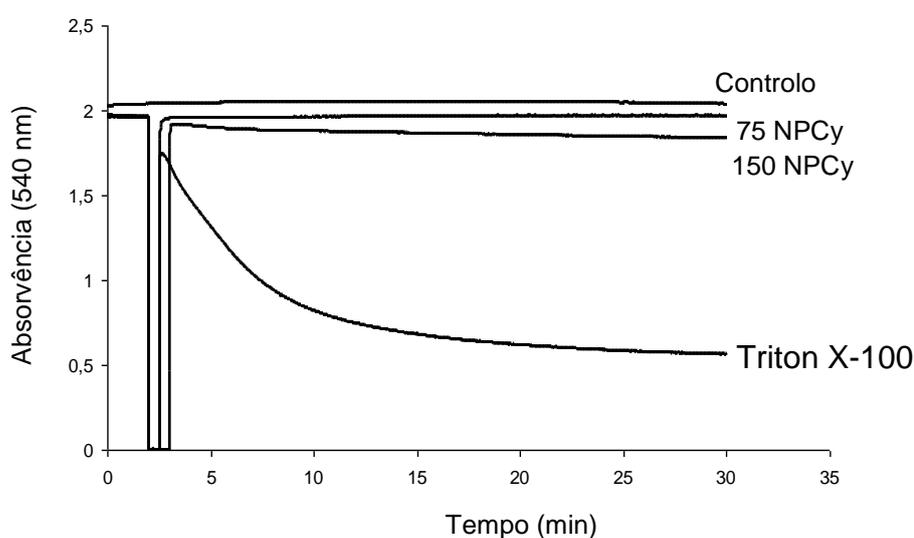


Figura 26 - Efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) no intumescimento mitocondrial. Os resultados apresentados foram obtidos através da monitorização da diminuição da absorvência a 540 nm das suspensões mitocondriais. Os registos apresentados são típicos de 4 ensaios independentes.

Quando incubadas com 2-nitro-*p*-cimeno em concentrações inferiores a 50 nmol/mg de proteína, as suspensões mitocondriais energizadas com glutamato/malato não sofreram um aumento significativo no estado 2 da respiração (Fig. 24). No entanto, as mitocôndrias incubadas com ATP na presença de 50 e 75 nmoles de 2-nitro-*p*-cimeno/mg de proteína sofreram uma estimulação do estado 2 da respiração, em comparação com o controlo (Fig. 24). Estes resultados são semelhantes aos observados no estado 4 da respiração (Fig. 24), sugerindo que a potenciação do consumo de oxigénio se

pode dever tanto a ATP exógeno como por ATP sintetizado pelo ao nível do complexo V da cadeia respiratória mitocondrial

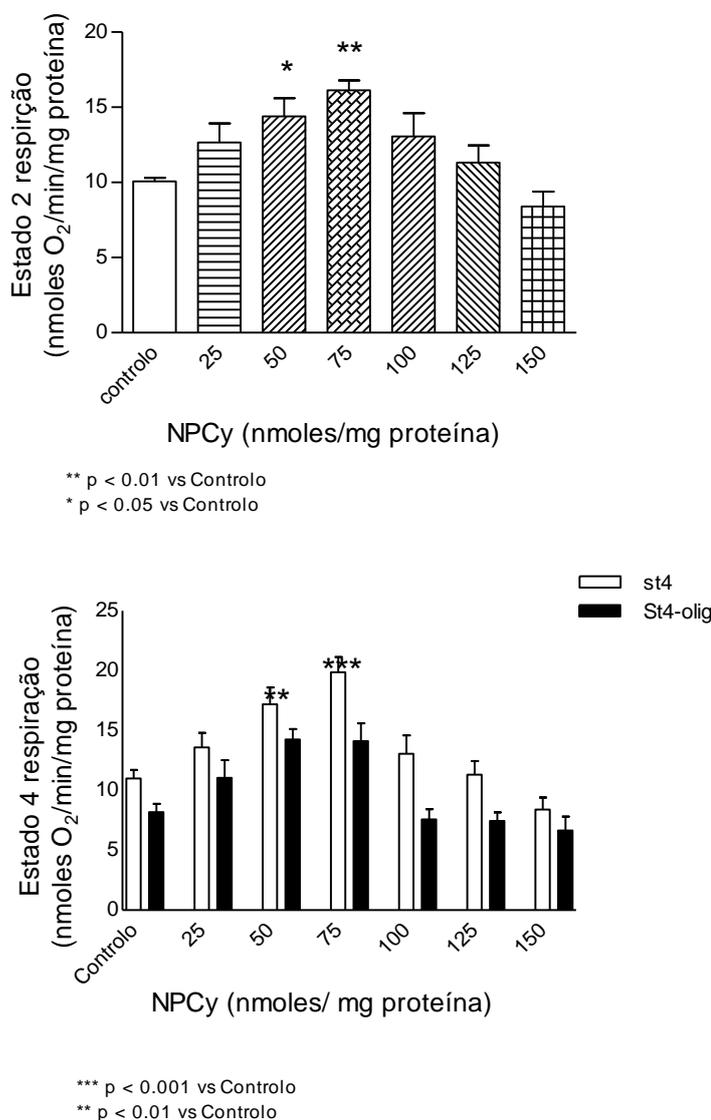


Figura 27 - Efeito do *p*-cimeno (NPCy) e do ATP (A) no estado 2 e no estado 4 da respiração, na presença de oligomicina (St4-olig) (B). O estado 2 da respiração foi determinado após a energização da suspensão mitocondrial com glutamato/malato e o estado 4 da respiração após a fosforilação do ADP. O estado 4 da respiração na presença de oligomicina (St4 olig) foi induzido pela adição de ADP e oligomicina após a estabilização do consumo de oxigênio característico do estado 4. Os dados apresentados representam a média ± SD de seis experiências independentes. * P <0,05; ** p <0,01 vs controle; + p <0,05, ++ p <0,01, +++ p <0,001 vs estado 4 na ausência de oligomicina (St4).

De forma a avaliar os efeitos do ATP nas alterações respiratórias induzidas pelo 2-nitro-*p*-cimeno, realizaram-se ensaios complementares na presença de oligomicina (Fig. 27). Quando adicionada oligomicina a mitocôndrias incubadas com 25 nmoles de 2-nitro-*p*-cimeno/mg de proteína, esta não induziu alterações significativas no estado 4 da respiração ($p > 0,05$). No entanto, para concentrações de 50 e 75 nmoles de 2-nitro-*p*-cimeno/mg de proteína verificou-se um aumento no consumo de O_2 estimulado pelo 2-nitro-*p*-cimeno (Fig. 27). Estes resultados sugerem que a diminuição da eficiência fosforilativa das mitocôndrias incubadas com 2-nitro-*p*-cimeno, não será resultado da fuga de H^+ através da fracção F_o da ATP sintase, pois esta encontra-se inibida.

Sendo o potencial de membrana fundamental para um correcto funcionamento do processo fosforilativo, avaliaram-se também os efeitos 2-nitro-*p*-cimeno sobre o desenvolvimento do mesmo.

A incubação das suspensões mitocondriais com 2-nitro-*p*-cimeno induziu uma diminuição gradual no desenvolvimento $\Delta\Psi$ em função da concentração do 2-nitro-*p*-cimeno, bem como na capacidade de repolarização das mitocôndrias.

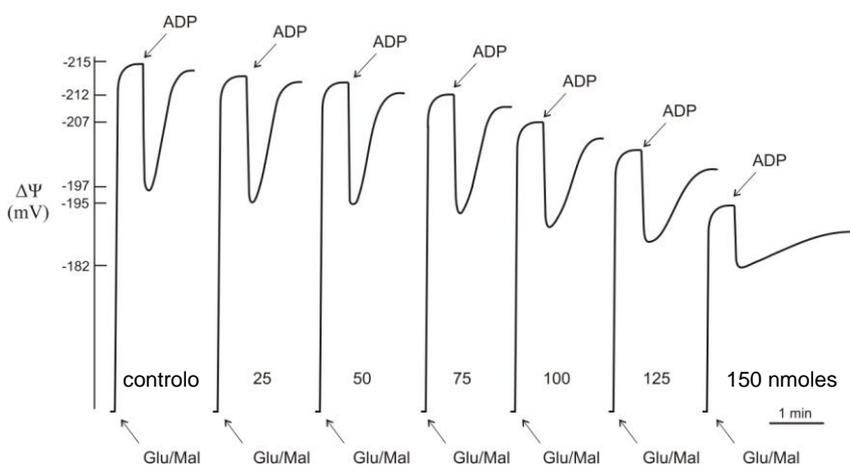


Figura 28 - Efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) no potencial de membrana ($\Delta\Psi$) e na fosforilação oxidativa de mitocôndrias de fígado de rato. Os registos apresentados são representativos de 4 experiências independentes realizadas em diferentes preparações mitocondriais. Os números adjacentes aos registos representam as concentrações, expressas em nmoles/mg de proteína, de NPCy.

Para concentrações acima de 100 nmoles/mg de proteína observa-se uma diminuição significativa da despolarização induzida pelo ADP e um aumento do tempo necessário para a sua fosforilação. Para concentrações de 2-nitro-*p*-cimeno de 150 nmoles/mg de proteína, as alterações atrás descritas são mais drásticas sugerindo que as mitocôndrias perdem a capacidade de repolarização, sendo o tempo de fosforilação semelhante a uma situação em que o sistema transportador de electrões se encontra dissociada do sistema fosforilativo ou complexo V (Fig 28).

3 - Efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na permeabilidade transitória mitocondrial

A indução da PTM resulta na dissipação temporária do gradiente de prótons e na despolarização mitocondrial (Ichas et al., 1994, 1997), bem como permite a difusão de pequenas moléculas como o Ca^{2+} e H^+ . Assim, para avaliar os efeitos do *p*-cimeno e do 2-nitro-*p*-cimeno na PTM usámos uma sonda fluorescente sensível a Ca^{2+} que permite, fluorimetricamente, seguir os fluxos de Ca^{2+} na mitocôndria.

Quando a PTM foi induzida por Ca^{2+} na presença de fosfato inorgânico, observámos que as mitocôndrias incubadas com 40 nmoles Ca^{2+} /mg de proteína rapidamente acumulavam o Ca^{2+} do meio de reacção e tinham capacidade para o reter na matriz mitocondrial (Fig. 29). Todavia, quando as mitocôndrias foram incubadas com 60 nmoles Ca^{2+} /mg de proteína, estas rapidamente acumularam o Ca^{2+} do meio, mas depois de algum tempo libertaram-no para o exterior da mitocôndria, sendo este efeito prevenido pela adição de CyA. A inibição da libertação por CyA indica que as 60 nmoles Ca^{2+} /mg de proteína adicionadas às mitocôndrias induziram a PTM. A incubação das mitocôndrias com *p*-cimeno não afectou significativamente os efeitos do Ca^{2+} em todas as condições testadas (Fig. 29).

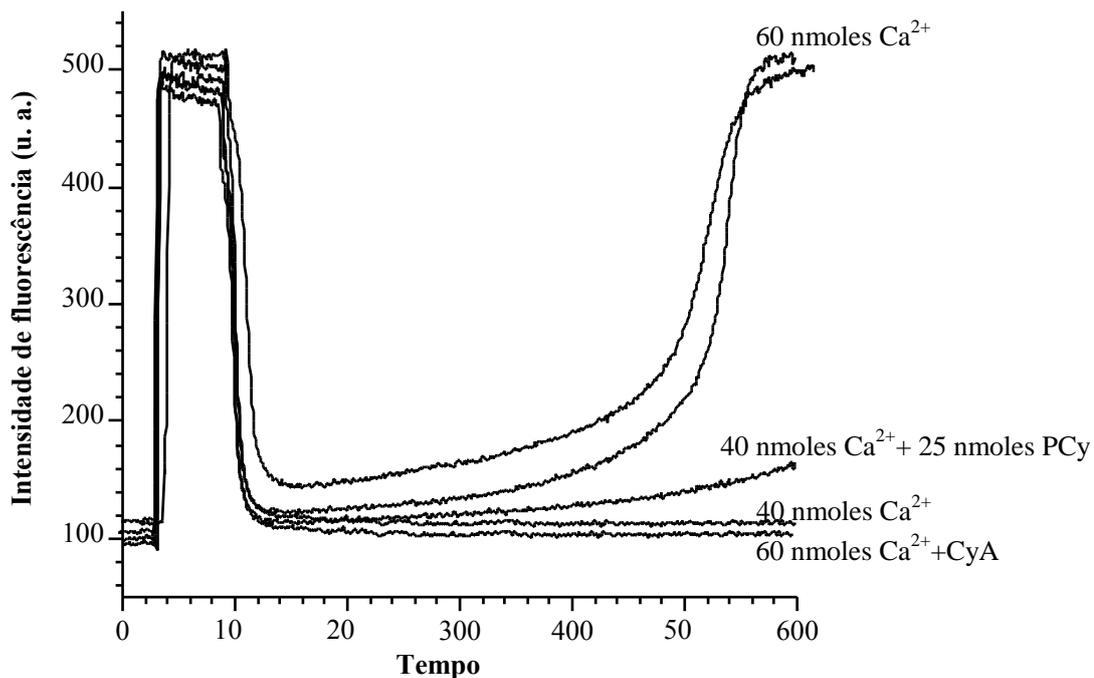


Figura 29 - Efeitos do *p*-cimeno (PCy) nos fluxos de Ca^{2+} de mitocôndrias isoladas. As suspensões mitocondriais com 0,25 mg de proteína/ml foram incubadas tal como descrito na secção Material e Métodos. O meio de reacção foi suplementado com diferentes concentrações de Ca^{2+} durante 1 minuto antes da energização mitocôndrias com succinato 5 mM. A ciclosporina A (CyA) (0,85 mM) e o *p*-cimeno foram incubados com as mitocôndrias durante 3 minutos antes da adição de Ca^{2+} . Os registos apresentados são típicos de seis ensaios independentes.

Ao contrário do observado para o *p*-cimeno, o 2-nitro-*p*-cimeno (Fig.30) aumentou a sensibilidade das mitocôndrias aos efeitos do Ca^{2+} . De facto, verificou-se que as mitocôndrias na presença de 40 nmoles Ca^{2+} /mg proteína têm capacidade para o acumular e reter no interior da mitocôndria. Quando incubadas com 25 nmoles NPCy/mg proteína na presença 40 nmoles Ca^{2+} as mitocôndrias perdem a capacidade de manter as 40 nmoles Ca^{2+} acumulado e libertam-no mais rapidamente do que as 80 nmoles Ca^{2+} /mg proteína. A pre-incubação das mitocôndrias com CyA preveniu os efeitos do NPCy, demonstrando que este composto tem uma acção indutora da PTM.

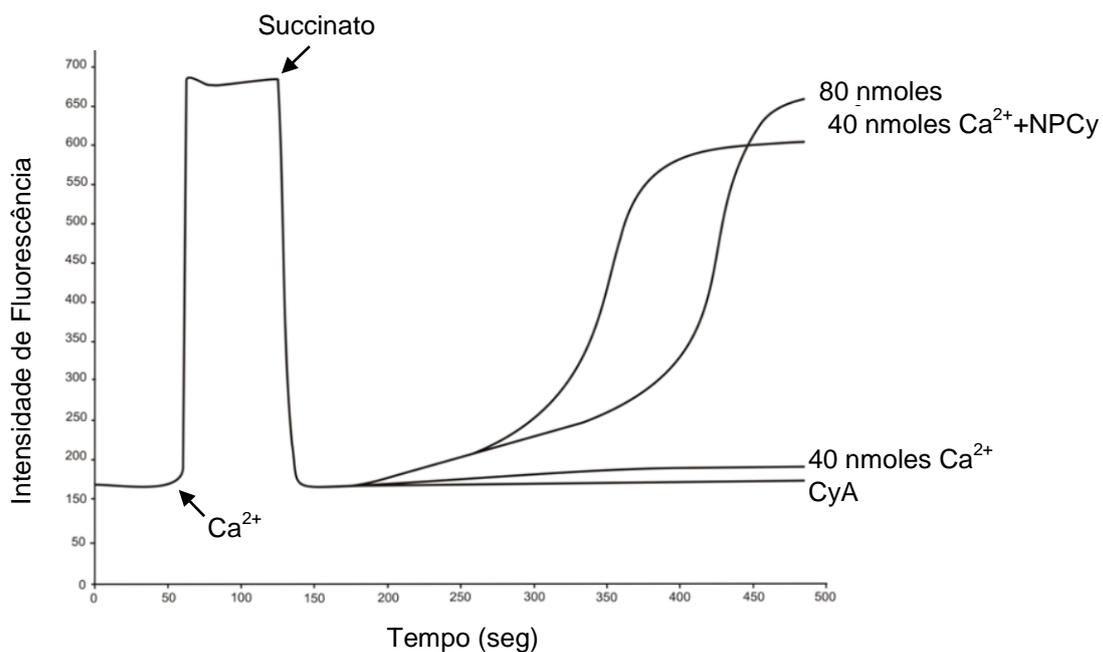


Figura 30 - Efeitos do 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) nos fluxos de Ca²⁺ de mitocôndrias isoladas. As suspensões mitocondriais (0,25 mg de proteína/ml) foram adicionadas ao meio de reação descrito na secção de Material e Métodos e suplementadas com diferentes concentrações de Ca²⁺ antes da energização com succinato 5 mM. A ciclosporina A (CyA) (0,85 mM) e o 2-nitro-*p*-cimeno (NPCy) (25 nmoles/mg de proteína) foram incubados com as mitocôndrias durante 3 minutos antes da adição de Ca²⁺. Os registos apresentados são representativos de seis ensaios independentes.

VI - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

VI – DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As terapêuticas disponíveis para o tratamento de leishmaniose humana são ainda substancialmente limitadas. O tratamento de escolha, apesar da sua toxicidade, ainda se baseia no uso de fármacos como o antimónio pentavalente, ou, alternativamente, a pentamidina e anfotericina B (Berman, 1998; Paris, et al., 2004). Considerando a toxicidade, taxa de recaídas, custo, duração do tratamento e a resistência do parasita a estes fármacos, a investigação de novas opções terapêuticas é extremamente importante e urgente.

Os óleos essenciais e/ou os seus componentes representam um grupo de moléculas potencialmente eficazes na leishmaniose como revelam estudos recentes (Rosa *et al.*, 2003; Monzote *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2009; Machado *et al.*, 2010). O *p*-cimeno, precursor do timol e carvacrol, constituintes de óleos essenciais, tem um efeito sinérgico na actividade anti-microbiana destes óleos, tornando-se relevante avaliar a sua acção leishmanicida, bem como procurar uma relação estrutura/actividade relativamente ao seu derivado sintético 2-nitro-*p*-cimeno.

Por outro lado, os monoterpenos são também usados para preservar e atribuir sabores específicos a alimentos e, conseqüentemente, os seus mecanismos inespecíficos responsáveis pela actividade antibacteriana podem originar alguns efeitos citotóxicos em células de mamíferos onde os seus efeitos colaterais estão pouco estudados.

Assim, este trabalho teve como objectivo geral avaliar os efeitos do *p*-cimeno, precursor do timol e do carvacrol, e do seu derivado sintético 2-nitro-*p*-cimeno em promastigotas de *L. infantum*, bem como esclarecer os seus efeitos sobre as funções bioenergéticas e integridade da membrana de mitocôndrias de fígado de rato.

Os efeitos do *p*-cimeno e 2-nitro-*p*-cimeno em *L. infantum* foram avaliados através de estudos de viabilidade celular e estudos morfológicos. O *p*-cimeno não alterou de forma significativa a viabilidade das promastigotas, enquanto que o 2-nitro-*p*-cimeno induziu morte celular, apresentando um valor de IC₅₀ de cerca de 145 µg/ml.

Nos estudos de morfologia, observou-se que o *p*-cimeno não induziu alterações estruturais nas células de *L. infantum*, contrariamente ao 2-nitro-*p*-cimeno que induziu alterações significativas na morfologia, tamanho e mobilidade. As células incubadas com 2-nitro-*p*-cimeno ficam arredondadas, com flagelo mais curto ou enovelado e apresentam uma redução significativa da mobilidade. Em conjunto, estes efeitos podem sugerir que os mecanismos de morte celular induzidos pelo 2-nitro-*p*-cimeno em *L. infantum* se devem a interferências na organização e funções do cito-esqueleto, alterações da permeabilidade da membrana celular provocando um intumescimento e, conseqüentemente, alteração da forma das promastigotas ou interferência na actividade bioenergética do seu megacomplexo mitocondrial.

Atendendo que a única diferença entre os dois compostos é a presença do grupo nitro no 2-nitro-*p*-cimeno e uma vez que só este é que reduz significativamente a viabilidade celular, os resultados obtidos sugerem que o grupo nitro será responsável pelas diferenças observadas nos efeitos dos compostos na viabilidade, morfologia e mobilidade celular.

O Homem pode ser parte integrante do ciclo de vida de *L. infantum* funcionando como hospedeiro/reservatório do parasita. As formas promastigotas injectadas pelo vector biológico vão infectar células do sistema imunitário diferenciando-se no seu interior em formas amastigotas. Esta infecção tem conseqüências nefastas para o hospedeiro e manifestações clínicas de várias formas e gravidade, sendo que, nas formas mais severas, a infecção por *L. infantum* pode mesmo conduzir à morte.

De forma a poder esclarecer os potenciais mecanismos de actividade biológica e dos efeitos citotóxicos do *p*-cimeno e 2-nitro-*p*-cimeno num modelo celular semelhante ao do hospedeiro e dado que as mitocôndrias funcionam com sensores da toxicidade induzida por compostos xenobióticos causadores de desregulação celular, a avaliação dos efeitos deste compostos foi também realizada na bioenergética de mitocôndrias de fígado de rato.

A partir dos resultados obtidos com este estudo, observou-se que o *p*-cimeno não afectou o estado 2 da respiração induzida por glutamato/malato, mas diminui o estado 3 e estimula o estado 4 da respiração (Fig. 20). O facto de as alterações verificadas nos estados 2 e 4 da respiração serem diferentes, sugerem que os efeitos do *p*-cimeno são dependentes do estado energético da

célula, ou seja, dos níveis de ATP existentes, e induzem perturbações na permeabilidade da membrana mitocondrial. A permeabilização da membrana a protões, como evidenciado pela estimulação do estado 4 da respiração, não deverá ser consequência da ruptura da membrana nem de alterações na interacção lípido-proteína, uma vez que este monoterpene apenas induziu um ligeiro aumento do intumescimento mitocondrial nas experiências com mitocôndrias não energizadas (Fig. 22). Corroborando esta hipótese, observou-se uma inibição da estimulação do estado 4 da respiração, nas suspensões mitocondriais incubadas com oligomicina, pois este é um inibidor da actividade da fracção Fo da ATP sintase, sugerindo que a permeabilização da membrana a protões induzida na presença do *p*-cimeno, afecta a estrutura conformacional do complexo V, ocorrendo a fuga de protões pela fracção Fo. De acordo com estas observações e na ausência de alterações significativas do volume mitocondrial, podemos sugerir que a toxicidade celular do *p*-cimeno não está relacionada com perturbações da integridade membranar, mas sim com alterações nos níveis energéticos das células

Em contraste com o que acontece o *p*-cimeno, as suspensões mitocondriais incubadas com o 2-nitro-*p*-cimeno revelam um aumento significativo dos estados 2 e 4 da respiração para concentrações de 50 e 75 nmoles/mg de proteína. Todavia, não se verifica uma diminuição, estatisticamente significativa do estado 4 da respiração na presença de oligomicina, indicativo de que o 2-nitro-*p*-cimeno não induz fuga de protões pela fracção Fo do sistema fosforilativo, ao contrário do observado para o *p*-cimeno. Por outro lado, o 2-nitro-*p*-cimeno não induz intumescimento mitocondrial significativo, indicativo de que não ocorrem perturbações na integridade membranar. Assim, estes resultados sugerem que a estimulação dos estados 2 e 4 da respiração induzida pelo 2-nitro-*p*-cimeno serão uma consequência de perturbações na permeabilidade membranar, que permitirá a fuga de protões através da membrana com consequente dissipação do potencial mitocondrial.

Os mecanismos envolvidos na inibição da capacidade de produção de energia induzidos pelo *p*-cimeno e pelo 2-nitro-*p*-cimeno poderão estar relacionados com a diminuição do $\Delta\psi$ e da taxa de fosforilação de ADP evidenciada pela diminuição do estado 3 da respiração, aumentando o tempo

necessário para a síntese de ATP (Tabela 1) e promovendo uma diminuição muito rápida nas reservas de ATP da célula. A diminuição do IRC (estado 3/estado 4) (Figs. 21 e 25) devido à inibição do estado 3 e estimulação do estado 4 da respiração, sugerem que o *p*-cimeno e o 2-nitro-*p*-cimeno poderão ter um efeito dissociador da fosforilação oxidativa. Embora para o *p*-cimeno as alterações no quociente ADP/O não sejam estatisticamente significativas (Fig. 21), no caso do 2-nitro-*p*-cimeno este parâmetro é substancialmente alterado para concentrações de 75 nmoles/mg de proteína (Fig. 25).

A fuga de prótons através da fracção Fo da ATP sintase induzida pelo *p*- através da membrana pelo 2-nitro-*p*-cimeno poderá explicar o aumento do consumo de oxigénio no estado 4 da respiração induzido por ambos os compostos, a dissipação do potencial de membrana mitocondrial e a consequente dissociação do sistema fosforilativo com perturbações na geração de força protomotriz e perda da capacidade de síntese de ATP essencial na regulação e suporte de várias funções celulares (Tabela 1).

Em conclusão, embora muitos trabalhos sobre os efeitos citotóxicos de óleos essenciais sejam atribuídos essencialmente às interações dos compostos com a membrana celular, e este mecanismo não deve ser desconsiderado, os nossos resultados sugerem que as perturbações induzidas pelo *p*-cimeno e 2-nitro-*p*-cimeno na produção de energia desempenham um papel importante nos mecanismos de toxicidade e morte celular.

Esta conclusão poderá ser reforçada pelo facto do *p*-cimeno afectar significativamente a bioenergética mitocondrial não apresentando, no entanto, efeitos inibidores na viabilidade celular dos promastigotas de *L. infantum*, contrariamente ao observado com o 2-nitro-*p*-cimeno. De facto, sendo o *p*-cimeno uma molécula altamente hidrofóbica, poderá ter dificuldade em incorporar e atravessar a membrana citoplasmática de *L. infantum*, não atingindo o megacomplexo mitocondrial e, consequentemente, não induzir perturbações energéticas que possam conduzir à morte da célula. Pelo contrário, o 2-nitro-*p*-cimeno, que tem um carácter anfipático conferido pelo grupo nitro ligado ao anel benzénico, terá maior facilidade em atravessar a membrana e atingir o mega complexo mitocondrial, podendo induzir alterações bioenergéticas que activem mecanismos de morte celular.

VII - BIBLIOGRAFIA

VII - BIBLIOGRAFIA

Alvar J Aparício P Aseffa A Boer MD Cañavate C e tal The Relationship between Leishmaniasis and Aids: the Second 10 Years *Clin Microb Rev*, 334-359, 2008

Ashford RW Leishmaniasis reservoirs and their significance in control..*Clin Dermatol*.14(5):523-32. Review Sep-Oct 1996

Bakkali F A Averbeck D & Idaomar M Biological effects of essential oils-a review. *Food Chem Toxicol* 46(2) pp 446-75, 2008

Barral-Neto M Carvalho EM Johnson WD Jr Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44:536–546, 1991

Bates PA Housekeeping by *Leishmania*. *Trends Parasitol* 22(10):447-8.Review. 2006

Berman JD Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*; 24: 684–703, 1997

Berman J Chemotherapy of leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. *Curr Opin Infect Dis* Vol. 11(6). - pp. 707-10, 1998

Bernardi P Colonna R Costantini P Eriksson O Fontaine E Ichas F, Massari S, Nicolli A Petronilli V Scorrano L The mitochondrial permeability transition. *Biofactors*. 8(3-4):273-81. Review, 1998

Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review, 2004

Edris A Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 21(4) pp 308-23. 2007.

Cardoso L, Santos H, Cordeiro-da-Silva A, Pratlong F, Dedet JP, Rodrigues M. *Leishmania infantum* MON-98: infection in a dog from Alto Douro, Portugal. *Acta Trop.*;83(1):83- 5 2002

Chan-Bacab M and Peña-Rodríguez L Plant natural products with leishmanicidal activity, *The Royal Society of Chemistry, Nat. Prod. Rep*, 18, 674–68, 20018

Chang KP Leishmaniasis. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2005

Cristani M D'Arrigo M Mandalari G Castelli F Sarpietro MG Micieli D Venuti V Bisignano G Saija A Trombetta D Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity *J Agric Food Chem* 2007

Colell A García-Ruiz C Mari M Fernández-Checa JC Mitochondrial permeability transition induced by reactive oxygen species is independent of cholesterol-regulated membrane fluidity. *FEBS Lett.* Feb 27;560(1-3):63-8, 2004

Croft SL and Coombs GH Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Review, *Trends in Parasitology*, vol 19 502-508, 2003

Custódio JBA Cardoso C Santos M Almeida L Vicente JAF Fernandes MAS Cisplatin impairs rat liver mitochondrial functions by inducing changes on membrane ion permeability: Prevention by thiol group protecting agents. *Toxicology Elsevier* 259, 18-24, 2009

Custódio J Palmeira C Moreno A and Wallace K Acrylic acid induces the glutathione-Independent mitochondrial permeability transition in vitro *Toxicological Sciences* 43, 19-27, 1998

Custódio JBA Moreno AJM & Wallace KB Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca²⁺ and inorganic phosphate, *Toxicol Appl Pharmacol* 152, 10-17, 1998a

Daniel NN Korsmeyer SJ Cell death: critical control points. *Cell*. 23;116(2):205-19. Review. 2004

Daugas E Nochy D Ravagnan L Loeffler M Susin SA Zamzami N Kroemer G Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis..*FEBS Lett*. Jul 7;476(3):118-23. Review, 2000.

Dedet JP Pratlong F Lanotte G Ravel C Cutaneous leishmaniasis. The parasite. *Clin Dermatol*;17(3):261-8. Review 1999

Denizot F Lang R Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*. 22; 89(2):271-7 1986

Desagher S and Martinou JC Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol* 10, 369-377, 2000

Desjeux P The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine Hygiene* 95, 239-243, 2001

Jacobson J Duchen MR Interplay between mitochondria and cellular calcium signalling. *Mol Cell Biochem*. Jan-Feb;256-257(1-2):209-18. Review, 2004

Fumarola C Guidotti GG Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis*. Jan;9(1):77-82, 2004.

Gornall A.G Bardawill CJ David MM Determination of serum proteins by means of the biuret reaction *J. Biol. Chem*177 (2): 751, 1949

Grimaldi G Jr Mc-Mahon-Pratt D Sun T Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol* 2:73–118, 1991

Gutierrez J Barry-Ryan C & Bourke P The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *Int J Food Microbiol* 124(1) pp 91-7, 2008

Halestrap AP McStay GP Clarke SJ The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie*. Feb-Mar;84(2-3):153-66. Review, 2002

Hemaiswarya S. Kruthiventi A. & Doble M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15(8) pp 639-52, 2008

Herwaldt B Leishmaniasis. *The Lancet* vol 354 1191-1199, 1999

Hiroto K Gomez E Cáceres AG Uezato H Mimori T Hashiguchi Molecular Epidemiology for Vector Research on Leishmaniasis. Review *Int J Environ Res Public Health*, 7, 814-826 2010

Ho JL Badaro R Hatzigeorgiou D Reed SG Johnson WD Cytokines in the treatment of leishmaniasis: from studies of immunopathology to patient therapy. *Biotherapy*, 7: 223–35, 1994

Lambert RJ Skandamis PN Coote PJ Nychas GJ A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. Sep;91(3):453-62 2001

Lemasters JJ Qian T Bradham CA Brenner DA Cascio WE Trost LC Nishimura Y Nieminen AL Herman B Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of necrotic and apoptotic cell death. *J Bioenerg Biomembr*. Aug;31(4):305-19. Review, 1999

Lesnefsky EJ Moghaddas S Tandler B Kerner J Hoppel CL Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* Jun;33(6):1065-89. Review. 2001

Liew FY O'Donnell CA Immunology of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 32:161–259, 1993

Loeffler M, Kroemer G The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita...*Exp Cell Res.* Apr 10;256(1):19-26. Review, 2000

Malekpour M Estefandbod M Images in clinical medicine. Cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med* 2010

Malhi H Gores GJ Lemasters JJ Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology.* Feb;43(2 Suppl 1):S31-44. Review, 2006

Mannella C.A Our changing views of mitochondria, *J Bioenerg Biomembr* 32, 1-4, 2000

Mannella CA Pfeiffer DR Bradshaw PC Moraru II Slepchenko B Loew LM Hsieh CE Buttle K Marko M. Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life.* Sep-Nov;52(3-5):93-100. 2001

Marques N Cabral S Sá R Coelho F Oliveira J Saraica da Cunha JG Meliço-Silvestre A Leishmaniose visceral e infecção por vírus da imunodeficiência humana – Na era terapêutica antiretroviral de alta eficácia. *Acta Med Port* 20, 291-298, 2007

Monzote L Garcia M Montalvo A.M Scull R Miranda M Abreu J. In Vitro activity of an essential oil against *Leishmania donovani*. *Phytotherapy Research* 21, 1055-1058, 2007

Moreno J Alvar J Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol* 18, 399-405, 2002

Monteiro P Oliveira PJ Gonçalves L Providência LA Mitochondria: role in ischemia, reperfusion and cell death. *Rev Port Cardiol* ;22(2):233-54.2003

Mosmann T (December 1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65 (1-2): 55–63.

Oliveira V C et al Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi*. promastigotes *Parasitol Res.* Vol. 104(5). - pp. 1053-9, 2009

Orrenius S Zhivotovsky B Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Jul;4(7):552-65. Review,2003.

Paris C et al. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* Vol. 48(3). - pp. 852-9, 2004

Pace D Williams TN Grochowska A Betts A Attard-Montalto S Boffa MS Vella C Manifestations of Pediatric *Leishmania infantum* infections in Malta. *Travel Med Infect Dis*, 37-46, 2011

Parone PA James D Martinou JC Mitochondria: regulating the inevitable..*Biochimie* Feb-Mar;84(2-3):105-11. Review, 2002

Pedersen PL Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview.*J Bioenerg Biomembr.* Aug;31(4):291-304. Review, 1999.

Pinho R Rodrigues C Castro H Leishmaniasis treatment- a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103:1-10, 2008

Rodrigues OR Marques C Soares-Clemente M Ferronha MH Santos-Gomes GM. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. *Immunobiology* 214, 101-11, 2009.

Rosa M D S et al Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrob Agents Chemotherapy* Vol. 47. - pp. 1895–1901 2003

Santos D, Coutinho C, Madeira M, Bottino C, Vieira R, Nascimento S, Bernardino A, Bourguignon S, Corte-Real S, Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res.* 103(1):1-10 Jun 2008

Saris NE Carafoli E A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria *Biochemistry (Mosc)*. Feb;70(2):187-94, 2005

Sakurada T Kuwahata H Katsuyama S Komatsu T Morrone L Corasaniti M et al. Intraplantar injection of bergamot essential oil into the mouse hindpaw: effects on capsaicin-induced nociceptive behaviors. *Int Rev Neurobiol* 85 pp. 237-48 2009

Shapira R Mimran E Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants exhibiting altered response to thymol *Microb Drug Resist.* Fall;13(3):157-65, 2007

Sundar S Singh VP Sharma S Makharia MK, Murray HW Response to interferon- γ plus pentavalent antimony in Indian visceral leishmaniasis *J Infect Dis*; 176: 1117–19, 1997

Szewczyk A and Wojtczak L Mitochondria as a pharmacological target, *Pharmacol Rev* 54, 101-127, 2002

Ueda-Nakamura T Attias M de Souza W Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. *Parasitol Res* 87, 89-97, 2001

Vardar-Unlü G Candan F Sökmen A Daferera D Polissiou M Sökmen M Dönmez E Tepe BJ Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). *Agric Food Chem.*1;51(1):63-7 2003

Valdés-Reyes L Argueta J Morán J Salaiza N, Hernández J Berzunza M Aguirre-García M Becker I, and Gutiérrez-Kobeh L *Leishmania mexicana*: Inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Experimental parasitology* 121(3):199-207, 2009

Veldhuizen E Tjeerdsma-Van Bokhoven J Zweijtzer C Burt S Haagsman H Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol, 2006

Wallace DG. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Ann Rev Genetics* 39, 359–407, 2005

Zoratti M Szabò I De Marchi U Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta.* Jan 7;1706(1-2):40-52. Review. 2005