

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**FIOCRUZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CHALCONAS E ESCANDENINA SOBRE  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis***

**TEREZA CRISTINA SOARES CAMPELO BRANDÃO**

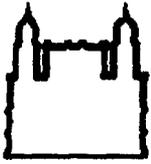
**Salvador - Bahia - Brasil**

972



004058

**2009**



FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM  
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

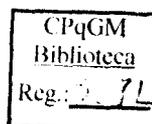
**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE CHALCONAS E  
ESCANDENINA SOBRE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.)  
amazonensis***

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação em Biotecnologia em Saúde e  
Medicina Investigativa para obtenção do grau  
de Mestre

**TEREZA CRISTINA SOARES CAMPELO BRANDÃO  
ORIENTADOR: Dr. MARCOS ANDRÉ VANNIER DOS SANTOS**

**Salvador - Bahia – Brasil  
2009**



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

B817a Brandão, Tereza Cristina Soares Campelo  
Avaliação biológica de chalconas e escandenina sobre promastigotas de  
*Leishmania (L.) amazonensis* [manuscrito] / Tereza Cristina Soares Campelo  
Brandão. - 2009.  
79 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas  
Gonçalo Moniz, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de  
Biomorfologia Parasitária.

1. *Leishmania Amazonensis*. 2. Produtos Naturais. 3. Chalconas. I.Título.

CDU 616.993.161: 547.972

21/11/11

616.993.161:547.972

004053

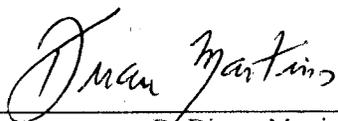
004053

“Avaliação Biológica de Chalconas e Escandenina sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis*”

TEREZA CRISTINA SOARES CAMPELLO BRANDÃO

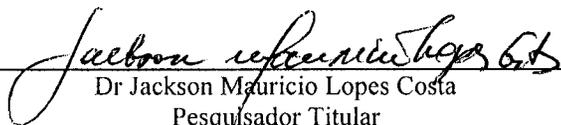
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr Dirceu Martins  
Professor Associado  
UFBA



---

Dr Jackson Mauricio Lopes Costa  
Pesquisador Titular  
CPqGM / FIOCRUZ

**“Valeu a pena? Tudo vale a pena  
Se a alma não é pequena  
Quem quer passar além do Bojador  
Tem que passar além da dor.  
Deus, ao mar, o perigo e o abismo deu,  
Mas nele é que espelhou o céu.”**

**Fernando Pessoa**

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus por estar ao meu lado em todos os momentos difíceis da minha vida. Com certeza, se não fosse a minha fé eu não venceria todos os obstáculos.

Aos meus pais, José Luiz Brandão e Terezinha Maria Soares, pela confiança, dedicação que sempre tiveram em mim. Obrigada pelo sacrifício e trabalho de toda uma vida para que eu pudesse estudar e me formar. Sem a base que vocês me deram eu não poderia chegar até aqui.

Ao meu irmão Emerson Luiz, por ser o meu melhor amigo, companheiro e conselheiro. Nunca vou me esquecer dos momentos alegres e tristes que passamos juntos.

Ao meu Marido, Roney, pelo incentivo, amor, carinho, paciência por compreender as minhas ausências em alguns finais de semana para a realização de experimentos no laboratório. Você, meus pais e meu irmão são as pessoas mais importantes da minha vida. Eu amo todos vocês...

Ao meu Orientador Doutor Marcos André Vannier, que sempre me incentivou a fazer ciência com muita paciência e empolgação. Sempre compartilhando com todos os seus alunos, seu grandioso conhecimento. Quero agradecer a oportunidade de realizar este trabalho e conhecer melhor o mundo acadêmico.

À Adriana, pela dedicação, simpatia nos momentos mais difíceis dentro do laboratório. Obrigada pela sua ajuda e dicas sobre o meu trabalho.

À minha amiga Eliomara Alves, pessoa muito especial, importante em minha vida. Maroca, você foi um anjo que Deus colocou ao meu lado para me ajudar nos momentos mais difíceis. Obrigada pela amizade, dedicação que sempre teve comigo.

À minha amiga irmã, Consuelo pelo companheirismo, amizade, valiosos conselhos e palavras de incentivo.

À Karla Graziela, muito simpática, um ser humano fantástico... Sempre disposta a ajudar. Obrigada pela amizade, conte sempre comigo.

À Diego, por ter guiado os meus caminhos em direção a FIOCRUZ, onde conquistei muitos amigos e adquiri conhecimentos importantes para toda a minha vida.

À Ana Márcia pela parceria e companheirismo durante as aulas das disciplinas do Mestrado. Ufa! Sofremos, mas conseguimos.

À Vanessa pela simpatia e pelas risadas na hora do cafezinho na copa.

À Lurdes e Daniel que tornaram um sonho realidade com a doação dos fármacos pra que este trabalho fosse realizado.

À Dani, Claudinho e Rafael Gomes, pelos conselhos e apoio dado nos momentos de desânimo. Adorei conhecer vocês.

À todas as pessoas do Laboratório de Biomorfologia Parasitária (LBP), pelo companheirismo, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Ebenezer, Ciro, Eliete, Rafael Costa, Gustavo, Tayane, Samanta, Ana Lucia, Elis e Elizabete. Obrigada por tudo. Apesar de estas duas últimas pessoas estarem ausentes no laboratório, atualmente, contribuíram bastante com palavras de incentivo e apoio no início da minha jornada acadêmica.

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>  | <b>10</b> |
| 1.1 As leishmanioses.....  | 10        |
| 1.2 Manifestações clínicas.....  | 11        |
| 1.3 O parasito.....  | 15        |
| 1.4 Ciclo biológico.....   | 18        |
| 1.5 Quimioterapia da leishmaniose.....   | 21        |
| 1.5.1. Antimoniais.....  | 21        |
| 1.5.2. Anfotericina B.....   | 23        |
| 1.5.3. Paramomicina (aminosidina).....   | 24        |
| 1.5.4. Pentamidina.....  | 24        |
| 1.5.5- Miltefosina e alquilfosfolipídeos.....                                    | 25        |
| 1.5.6. Alopurinol.....   | 26        |
| 1.5.7. Antifúngicos.....   | 27        |
| 1.5.8. Azitromicina.....   | 28        |
| 1.5.9. Diamino-difenil-sulfona (Dapsona ®).....                                  | 28        |
| 1.6. Produtos naturais.....  | 29        |
| 1.7. Chalconas.....  | 31        |
| 1.8. Escandenina.....  | 34        |
| <br>   |           |
| <b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>   | <b>36</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>3.1. OBJETIVO GERAL.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>   | <b>37</b> |
| <br>   |           |
| <b>4. METODOLOGIA.....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1. Animais.....  | 38        |
| 4.2. Obtenção de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .... | 38        |
| 4.3. Medidas de proliferação celular.....  | 38        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos.....   | 38        |
| 4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....   | 39        |
| 4.6 Microscopia eletrônica de varredura.....  | 39        |
| 4.7 Análise estatística.....  | 40        |
| <b>5. RESULTADOS .....</b>  | <b>41</b> |
| 5.1. <i>Screening</i> dos Fitofármacos.....   | 41        |
| 5.2. Efeito inibitório de Chalconas e Escandenina na proliferação<br>de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> .....     | 42        |
| 5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos <i>in vitro</i> .....  | 46        |
| 5.4. Avaliação ultraestrutural dos efeitos das drogas Escandenina<br>e Chalcona através da Microscopia de Varredura.....              | 50        |
| 5.5. Avaliação ultraestrutural dos efeitos das drogas Escandenina<br>e Chalcona através da Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 55        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>60</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>   | <b>66</b> |
| <b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>67</b> |

## RESUMO

As drogas de escolha para o tratamento atual das leishmanioses, os antimoniais, tem-se demonstrado ineficazes, pela difícil administração, muitos efeitos colaterais e relatos de resistência. Por estas razões muitos laboratórios de pesquisa têm testado extratos de plantas e substâncias isoladas com a finalidade de encontrar novos agentes leishmanicidas, com menores efeitos colaterais e baixo custo. Este trabalho teve como objetivo avaliar a ação biológica de produtos naturais sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Inicialmente, foi realizado um “screening” para cálculo do  $IC_{50}$  com 5 fármacos (chalconas, flavona, flavanona e escandenina). Os fármacos chalcona I (2', 6'-diidroxí-3'5'-dimetil-4'-metoxichalcona), chalcona II (2', 6'-diidroxí-3'-metil-4'-metoxichalcona) e escandenina mostraram-se mais eficientes na inibição da proliferação celular na concentração de 50  $\mu$ M. Estes mesmos compostos apresentaram valores de  $IC_{50}$  de 8,6  $\mu$ M (chalcona I), 22  $\mu$ M (chalcona II) e 5,5  $\mu$ M (escandenina). Nos experimentos de dose-resposta a chalcona I foi mais eficaz em relação à chalcona II na concentração de 25  $\mu$ M apresentando inibições de 89% e 55,6%, respectivamente. A escandenina promoveu a inibição da proliferação do protozoário superior a 60% na concentração de 7,5  $\mu$ M. A escandenina e as chalconas I e II não apresentaram efeito citotóxico, exceto em concentrações superiores a 300  $\mu$ M (chalcona I), 39  $\mu$ M (chalcona II) e 150  $\mu$ M (escandenina). Apesar disso, o valor de  $IC_{50}$  encontrado para promastigotas de *Leishmania* está bem abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nas células de mamíferos. A microscopia eletrônica de transmissão mostrou modificações ultraestruturais com comprometimento da mitocôndria, alteração do retículo endoplasmático e erros na divisão celular. A microscopia eletrônica de varredura mostrou alterações na morfologia dos parasitos com marcada corrugação de superfície, perda de conteúdo citoplasmático e desorganização da arquitetura celular. Os resultados mostraram que estes fármacos podem prover novas perspectivas no tratamento das leishmanioses.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*, produtos naturais, chalconas, escandenina.

## ABSTRACT

The drugs of choice for the current treatment of the leishmaniasis, the antimonials, have been demonstrated ineffective, for the difficult administration, many side effects and reports of resistance. For these reasons many research laboratories it is testing plant extracts and substances isolated aiming to identify new agents leishmanicidal, with less side effects and low cost. This study aimed to evaluate the biological action of natural products against promastigotes of *Leishmania (L.) amazonensis*. Initially, a screening was carried out for calculation of the IC<sub>50</sub> with drugs chalcones, flavone flavanone and escandenine. The compound chalcone I (2', 6 dihydroxy '-dihydroxy-3' 5 dimethyl '-dimethyl- 4 '-methoxychalcona), chalcone II (2', 6 dihydroxy '-dihydroxy-5 methyl '-methyl- 4 '-methoxychalcona) and escandenine appeared more efficient in the inhibition of the cellular proliferation in the concentration of 50 µM. These compounds presented values of IC<sub>50</sub> of 8,6 µM (chalcone I), 22 µM (chalcone II) and 5,5 µM (escandenine). In the experiments of dose-response the chalcone I was more efficient on compared to chalcone II in the concentration of 25 µM presenting inhibition of 89% and 55,6%, respectively. The escandenine promoted proliferation inhibition of the protozoan top to 60% in the concentration of 7,5 µM. Escandenine and chalcones did not present cytotoxic effect, except in concentracions higher than 300 µM (chalcone I), 39 µM (chalcone II) and 150 µM escandenine. Nevertheless, the value of IC<sub>50</sub> found for *Leishmania* promastigotes were much lower than the levels that they cause cytotoxicity in the mammalian cells. The transmission electron microscopy showed ultrastructural modifications with compromising of the mitochondria, endoplasmic reticulum. The scanning electron microscopy showed alterations in the morphology loss of cytoplasmic content of the parasites with marked alteration of surface and disorganization of the cellular architecture. The results show that these compounds may present as new perspectives in the leishmanicidal therapy.

Keywords: *Leishmania (L.) amazonensis*, natural products, chalcones, escandenine.

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |  |
|-------------------|--|
| DC1               | Chalcona I                                 |
| DC2               | Chalcona II                                |
| DMC               | 2,6-dihydroxi-4-methoxi chalcona           |
| DNA               | Ácido desoxirribonucléico                  |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido                           |
| FRD               | Enzima fumarato redutase                   |
| kDNA              | DNA do cinetoplasto                        |
| [ <sup>3</sup> H] | Timidina tritiada                          |
| HIV               | Vírus da imunodeficiência humana adquirida |
| IC <sub>50</sub>  | Concentração inibitória de 50%             |
| LC                | Leishmaniose cutânea                       |
| LCD               | Leishmaniose cutânea difusa                |
| LDPC              | Leishmaniose dérmica pós calazar.          |
| LMC               | Leishmaniose mucocutânea                   |
| LTA               | Leishmaniose tegumentar americana          |
| LV                | Leishmaniose visceral                      |
| PBS               | Salina tamponada com fosfato               |
| SIDA              | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida     |

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um importante problema de saúde pública não só por sua magnitude, sobretudo por sua baixa vulnerabilidade às medidas de controle. Considerada uma doença endêmica em vários países e apresenta amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas até infecções viscerais. A negligência com que é tratada pode ser resumida, principalmente aos poucos investimentos destinados às pesquisas para a descoberta de novos fármacos (Ahluwalia *et al.*, 2003).

Estima-se que 12-13 milhões de pessoas estejam infectadas com 400.000 novos casos a cada ano e com uma mortalidade anual em torno de 60.000 (OMS, 2005) e que cerca de 10% da população mundial encontre-se sob o risco de contrair leishmaniose (Desjeux, 2004). Esta doença é mundialmente conhecida, encontrando-se amplamente distribuída em quatro continentes, sendo de grande incidência em países em desenvolvimento como o Brasil, onde mais de 30 mil novos casos são registrados anualmente, sobretudo em suas regiões mais pobres como as do Norte e Nordeste. No Brasil a taxa de incidência da leishmaniose tegumentar americana e leishmaniose visceral foram de 14,12 e 1,89 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (BRASIL, 2005).

Na Bahia, em 2005, o coeficiente de detecção da Leishmaniose tegumentar (LT) americana e leishmaniose visceral (LV) foram de 14,12 e 3,25 casos por 100.000 habitantes, respectivamente (BRASIL, 2005). Vale salientar que alguns municípios (Feira de Santana, Jacobina e Irecê), bem como a região da Chapada Diamantina e algumas áreas litorâneas a exemplo da Costa do Sauípe, onde verdadeiros complexos turísticos são erguidos, já começam a apresentar numerosos casos da doença.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2006), a leishmaniose era considerada uma doença de zona rural, porém os padrões de transmissão, muitas vezes relacionados à penetração do homem em focos silvestres para atividades agrícolas, extrativistas, recreativas vêm contribuindo para o aumento no número de casos, principalmente de EV tanto no Brasil como em outros países da América do Sul.

## 1.2. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da doença dependem de inúmeros fatores como, por exemplo, condições imunológicas do hospedeiro e o grau de virulência do parasito (Sundar, 2001). A leishmaniose é tradicionalmente dividida em três formas principais: cutânea (LC), mucocutânea (LMC) e visceral (LV). Contudo, Ashford (2000), apresenta a leishmaniose cutânea difusa (LCD) e a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) como formas variantes de manifestações da doença.

É importante ressaltar que uma única espécie do parasito é capaz de causar diferentes manifestações clínicas, como verificado na tabela 1 e que a incidência da doença vem crescendo por estar relacionada com pacientes portadores da Síndrome da Imuno-deficiência Adquirida-SIDA (Alvar *et al.*, 1997; Portigo *et al.*, 1997), além disso com a disseminação da SIDA, a LV tem aumentado sua prevalência (Olivier *et al.*, 2003; Paredes *et al.*, 2003).

A LC, causada geralmente por *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica*, no velho mundo e *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana* e *L. (V.) braziliensis* no novo mundo. É a forma mais encontrada da doença, sendo caracterizada por lesões ulcerosas, nodulares, geralmente indolores que podem ser únicas ou múltiplas formadas no local da hematofagia do inseto infectado (Hepburn, 2000).

A LCD é um tipo de leishmaniose geralmente restrito à Venezuela, República Dominicana, Etiópia, Quênia e Brasil e tem como agente etiológico a *L. (L.) pifanoi*, na Venezuela e a *L. (L.) amazonensis* no Brasil. Ela é caracterizada pelo aparecimento de nódulos não ulcerados disseminados por grandes extensões dérmicas do corpo. Os nódulos são constituídos majoritariamente por macrófagos vacuolizados, não havendo ativação celular e as infecções respondem pouco ou nada à quimioterapia usual (Walton, 1989).

A LMC, geralmente causada por *L. (V.) braziliensis*, caracteriza-se pelo aparecimento de lesões metastáticas nas mucosas, podendo causar desfiguração por ulceração progressiva, especialmente na região naso-buco-faríngea (Lainson & Shaw, 1972).

A LV, também denominada “Kala-azar” ou “febre negra”, tem como agentes etiológicos *L. (L.) infantum* e *L. (L.) donovani* na Europa e Ásia e *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* no Brasil. É caracterizada por febres irregulares tendo, muitas vezes,

dois picos diários, perda de peso, hepato-esplenomegalia e anemia com altas taxas de mortalidade em indivíduos não tratados. O estado nutricional do paciente é muito importante, pois a desnutrição pode suprimir a resposta imune celular, predispondo ao desenvolvimento da infecção (Pearson & Souza, 1996).

A forma variante de LV a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) pode aparecer no período de até dois anos após a cura completa da leishmaniose visceral. Aparece como nódulos ou pápulas hipopigmentados na pele e, usualmente, é curada com tratamento adequado (Grimaldi & McMahon-Pratt, 1991; Barral *et al.*, 1991).

Tabela 1: Manifestações clínicas da leishmaniose e sua distribuição geográfica.

| Manifestações clínicas  | Espécies  | Localização   |
|---|---|---|
| <b>Leishmaniose visceral</b>  |   |   |
| Cala-azar:<br>envolvimento<br>generalizado do<br>sistema reticulo-<br>endotelial (baço,<br>medula óssea e fígado) | <i>L. (L.) donovani</i><br><i>L. (L.) infantum</i> **<br><i>L. (L.) donovani (archibaldi)</i><br><i>L. (L.) chagasi</i> **<br><i>L. (L.) amazonensis</i> *  | Índia, China, Paquistão e Nepal<br>litoral mediterrâneo, Balcãs, Ásia,<br>China, Norte da África (Saara)<br>Sudão, Quênia, Etiópia,<br>Quênia, Etiópia, Somália<br>Brasil<br>Israel, Índia, Arábia Saudita<br>(tropas americanas)   |
| <b>Leishmaniose cutânea do Velho Mundo</b>  |   |   |
| Lesões cutâneas<br>únicas ou em pequeno<br>número   | <i>L. (L.) major</i><br><i>L. (L.) tropica</i><br><i>L. (L.) aethiopica</i><br><i>L. (L.) chagasi</i><br><i>L. (L.) donovani</i>  | China, Índia, Paquistão<br>litoral mediterrâneo, Índia<br>Etiópia, Quênia, Iêmen<br>litoral mediterrâneo<br>Sudão e leste da África<br>Quênia, Etiópia, Somália   |
| leishmaniose cutânea<br>difusa  | <i>L. (L.) aethiopica</i>   | Etiópia, Quênia, Iêmen, Senegal<br>e Argélia  |
| <b>Leishmaniose cutânea do Novo Mundo</b>   |   |   |
| Lesões cutâneas<br>únicas ou em pequeno<br>número   | <i>L. (L.) mexicana</i> (úlceras de<br>chiclero)<br><br><i>L. (L.) amazonensis</i><br><br><i>L. (L.) pifanoi</i><br><br><i>L. (V.) braziliensis</i><br><br><i>L. (V.) guyanensis</i><br><br><i>L. (V.) peruviana</i> (uta)<br><br><i>L. (V.) panamensis</i> | Belize, Guatemala, Honduras e<br>Costa Rica, México e Texas<br>(EUA)<br><br>Brasil (especialmente regiões<br>Norte e Nordeste), Bolívia,<br>Colômbia, Paraguai, Guiana<br>Francesa<br>Venezuela, México<br><br>Argentina, Bolívia, Brasil,<br>Colômbia, Equador, Guiana<br>Francesa, Paraguai, Peru,<br>Venezuela, Belize, Guatemala,<br>Honduras, Nicarágua, Panamá,<br>Suriname<br><br>Guiana, Suriname, Brasil (Norte)<br><br>Peru (Andes), Argentina<br><br>Panamá, Costa Rica, Equador,<br>Venezuela, Colômbia, Nicarágua,<br>Honduras<br>Venezuela (Andes)<br>Venezuela |

|                                    |  |  |
|------------------------------------|--|--|
|                                    | <i>L. (V.) garnhami</i><br><i>L. (V.) venezuelensis</i><br><i>L. (V.) colombiensis</i><br><i>L. (V.) lainsoni</i><br><i>L. (V.) shawi</i><br><i>L. (V.) naiffi</i><br><i>L. (L.) chagasi</i> | Colômbia, Venezuela e Panamá<br>Brasil (bacia Amazônica)<br>Brasil (Norte)<br>Brasil (Amazonas e Pará) |
| <b>Leishmaniose cutânea difusa</b> | <i>L. (L.) amazonensis</i><br><i>L. (L.) pifanoi</i><br><i>L. (L.) mexicana</i>  | Brasil (regiões Norte, Nordeste e sudeste)<br>Venezuela<br>México e República Dominicana               |
| <b>Leishmaniose mucocutânea</b>    | <i>L. (V.) braziliensis</i><br>(espundia)  | Brasil   |

Adaptado de Pearson & Sousa, 1996.

\* Casos de leishmaniose visceral por *L. (L.) amazonensis* só foram diagnosticados no estado da Bahia, Brasil (Barral *et al.*, 1991); (*L.*) = subgênero *Leishmania*; (*V.*) = subgênero *Viannia*; (?) espécie não identificada.

\*\* Alguns autores (Feliciangeli *et al.*, 2005, Campos-Ponce *et al.*, 2005 consideram sinonímia).

### 1.3.O PARASITO

A leishmaniose pode ser causada por diversas espécies de protozoários digenéticos, da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, pertencente ao gênero *Leishmania*. Segundo Cupolillo (2000) existem mais de 30 espécies de *Leishmania* que podem ser classificadas de acordo com o local de surgimento da doença.

Os parasitos precisam de dois hospedeiros para completar o seu ciclo de vida. No hospedeiro invertebrado, inseto díptero, dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo).

A forma promastigota (Figura 1A) pode se apresentar em diversos morfotipos distintos (Bates, 1994). Apresentam de 12 a 20  $\mu\text{m}$  de comprimento, formato alongado e um longo flagelo anterior, com estrutura habitual de nove pares de microtúbulos dispostos em ciclo com um par central que emerge da bolsa flagelar (Vannier-Santos *et al.*, 2002). Promastigotas sofrem intensa diferenciação celular denominado metaciclogênese que resulta no desenvolvimento de uma forma não proliferativa, altamente infectiva, denominada promastigota metacíclico (Sacks, 1989; Vannier-Santos *et al.*, 2002). Esta forma apresenta um longo flagelo, corpo celular pequeno e delgado.

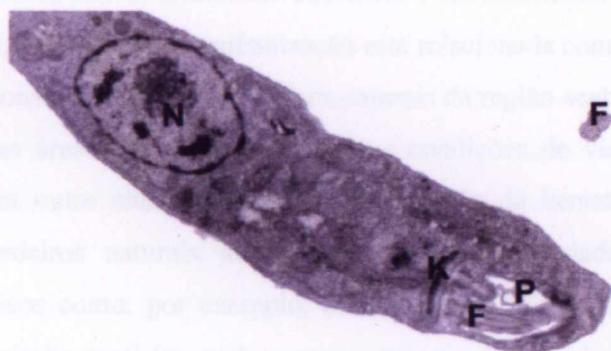
A forma amastigota (Figura 1B) possui uma forma oval com 2 a 4  $\mu\text{m}$  de comprimento, flagelo curto que não chega a exteriorizar-se da bolsa flagelar, portanto imóveis. Esta forma é responsável pela manutenção e desenvolvimento da doença, já que utiliza o sistema fagocítico mononuclear de mamíferos para se multiplicar.

As espécies de *Leishmania* são morfologicamente semelhantes, embora capazes de provocar quadros clínicos bastante distintos (Chang *et al.*, 1999). São seres eucariontes, apresentando um envelope nuclear que delimita seu material genético do citoplasma e apresentam um sistema de endomembranas (retículos endoplasmáticos, complexo de Golgi, lisossomos) que desempenham funções diversificadas. Logo abaixo de sua membrana, os parasitos apresentam uma camada organizada de microtúbulos subpeliculares, que se estende por todo o corpo e termina próximo da bolsa flagelar, onde se encontram apenas quatro microtúbulos que participam do transporte de vesículas em um mecanismo endocítico e exocítico (Chang, 1983). Apresentam o acidocalciossoma, organelas membranosas, esféricas e acídica que está envolvida no controle do pH e osmorregulação do parasito e no armazenamento de cálcio o qual está envolvido nos mecanismos de sinalização. Além do cálcio armazena também outros

elementos como o fósforo, magnésio, cloro, potássio e enxofre (Docampo & Moreno, 1999; 2001). Estes protozoários apresentam uma única mitocôndria, que se estende por todo o corpo celular, a qual contém uma condensação de DNA (kDNA), localizada próxima a base do flagelo, denominada cinetoplasto (Revisto em Vannier-Santos *et al.*, 2002; Chang 1983).

## LA CICLO BIOLÓGICO

(A)



(B)



**Figura 1. Microscopia eletrônica de transmissão das formas evolutivas de *Leishmania*.** **A:** forma promastigota onde se observa um longo flagelo (F) emergindo da bolsa flagelar (P), núcleo (N) e o cinetoplasto (K). **B:** a forma amastigota dentro do macrófago (B) onde se observa um pequeno flagelo (F) dentro da bolsa flagelar, cinetoplasto (K), núcleo (N) e um amplo megassomo (M). Fonte: Vannier-Santos *et al.*, 2002.

#### 1.4. CICLO BIOLÓGICO

As leishmanioses são consideradas zoonoses e normalmente, o homem é um hospedeiro acidental, já que a intensa urbanização está relacionada com desmatamento e queimadas e como consequência os hospedeiros naturais da região acabam morrendo ou migrando para outras áreas em busca de melhores condições de vida, com isso, os vetores não possuem outra alternativa senão a realização da hematofagia em seres humanos. Os hospedeiros naturais incluem uma grande variedade de mamíferos selvagens e domésticos como, por exemplo, roedores, canídeos, eqüinos e primatas. Entretanto, a transmissão também pode ocorrer através da introdução acidental de agulhas contaminadas ou pelo contato direto com as lesões (Nanjim & Greenway, 1985), por transfusão sanguínea (Kubar *et al.*, 1997).

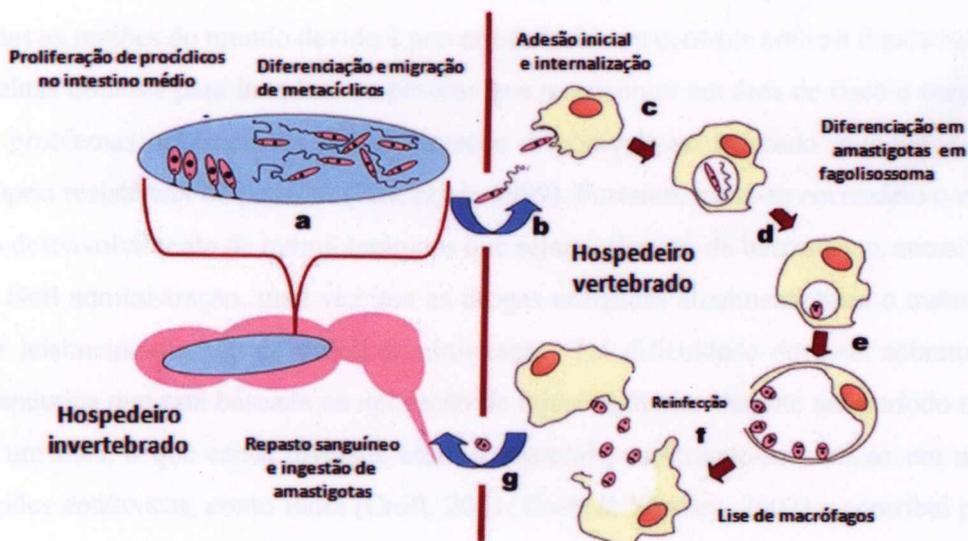
O ciclo de vida da *Leishmania* compreende uma fase extracelular no hospedeiro invertebrado e uma fase intracelular no hospedeiro vertebrado (Figura 2).

A infecção do inseto, fêmea, ocorre durante repasto sanguíneo em um vertebrado infectado, juntamente com sangue, ingere parasitos livres ou macrófagos infectados, os quais ficarão em seu intestino limitados por uma membrana peritrófica. Formas amastigotas ingeridas com o repasto se diferenciam em promastigotas não infectivos ou procíclicos, podem ser encontradas em diferentes morfotipos: nectomonas, haptomonas, paramastigotas e promastigotas metacíclicas (Gossage *et al.*, 2003). As formas procíclicas, após um período de 7-8 dias do repasto sangüíneo, sofrem diversas alterações morfológicas e bioquímicas, fenômeno denominado metaciclogênese, que origina as formas promastigotas metacíclicas, não proliferativa e altamente virulentas (Sacks, 1989; Muskus & Villa, 2002). Após a transformação das formas amastigotas em promastigotas procíclicos, estas se dividem rapidamente em um espaço delimitado pela membrana peritrófica e gradualmente vão se alongando e transformando-se em formas nectomonas. Essas formas podem se diferenciar em metacíclicos ou em forma menor e mais delgada, haptomonas, que migram para o esôfago e faringe, onde se transformam em paramastigotas, uma forma muito menor que apresenta o cinetoplasto ao lado do núcleo (Schlein, 1993; Vannier-Santos *et al.*, 2002) e estes em metacíclicos, mais curtos e delgados e com flagelo proporcionalmente mais longo.

A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando o inseto ao se alimentar do sangue humano ou de animal reservatório natural, transmite as formas promastigotas metacíclicas que são fagocitadas por neutrófilos, os quais entram em apoptose e os

corpos apoptóticos gerados são, em seguida, fagocitados por monócitos/macrófagos. Estas formas sofrem modificações morfológicas e bioquímicas no fagolisossoma e se diferenciam em formas já amastigotas (Chang, 1983; Desjardins, 1995; Neves *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2008).

Nas células hospedeiras, amastigotas estão contidos em vacúolos ditos parasitóforos, os quais se fundem a endossomas tardios originando fagolisossomas (Desjardins, 1995). Apesar dos vacúolos parasitóforos serem considerados endossomas tardios, possuindo um pH em torno de 4,5-5,0, o pH citoplasmático do parasito é mantido neutro em função da presença de proteínas próton-ATPase na membrana do parasito (Revisto por Vannier-Santos *et al.*, 2002). Uma vez dentro do vacúolo parasitóforo, a forma amastigota sofre diversas bipartições para a forma de novos parasitos (Chang, 1983). Em seguida o macrófago sofre lise, liberando formas amastigotas que poderão infectar novas células hospedeiras dando continuidade ao processo de infecção (Figura 2).



**Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania***

O inseto vetor ingere formas amastigotas do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (g). Estas formas diferenciam-se em formas promastigotas procíclicas que proliferam no intestino médio. As formas promastigotas procíclicas se diferenciam em promastigotas metacíclicas ao longo do intestino (a) e estas permanecem na saliva do inseto sendo inoculadas no hospedeiro vertebrado no momento da hematofagia (b). No hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocítico (c) e diferenciam-se para formas amastigotas imóveis no interior do vacúolo parasitóforo (d). As formas amastigotas irão se dividir intensamente (e) até a lise dos macrófagos (f) dos quais são liberados para infectar novas células ou serem ingeridas por insetos não infectados (Segundo: Vannier-Santos *et al.*, 2002).

## 1.5. QUIMIOTERAPIA DA LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença de grande impacto social que vem crescendo em todas as regiões do mundo devido à precariedade do seu controle como à inexistência de vacinas eficazes para imunizar as pessoas que se encontra em área de risco e uma série de problemas apresentados pelos fármacos disponíveis no mercado mundial como a própria resistência do parasito (Lira *et al.*, 1999). Portanto, torna-se necessário o estudo e o desenvolvimento de quimioterápicos que sejam eficazes, de baixo custo, acessíveis e de fácil administração, uma vez que as drogas utilizadas atualmente para o tratamento das leishmanioses são de difícil administração. Tal dificuldade deve-se, sobretudo, a terapêutica que está baseada na aplicação de injeções diárias durante um período médio de um mês, o que causa diversos efeitos colaterais, mostrando-se ineficaz em muitas regiões endêmicas, como Índia (Croft, 2001; Croft & Yardley, 2002) e contribui para a seleção de parasitos tolerantes a altas concentrações da droga (Olliaro *et al.*, 2005).

### 1.5.1. Antimoniais

Os antimoniais trivalentes ( $Sb^{+3}$ ), na forma de tártaro emético foram introduzidos no Brasil por Gaspar Vianna em 1912 e foram usados para o tratamento da LC em 1913, obtendo sucesso, visto que naquela época 90% dos casos de LV evoluíam para óbito por não haver tratamento (Lainson, 1979). Em 1915 foi utilizado para o tratamento da LV de Cristine e Cariona na Itália e Roger na Índia para o tratamento da LV (Croft & Yardley, 2002). Desde 1945 os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são as drogas de primeira escolha para o tratamento de LV e de alguns casos de LC (Berman, 1997) por ser menos tóxicos para *Leishmania* e dez vezes menos tóxico para o organismo humano do que sua forma trivalente (Roberts *et al.*, 1995). Dentre os antimoniais pentavalentes existe comercialmente o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>), nos países de língua inglesa e o antimoniato N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>), em países de língua francesa, espanhola e no Brasil (Berman, 1998).

Provavelmente a forma pentavalente seja um profármaco que se converte na forma mais tóxica, trivalente, próxima do seu local de ação, ou seja, no interior dos macrófagos (Goodwin & Page, 1943). Os pentavalentes são absorvidos e excretados rapidamente pelo corpo, com uma meia vida de duas horas, sendo que o restante é eliminado 76h mais tarde (Chulay *et al.*, 1988). É importante ressaltar que existe uma

diferença na sensibilidade dos antimoniais entre as formas promastigotas e amastigotas, e entre as diferentes espécies de *Leishmania*. De acordo com Sereno e Lemesre (1997) as formas amastigotas axênicas de *L. (L.) infantum*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* são duas vezes mais sensíveis que a promastigota ao pentavalente antimonial, provavelmente pela simples evidência de que macrófagos podem reter a forma pentavalente (Roberts *et al.*, 2001) além do envolvimento da glutatona do macrófago no metabolismo de pentavalentes antimoniais para trivalente (Frezard *et al.*, 2001).

A OMS (2000) preconiza como tratamento para a leishmaniose visceral 20mg de Sb/kg/dia, por via intramuscular ou intravenosa, por, no mínimo, 20 dias e até duas semanas após a melhora clínica, com dose diária máxima de 850mg de antimônio. Para a leishmaniose cutânea, a recomendação é de 10 a 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia, até que a lesão se cure. Para a leishmaniose mucosa é recomendada a administração de 20 mg Sb/kg/dia durante 30 dias (Tracy & Webster Junior, 1996).

Vários estudos bioquímicos realizados têm indicado alvos potenciais para os antimoniais sobre a célula do protozoário tais como: a possível alteração do potencial redox da, na qual é induzido o efluxo de tiol intracelular e inibida a ação da tripanotona redutase (Legare *et al.*, 1997; Mukhopadhyay *et al.*, 1996), a fragmentação do DNA sugerindo que o Sb atue no mecanismo de apoptose (Sudhandiran *et al.*, 2003), provável inibição da glicólise (Mottram & Coombs, 1985; Berman *et al.*, 1987), em particular a inibição da fosforilação do ADP. Além destes mecanismos, Chakraborty & Majunder (1988) demonstraram que o agente ativo do pentostan é capaz de inibir a enzima topoisomerase II purificada de *L. (L.) donovani*. Também, foi demonstrado que antimoniais pentavalentes inibem a enzima fosfofrutocinase, envolvidas na síntese de nucleotídeos trifosfatados (Berman *et al.*, 1985), como também inibição da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos (Berman *et al.*, 1985) através de análises moleculares de clones resistentes.

Apesar da sua ação em vários alvos da célula do parasito, os antimoniais apresentam vários efeitos colaterais como dor muscular, pancreatite, arritmia cardíaca, hepatite, dor no local da injeção, disfunção gastrointestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações (Gasser *et al.*, 1994), os quais geralmente levam à redução ou ao término do tratamento.

As dificuldades no tratamento e seus efeitos colaterais têm incentivado pesquisadores do mundo inteiro a buscar novos fármacos. Uma tentativa para redução da toxicidade é o encapsulamento dos antimoniais em lipossomas que permitiria a

redução dos efeitos colaterais, dirigindo o fármaco para os sítios de ação, além de poder controlar a concentração e velocidade de liberação do fármaco no órgão alvo (Tracy & Webster Junior, 1996).

### 1.5.2. Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico poliênico com atividade antifúngica e leishmanicida. Ela se liga fortemente ao ergosterol, esteroide majoritário de fungos e tripanosomatídeos, como *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. Ela possui baixa afinidade pelo colesterol, principal esteroide das células de mamíferos. O antibiótico interage com o ergosterol do parasito, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (Saha *et al.*, 1986; Urbina, 1997). Ela também inibe proteínas enzimáticas de membrana como a H-ATPase em células de fungos (Surarit *et al.*, 1987) e a Na/ K ATPase em células de mamíferos. Esta inibição resulta na perda da capacidade proliferativa por depleção da produção de energia pela célula.

Este fármaco foi utilizado como leishmanicida no início da década de 60 e ainda é utilizado para o tratamento de leishmanioses mucocutânea como droga de segunda escolha, quando existe resistência aos antimoniais (Croft & Yardley, 2002). Seu uso é bastante restrito devido aos inúmeros efeitos tóxicos que apresenta como febre, calafrios, hipotensão ou hipertensão, diminuição da função renal e dos níveis séricos de potássio (Berman, 1998).

Devido à grande toxicidade, no final da década de 1990, foram desenvolvidas novas formulações terapêuticas lipossomais da anfotericina B. Destas apenas três estão disponíveis comercialmente: O AmBisome<sup>®</sup> (Fujisawa, Deerfield, IL/EUA), um pequeno lipossomo unilamelar, conhecido como a verdadeira preparação lipossomal; Amphotec<sup>™</sup> (Sequs, Menlo Park, CA/ EUA), uma dispersão coloidal e o Abelcet<sup>®</sup> (Liposome Co., Princeton, NJ/ EUA), um grande complexo lipídico (Basselin, 1997). A anfotericina B em lipossoma é incorporada pelo macrófago, onde se abriga o parasito, pouco reagindo com o colesterol das células hospedeiras, aumentando a eficácia e tolerância à droga (Roberts, 2003). As formulações lipídicas de anfotericina B, por terem baixa nefrotoxicidade, podem ser usadas em doses altas por muito tempo. Das formulações, o AmBisome é eficaz e tem o melhor perfil de segurança, porém o custo limita o seu uso. A anfotericina B lipossomal em dose única de 15mg/kg foi usada para leishmaniose visceral na Índia, tendo 100% de cura, similar ao uso diário da anfotericina

convencional 1mg/kg/dia durante 15 dias (Trakur, 2001) e no Brasil mostrou-se eficaz no tratamento da leishmaniose mucocutânea em casos refratários ao antimonial pentavalente (Sampaio, 1997).

### 1.5.3. Paramomicina (aminosidina)

A paramomicina é um antibiótico aminoglicosídico produzido por *Streptomyces rimosus*, licenciado na Europa para o tratamento parenteral de infecções bacterianas. O mecanismo de ação deste antibiótico contra bactérias é bem conhecido e relatos mostram que ele se liga à subunidade menor dos ribossomos levando a uma leitura errônea do mRNA. De acordo com Croft & Yardley (2002), isso também pode estar acontecendo com os protozoários. Em *L. (L.) donovani* observou-se um efeito na função mitocondrial e na permeabilidade da membrana com a síntese de lipídios polares (Maarouf *et al.*, 1997).

O tratamento com este antibiótico teve resultados relevantes. Segundo Berman (1998), a forma injetável do antibiótico (124mg/kg/dia por 19 dias em média) tem sido utilizada como monoterapia para leishmaniose visceral, apresentando resultados positivos, com cura de 90% em estudos clínicos realizados no Quênia e na Índia. Na dose de 12 mg/kg/dia durante três semanas teve cura de 50% e 60% em leishmaniose cutânea na Colômbia e América Central, respectivamente (Soto *et al.*, 1994). Em outros estudos, a paramomicina associada ao pentostam apresentou resultados similares aqueles obtidos quando o antimonial é usado sozinho, porém com o tempo reduzido à metade (Thakur *et al.*, 1995). Entretanto este fármaco apresenta alta toxicidade afetando os néfrons, o oitavo par de nervos cranianos, o que pode levar também a problemas de controle motor e do equilíbrio. Além disso, ele foi testado em número insuficiente de pacientes para que os efeitos colaterais e a resistência dos parasitos fossem convenientemente avaliados (Berman, 1998).

### 1.5.4. Pentamidina

Assim como a anfotericina B a pentamidina também é uma droga de segunda escolha. É recomendado para os casos graves de leishmaniose não responsiva ao tratamento convencional em países como Índia e Quênia (Thakur *et al.*, 1991) e também

por apresentar menos efeitos colaterais. Recentemente mostrou ser altamente eficiente contra LC na Colômbia (Soto *et al.*, 1994).

A pentamidina é uma diamina aromática que apresenta atividade antimicrobiana contra fungos, bactérias, tripanosomatídeos bem como antiviral e antitumoral (Berman, 1988). Apesar do seu mecanismo de ação primária ser desconhecido, sabe-se que ela interfere na duplicação e transcrição do DNA mitocondrial, alterando morfológicamente o cinetoplasto (Croft *et al.*, 1982). Além disso, interfere na síntese de moléculas importantes para a manutenção do parasito como a biossíntese de poliaminas, impedindo a utilização de S-adenosil-L-metionina através da inibição de enzimas como a espermidina sintetase (Basselín *et al.*, 1997), também são capazes de se ligar ao DNA em regiões ricas em A-T (adenina – timina) (Berman, 1997).

Apesar do seu potencial leishmanicida no tratamento da LC ser menos tóxico em relação aos antimoniais pentavalentes têm-se observado alguns efeitos adversos expressivos, como mialgias, dor no local da administração, náuseas e hipotensão (Berman, 1997) e, além disso, para o tratamento de LV os efeitos tóxicos são maiores em relação aos antimoniais, havendo exacerbação dos efeitos já citados e a incidência de taquicardia e hiperglicemia (Berman, 1997).

#### **1.5.5. Miltefosina e alquilfosfolipídeos**

Os alquilfosfolipídeos (ALPs), ou análogos de fosfolipídeos são uma nova classe de drogas que tem mostrado uma ampla atividade neoplásica (Croft & Yardley, 2002). Muitos tipos de ALPs foram sintetizados, porém quatro compostos já se encontram em uso no tratamento clínico experimental contra o câncer: miltefosina, edelfosina, ilmofofosina e SRI62-834 (Croft *et al.*, 1996).

Miltefosina é uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (Unger *et al.*, 1989).

A atividade leishmanicida foi relatada pela primeira vez em 1987 por Achterberg & Gercken, que descreveram a atividade de alquilglicerofosfocolinas contra promastigotas de *L. (L.) donovani*. Em março de 2002, este fármaco foi aprovado com resultados promissores para ser utilizado na Índia no tratamento de pacientes com leishmaniose refratária ao tratamento convencional com antimoniais (Sindermann *et al.*, 2003) e atualmente desponta como a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral uma vez que pode ser administrada por via oral (Sundar *et al.*,

1999), com cura superior a 95% na dose de 2,5 mg/kg/dia durante quatro semanas. No tratamento de LC, estudo na Colômbia, pacientes receberam 2,5 mg/kg/dia entre três e quatro semanas, com cura de 94% (Soto, 2001).

Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* mostram a eficácia deste fármaco para o tratamento da infecção por *L. (L.) donovani* (Croft *et al.*, 1996; Le Fichoux *et al.*, 1998) sendo ativo *in vitro* contra promastigotas e amastigotas, com eficácia maior nas amastigotas, provavelmente por promover o aumento de estresse oxidativo do macrófago.

O mecanismo de ação deste fármaco na leishmaniose ainda é bastante controverso. É possível que, além de atuar em tumores e em *Leishmania* induzindo a apoptose (Paris *et al.*, 2004) também atua alterando as vias de sinalização celular mediadas por lipídeos (Arthur & Bittiman, 1998). Outros estudos sugerem que este fármaco possui propriedades imunomodulatórias (Eue *et al.*, 1995).

Pacientes respondem pobremente aos antimoniais, logo este fármaco poderia ser uma alternativa para o tratamento de pacientes imunossuprimidos, já que sua ação não está relacionada ao estado imunológico do hospedeiro, porém já foi relatada a resistência a este composto, além de alta toxicidade e efeitos adversos tais como alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas, dificultando assim, a adesão ao tratamento (Croft *et al.*, 2006; Perez-Victoria *et al.*, 2006).

#### **1.5.6. Alopurinol**

O Alopurinol é análogo de purina, atuando como substrato para várias enzimas destas bases nitrogenadas, capaz de inibir diferentes enzimas de sua síntese, sendo incorporada ao ácido nucléico do parasito. Quando utilizado isoladamente mostrou-se ineficaz (Sampaio, 1997), porém ao ser associado aos antimoniais, apresentam efeito sinérgico favorável.

Na Colômbia, a associação de alopurinol ao glucantime e ao pentostam mostrou-se superior à ação dos antimoniais utilizados isoladamente no tratamento da LC (Martinez *et al.*, 1997). O glucantime associado ao alopurinol também foi eficaz no tratamento de pacientes com LC refratária no Irã (Momeni & Aminjavaheri, 2003).

### 1.5.7. Azóis

São representados pelos imidazóis como o cetoconazol, itraconazol e fluconazol os quais exercem sua ação bloqueando a síntese de ergosterol, importante esteróide de membrana dos fungos e de *Leishmania* sp. Os imidazóis apresentam diferentes efeitos em diferentes espécies de *Leishmania*. O itraconazol e o cetoconazol, assim como a miltefosina são administrados por via oral, e apresentam-se efetivos para pacientes infectados por *L. (L.) mexicana*, não apresentando a mesma eficácia para os pacientes infectados pela *L. (V.) braziliensis* (Sotiropoulos & Wilbur, 2001). O fluconazol foi usado com sucesso em combinação com o alopurinol no tratamento de pacientes com LV (Yoshida *et al.*, 1987) e também tolerado por pacientes com LC causada por *L. (L.) major*. Como a maior parte de lesões acometidas por *L. (L.) major* são curadas sem o tratamento, decisões quanto à administração de fluconazol, devem considerar o preço da medicação e a capacidade do paciente para aderir ao tratamento (Beach *et al.*, 1988).

### 1.5.8. Azitromicina

Experimentos realizados *in vitro* e em camudongos mostraram a eficiência da azitromicina contra *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi* (Sampaio *et al.*, 2006). Em estudos realizados em Manaus, apesar da sua fácil administração via oral, o fármaco teve baixa eficiência na LC e foram observados efeitos colaterais como a diarreia, dor abdominal, cefaléia e náuseas, porém em Minas Gerais a LC teve cura de 85% sem recidiva durante 14 meses após o tratamento (Silva *et al.*, 2004).

### 1.5.9. Diamino-difenil-sulfona (Dapsona<sup>®</sup>)

Utilizada com sucesso na LC do Velho Mundo, mas não demonstrou vantagens em curto prazo sobre o antimonial no tratamento da infecção por *L. (V.) braziliensis* (Mechan-Hamann *et al.*, 1988).

## 1.6. PRODUTOS NATURAIS

O Brasil é o país com maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies de um total estimado entre 350.000 e 550.000 espécies no planeta. Várias dessas espécies são endêmicas de uma região e ainda não foram avaliadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico (Simões & Mariot, 2003).

As plantas são uma das principais fontes de produtos naturais biologicamente ativos apresentando-se eficazes no tratamento de algumas doenças. Estes produtos podem ser obtidos através da utilização da própria planta ou pelo isolamento de modelos estruturais para o desenvolvimento de novos derivados modificados que possuam uma maior atividade e/ou menor toxicidade (Caniato *et al.*, 2003).

Das 252 drogas consideradas básicas e essenciais pela OMS 11% são originadas exclusivamente de plantas e grande parte são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais (Rates, 2001). Atualmente estima-se que os produtos naturais direcionem o desenvolvimento de 44 % de todas as novas drogas (Caniato *et al.*, 2003).

O mercado mundial de fitoterápicos movimenta anualmente cerca de US\$ 20 bilhões, sendo US\$ 1,5 bilhões só no Brasil (Pinto *et al.*, 2002). Cerca de 30% dos medicamentos desenvolvidos nos países de Primeiro Mundo são provenientes de recursos naturais e tem menores custos quando comparados aos obtidos por processos de síntese, uma vez que aqueles obtidos de plantas usadas na medicina popular já têm propriedades conhecidas e muitos deles já são usados na forma de medicamentos fitoterápicos (Calixto, 2005).

No caso de países em desenvolvimento como o Brasil, que ainda não dispõem de estímulos para a implantação da tecnologia em química fina e farmacêutica, as pesquisas com produtos naturais assumem um papel importante, uma vez que a probabilidade de se encontrar novas moléculas farmacologicamente ativas é maior através do estudo dos produtos naturais do que por síntese química (Lapa, 1995).

O valor dos produtos naturais, especialmente das plantas medicinais, para a sociedade e para a economia mundial é muito significativo. Estima-se que 60 a 80% da população, sobretudo de países em desenvolvimento ainda confiam no poder terapêutico de plantas medicinais e delas utilizam-se, empiricamente, para o tratamento de suas doenças (OMS, 2003). O empirismo na utilização de partes das plantas como caule, raízes, folhas, sementes e/ou frutos enquanto recurso medicinal tem demonstrado

eficiência na cura de diversos males da população, suscitando assim grande interesse no estudo científico destas plantas assim como de suas propriedades terapêuticas.

Estudos têm demonstrado que várias plantas apresentam atividade contra *Leishmania* (Torres-Santos *et al.*, 1999; Bezerra *et al.*, 2006, Moreira *et al.*, 2007) assim como metabólitos secundários tais como alcalóides, terpenóides, flavonóides, e lactonas sesquiterpênicas, que outrora foram considerados inativos, são hoje ferramentas importantes no tratamento e investigação clínica, sendo descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida (Iwu *et al.*, 1994; Queiroz *et al.*, 1996; Torres-Santos *et al.*, 1999; Kam *et al.*, 1999; Rocha *et al.*, 2005).

Extratos de plantas já vêm sendo usados no tratamento da leishmaniose, principalmente na forma cutânea. Um alcalóide, a berberina, encontrado em várias famílias vegetais foi muito estudado para o tratamento de LC com o primeiro relato datado de 1911. A confirmação desses resultados foi dada por Vennerstrom e colaboradores em 1990 com a atividade de berberina contra hamsters infectados com *L. (L.) donovani* & *L. (V.) panamensis*. Segundo Founet *et al.* (1992) e Moreira *et al.* (2002), o uso de plantas no tratamento da LTA é uma prática antiga entre as populações de áreas endêmicas, porém esses tratamentos são empíricos e pouco se sabe sobre sua real eficácia, uma vez que na LTA pode apresentar a cura espontânea das lesões.

## 1.7. CHALCONAS

Na família Myrtaceae os flavonóides estão amplamente distribuídos, incluindo também, apesar de poucos trabalhos encontrados na literatura, a ocorrência no gênero *Myrcia* (Gottlieb *et al.*, 1972; Matuda *et al.*, 2002; Fehlberg, 2006). Esta família apresenta muitas espécies que produzem frutos carnosos, muito apreciados pela população. Entre as famílias utilizadas para fins medicinais no Brasil, a família Myrtaceae ocupa o terceiro lugar (Cruz *et al.*, 2004). Na medicina popular, estas espécies são utilizadas pela população brasileira no tratamento de diversas enfermidades, destacando-se antidiabéticos, anti-reumáticos, anti-diarréicos, adstringentes, antiinflamatórios e no tratamento de úlceras crônicas, hemorragias, febre, cistite e uretrite, propriedades atribuídas à presença de alguns compostos tais como flavonóides como na sua constituição.

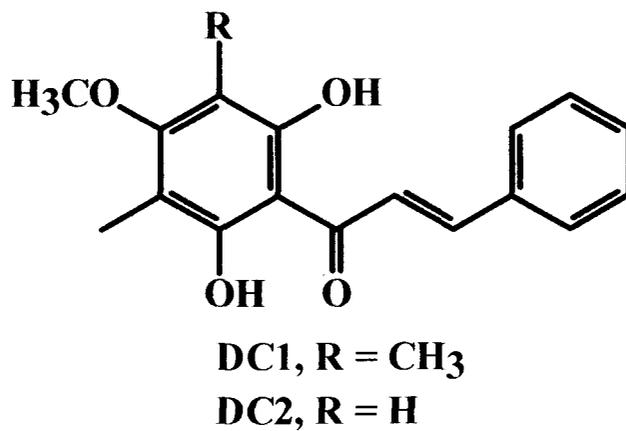
Os flavonóides constituem um grupo de derivados fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo que vários desses apresentam coloração intensa, variando de púrpura a amarelo. São constituintes de alguns frutos, flores e folhas funcionando como atrativo para polinizadores, favorecendo, assim, a reprodução das espécies. Nessa classe de produtos naturais, mais de 6000 estruturas são conhecidas podendo ser encontrados tanto na forma livre (agliconas) como conjugada com açúcares (glicosídeos). Em geral, estes compostos podem ser encontrados nos vacúolos, embora, em alguns casos, estejam presentes em cromoplastos e outros plastídios de células vegetais.

Em função das diferentes propriedades associadas aos flavonóides, existe um interesse econômico nestes compostos, sobretudo por estarem associados à atração de polinizadores, bem como processos de tanagem do couro e manufatura do cacau, além de sua contribuição na nutrição e sabor dos alimentos (Simões *et al.*, 2003). Vale salientar que algumas propriedades farmacológicas são destacadas como as atividades antitumoral, antiinflamatória, antialérgica, antiulcerogênica, antivirais, hormonal, anti-hepatotóxica, antiespasmolítica, diurética, antifúngica, bactericida, antiparasitária, analgésica, inibidores de enzimas e antioxidante (Peterson e Dwyer, 1998; Harborne e Willians, 2000), entre outras (Olivella *et al.*, 2001; Rice-Evans & Packer, 2003; Lunardi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Soriano *et al.*, 2004; Yokomizo & Moriaki, 2006; Piñero *et al.*, 2006; Ferrreira *et al.*, 2006).

Desta forma, estes compostos contribuem para a prevenção de importantes patologias relacionadas ao dano oxidativo, que resulta do acúmulo de radicais livres, substâncias que danificam as células. Essa forma de estresse pode ser provocada por elementos externos, como o tabagismo ou por fatores em nível celular. Acredita-se que o dano causado pelo estresse oxidativo contribua para o envelhecimento e o surgimento de muitas patologias, tais como doenças cardiovasculares, câncer e outras (Harborne, 1992).

Além de outras funções biológicas, os flavonóides são ativos contra alguns microorganismos (Weiderbörner *et al.*, 1990). Pelo menos em alguns casos, a presença destas substâncias parece servir como uma barreira química à invasão de microorganismos nas plantas (Harborne, 1977). Flavonóides lipofílicos metilados podem oferecer proteção contra fungos e bactérias por causa da facilidade que eles têm em penetrar nas membranas plasmáticas (Wollenweber *et al.*, 1981).

As chalconas, objeto deste estudo, são flavonóides que apresentam fórmula estrutural simples com dois anéis aromáticos interligados por grupamentos carbonila (Figura 3). Estes compostos podem ser encontrados em várias espécies de plantas e estão relacionados a uma ampla atividade farmacológica incluindo atividades bactericidas, antifúngicas e imunossupressão (Paula *et al.*, 2005). É importante destacar que algumas chalconas e flavanonas são citadas na literatura por sua atividade anti-AIDS (WU *et al.*, 2003), além de apresentarem alta atividade contra os protozoários *Trypanosoma cruzi*, espécies de *Leishmania* e *Plasmodium falciparum*, agentes etiológicos das doenças de Chagas, leishmaniose e malária, respectivamente (Piñero *et al.*, 2006; Lunardi *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003).



**Figura 3. Estrutura química de Chalconas.** Na figura pode-se verificar as chalconas utilizadas no estudo apresentando como substituinte (R) uma metila (chalcona I) e um hidrogênio (chalcona II).

## 1.8. ESCANDENINA

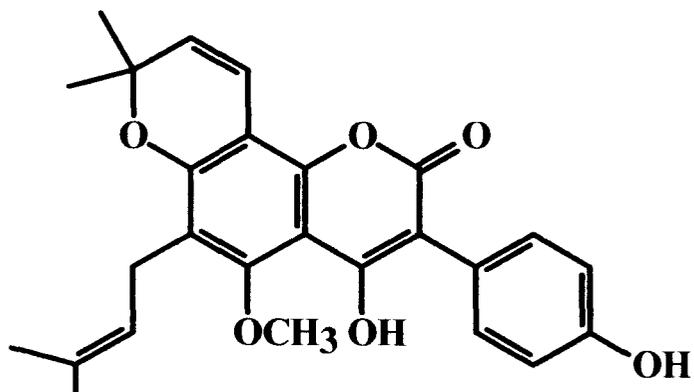
A escandenina é um isoflavonóide, cuja estrutura é mostrada na figura 4. Esta substância foi majoritariamente isolada dos extratos hexânico e diclorometânico das raízes de *Deguelia longeracemosa* (Tozzi, 1989).

Os isoflavonóides constituem uma classe de flavonóides com limitada distribuição no reino vegetal, sendo geralmente encontrada na subfamília Papilionoideae de Leguminosae. Estas substâncias podem ser isoladas de diversas partes das plantas tais como folhas, sementes, raízes, caules e flores (Dewick, 2002; Wong *et al.*, 1975).

A atividade biológica dos isoflavonóides pertencentes á classe das 4-hidroxi-3-fenil coumarinas, ainda é pouco explorada, mas recentemente constatou-se que a escandenina possui citotoxicidade contra *Artemia salina*, apresentando concentração inibitória de 50%(IC<sub>50</sub>) de 4,31 µg /mL e também atividade anti- microbiana diante das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Moraes, 2000).

Nos ensaios de atividade antimalárica *in vitro* contra *P. falciparum* desenvolvidos no Centro de Pesquisa René Rachou-CPqRR/ FIOCRUZ-MG, o extrato hexânico e a substância escandenina dele isolada demonstraram ser ativos *in vitro* contra este protozoário com IC<sub>50</sub> de 0,35 µM, sendo mais efetivo do que a cloroquina cujo IC<sub>50</sub> foi de 13,9 µM (Brandão *et al.*, 1997; Souza -Neta, 2003).

A atividade leishmanicida da escandenina ainda não foi referida na literatura disponível confirmando o ineditismo desta atividade. Tal estudo contribui como mais uma potencial alternativa nas avaliações *in vitro* da contenção da proliferação celular de protozoários como a *Leishmania*.



**Figura 4. Estrutura química da Escandénina.**

## 2. JUSTIFICATIVA

De acordo com a OMS (2003) as espécies vegetais são as melhores e maiores fontes de fármacos para a humanidade.

Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica nas lesões cutâneas (França *et al.*, 1993; Mathias *et al.*, 1993; Moreira *et al.*, 2002). Além disso, extratos derivados de plantas do mediterrâneo como a *Cistus creticus* mostraram-se eficazes no tratamento de infecção por *L. (L.) donovani* (Fokialakis *et al.*, 2006). Tanshinones, pigmento vermelho presente em raízes secas de *Salvia miltiorrhiza* (China) é uma tradicional droga utilizada na medicina chinesa no tratamento de LC por *L. (L.) major* (Sairafianpour *et al.*, 2001 e 2003). Brandão *et al.* (2006), demonstraram que extratos das espécies *Hyptis crassifolia* e *Myrcia ferruginea* coletadas da flora brasileira na região da Chapada Diamantina (Ba), apresentaram-se eficientes na inibição da proliferação da *L. (L.) amazonensis*.

Outros produtos naturais como as chalconas modificadas, têm apresentado efeito contra a proliferação de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* por inibir a enzima fumarato redutase, enzima que catalisa a redução de fumarato em succinato, chave enzimática para o metabolismo aeróbico de muitos parasitos (Chen *et al.*, 2001). A licochalcona A, uma chalcona oxidada, isolada de uma planta chinesa *Glycyrrhiza glabra*, mostrou o seu efeito inibitório no crescimento de prosmatigotas e amastigotas de *L. (L.) major* e *L. (L.) donovani* (Chen *et al.*, 1993). A 2,6-dihidroxi-4-metoxi chalcona, também se apresentou como inibidor da proliferação de prosmatigotas e amastigotas *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* (Torres-Santos *et al.*, 1999).

A escandenina, substância isolada dos extratos das raízes de *Deguelia longeracemosa* foi eficaz na inibição da proliferação de *P. falciparum* (Brandão *et al.*, 1997).

Sendo assim, o estudo de fitofármacos vem ganhando cada vez mais espaço nos centros de pesquisa, uma vez que a própria história demonstra que inúmeras plantas são popularmente utilizadas através de infusões (chás) que consagraram os efeitos microbicidas resultantes do empirismo e, cuja comprovação, fora obtida posteriormente pela ciência, reforçando o intuito de resolver problemas de saúde pública no Brasil.

### 3. OBJETIVOS:

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de produtos naturais como uma alternativa farmacológica sobre a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência a de chalconas I (2',6'-diidroxil-3',5'-dimetil-4'-metoxichalcona) e II (2',6'-diidroxil-3'-metil-4'-metoxichalcona) e da escandenina sobrevivência e proliferação das formas promastigotas de *L (L.) amazonensis*;
- Determinar a suscetibilidade parasitária (IC<sub>50</sub>) através de ensaios de proliferação de promastigotas de *L.(L.) amazonensis*;
- Avaliar o efeito citotóxico de chalconas I e II e escandenina em culturas de esplenócitos.
- Elucidar os mecanismos de ação leishmanicidas dos compostos testados por microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Animais

Camundongos Balb/C, fêmeas (4-6 semanas) foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM – FIOCRUZ).

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Animal do CPqGM – FIOCRUZ, com o número de protocolo 028.

### 4.2. Obtenção de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*

A cepa de escolha foi MHOM/Br/75/Josefa de *L. (L.) amazonensis*, isolada pelo Dr. C. A. Cuba-Cuba (Universidade de Brasília), de caso de leishmaniose tegumentar. Os parasitos foram mantidos em meio Warren modificado (infusão de cérebro e coração bovino, ácido fólico e hemina), suplementado com 10% de soro fetal bovino, a 24°C.

### 4.3. Obtenção dos fármacos

A escandenina foi isolada da *Deguelia longeracemosa* na Mata de Tabuleiro de Linhares, ES e cedida pela Dra L. Souza-Neta (UFBA).

As chalconas I, II e flavonas foram obtidas pelo Grupo de Estudo de Produtos Naturais (GESNAT) do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

As chalconas I e II foram coletadas pelo doutorando Paulo Daniel Silva no Parque Metropolitano do Abaeté - Salvador-BA (em 25/08/2005) e as flavonas foram coletadas no mesmo local (em 14/02/2004) pela doutoranda Isley Fehlberg. Ambos os fármacos foram extraídos a partir do extrato diclorometânico da folha da espécie *Myrcia guianensis*, foram identificados pela botânica Prof<sup>a</sup> Maria Lenise Silva Guedes do Instituto de Biologia – UFBA e registrada no Herbário “Alexandre Leal Costa” do Instituto de Biologia da UFBA sob os números ALCB 61532 e 65625 respectivamente.

#### **4.4. Medidas de proliferação celular**

Nos experimentos realizados foram utilizados inóculos de  $5 \times 10^5$  parasitos/ mL. Os parasitos foram centrifugados por 10min em uma rotação de 2.500 g. Após este tempo descartamos o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 1mL de meio Warren e contadas em câmaras de Neubauer. Os parasitos foram incubados, a 24 °C, em presença ou ausência das chalconas e escandenina e o crescimento verificado a cada 24 horas.

#### **4.4. Avaliação da citotoxicidade em linfócitos**

Inóculos de  $1 \times 10^6$  esplenócitos obtidos de camundongos Balb/C foram incubados em meio RPMI completo, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10  $\mu$ L de [ $^3$ H]-timidina/ poço, de forma a obter uma concentração de 1  $\mu$ Ci/ poço, em presença ou ausência do fármaco. Após 24 horas, as células foram coletadas para contagem de radioatividade incorporada através do contador  $\beta$  Matrix 9600.

#### **4.5. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

As células pré-tratadas com os produtos naturais de escolha foram lavadas duas vezes em salina tamponada com fosfato (PBS). Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado, as células foram fixadas em glutaraldeído 2,5 %, em tampão cacodilato 0,1M e 0,2M, ácido pícrico, pH 7,2 durante 1 hora, a temperatura ambiente. Após a fixação, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M duas vezes e pós-fixada em solução de tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, no mesmo tampão, ao abrigo da luz. A seguir as células foram lavadas com cacodilato 0,1M, desidratadas em concentrações crescentes de acetona (30-100 %) com duração de 10 min cada.

Resina epóxi Polybed (Polysciences) foi utilizada para a infiltração das células. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo e coletados em grades de cobre de malha 400 As células foram contrastadas com citrato de chumbo 15% p/v e acetato de uranila 7% p/v e os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109 a 80kV.

#### **4.6. Microscopia eletrônica de varredura**

As células pré-tratadas com os produtos naturais de escolha foram lavadas com PBS e fixadas como descrito acima. Após a fixação, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e as células foram aderidas sobre lamínulas pré-cobertas com solução de poli-*L*-lisina por 1 hora. Como descrito acima as células foram pós-fixadas por 1 hora no escuro e lavada três vezes em caco 0,1 M. Em seguida as células foram desidratadas com etanol em series crescentes (30-100%) com duração de 10 min. cada. Após desidratações as amostras foram submetidas à secagem pelo método do ponto crítico. As lamínulas foram fragmentadas e montadas em suportes metálicos e estes submetidos a uma pressão de argônio de 0,1 mBAR para metalização. As amostras foram observadas em microscópio de varredura JEOL JSM 5310.

#### **4.7. Análise estatística**

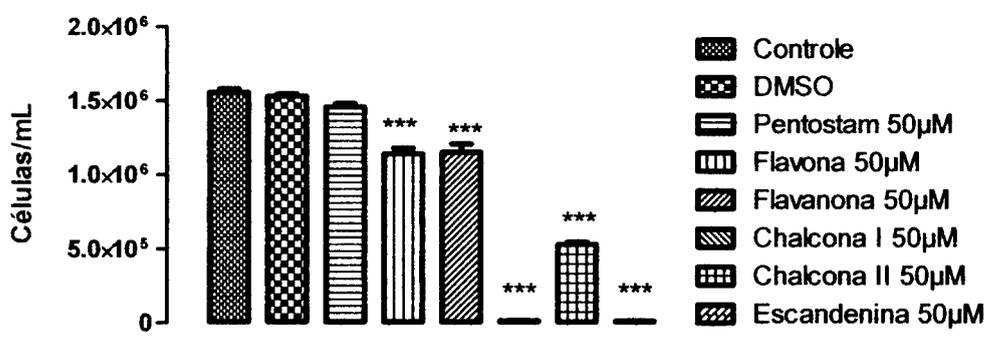
Os dados obtidos estão representados como médias  $\pm$  desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelos testes *t* de Student ou ANOVA e pós-teste de Tukey com nível de significância de  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Triagem dos Produtos Naturais

Inicialmente, foi realizado uma triagem com flavona, flavanona, chalcona I, chalcona II e escandenina na concentração de 50 $\mu$ M para avaliar a suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação de promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. Verificou-se uma inibição de 100% para a chalcona I e escandenina e uma inibição superior a 60% para a chalcona II. Flavona (6,8-dimetil-5,4'-diidroxi-7,3'-dimetoxiflavona) e flavanona (6,8-dimetil-5,4'-diidroxi-7-metoxiflavanona) apresentaram um percentual de inibição em torno de 40%. O pentostam não apresentou diferença estatisticamente significativa na proliferação celular em relação aos controles.

A partir desta etapa, as demais avaliações prosseguiram com as drogas que apresentaram inibição de pelo menos 60%, em virtude da possibilidade de se verificar toxicidade em células de mamíferos em concentrações muito elevadas.



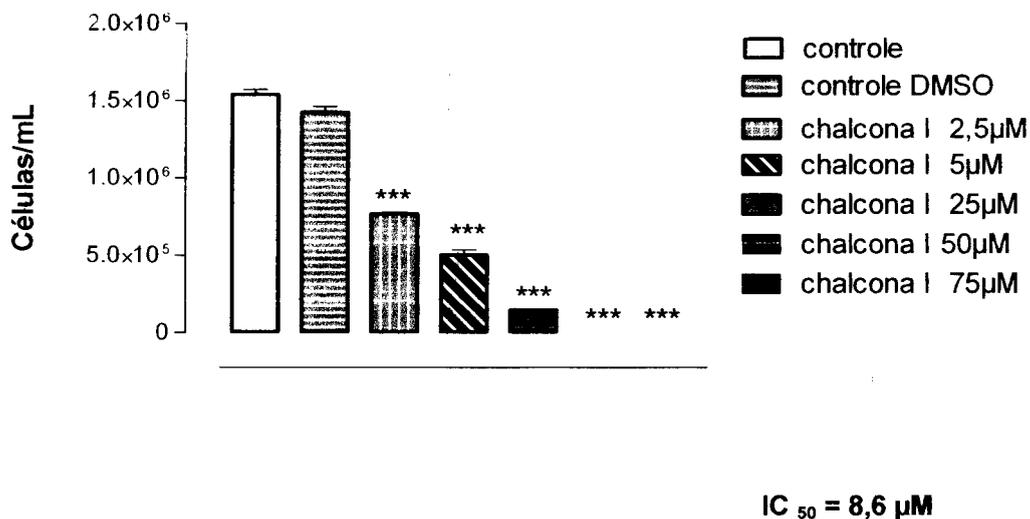
**Figura 5. Triagem dos produtos naturais.** Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubados por 48 horas com flavonóides em concentração de 50 $\mu$ M. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com flavona, flavanona, chalconas I e II e escandenina (\*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 5.2. Efeito inibitório de Chalconas e Escandenina na proliferação de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

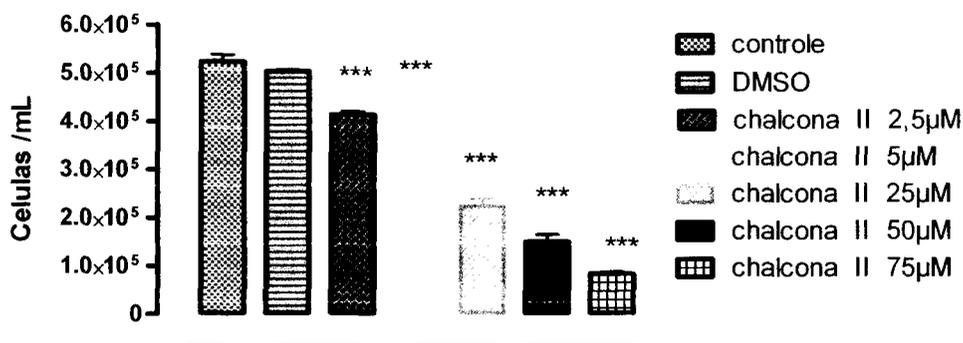
Para avaliar a atividade inibitória dos produtos naturais na proliferação celular de *L. (L.) amazonensis* foram realizados experimentos de dose-resposta em um período de incubação de 48 horas nas concentrações de 2,5; 5,0 ; 25; 50 e 75  $\mu\text{M}$  das chalconas I (Figura 6) e chalcona II (Figura 7). Para escandenina as concentrações avaliadas foram de 2,5; 5,0 ; 7,5 ; 10 e 15  $\mu\text{M}$  (Figura 8).

A chalcona I foi mais eficaz em relação à chalcona II na concentração de 25 $\mu\text{M}$ , apresentando inibição de 89% e 55,6%, respectivamente. A escandenina promoveu a inibição da proliferação do protozoário superior a 60% na concentração de 7,5 $\mu\text{M}$ .

O valor de  $\text{IC}_{50}$  da chalcona I foi de 8,6  $\mu\text{M}$ , enquanto a chalcona II apresentou valor de 22  $\mu\text{M}$ . Já a escandenina apresentou  $\text{IC}_{50}$  de 5,5  $\mu\text{M}$  o que confirma a superioridade deste composto em relação às chalconas. É possível observar um aumento da atividade leishmanicida com a elevação das concentrações destes compostos evidenciando um efeito dose-dependente.

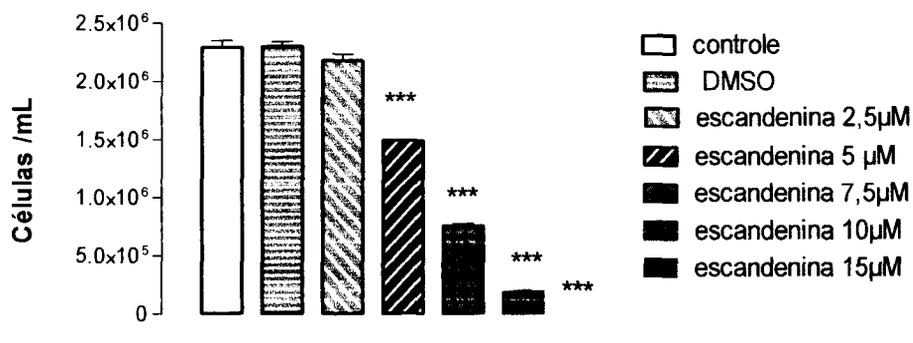


**Figura 6. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.** Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubados por 48 horas com diferentes concentrações de chalcona I. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com chalcona I (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).



$IC_{50} = 22,0 \mu M$

**Figura 7. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.** Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubados por 48 horas com diferentes concentrações de chalcona II. Houve uma diferença estatisticamente significante entre o controle e as células tratadas com chalcona II (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

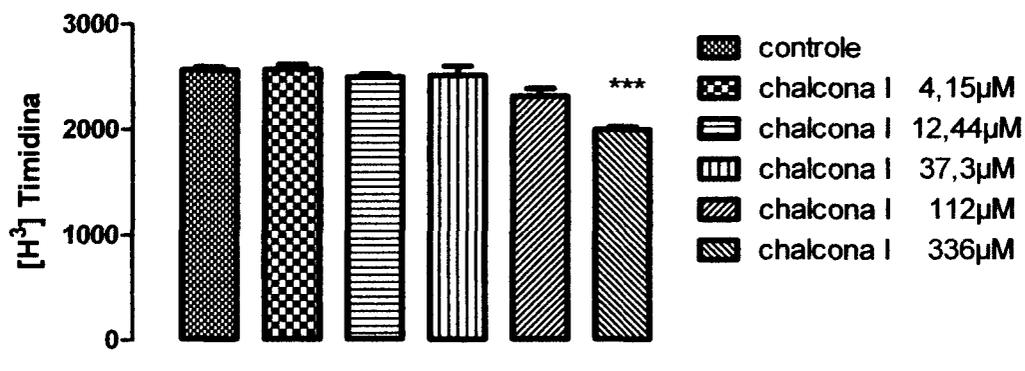


$IC_{50} = 5,5 \mu M$

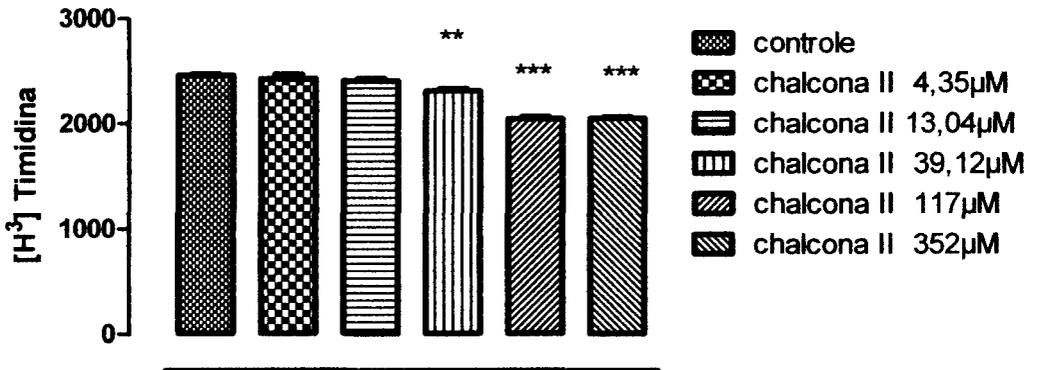
**Figura 8. Avaliação da suscetibilidade parasitária através de ensaios de proliferação celular.** Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* incubados por 48 horas com diferentes concentrações de escandemina. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com escandemina a partir da concentração 2,5 µM (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

### 5.3. Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos *in vitro*.

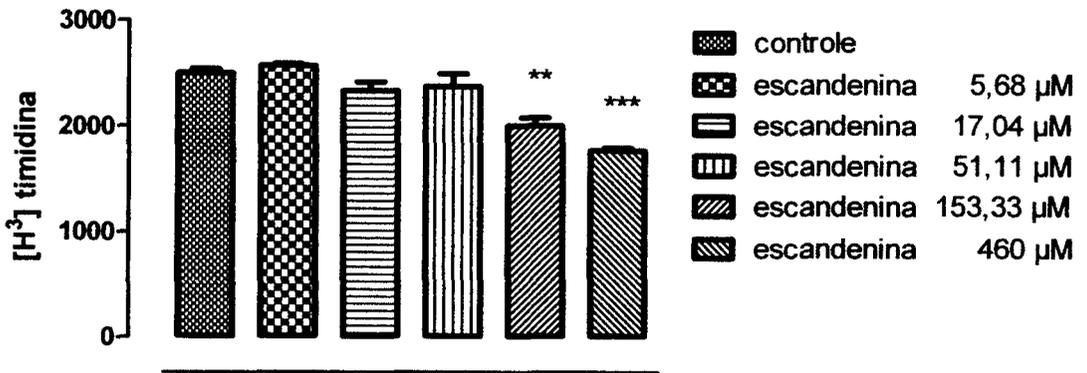
Com o objetivo de investigar os efeitos citotóxicos da escandenina e das chalconas I e II em culturas de esplenócitos foi realizada a extração do baço de camundongos BALB/c para avaliarmos a incorporação de timidina tritiada por essas células, num período de 24 horas. A chalcona I não apresentou citotoxicidade estatisticamente significativa em esplenócitos em concentrações abaixo de 336,0  $\mu\text{M}$ . Já a chalcona II apresentou maior citotoxicidade, com diminuição significativa da incorporação de timidina em valores acima de 39,12  $\mu\text{M}$ . Em esplenócitos tratados com escandenina não foi verificada uma diminuição significativa na incorporação de timidina em concentrações menores que 153,33  $\mu\text{M}$ .



**Figura 9.** Avaliação da citotoxicidade da Chalcona I em esplenócitos *in vitro*. Após 24 horas de incubação não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com a chalcona I nas concentrações de 4,15  $\mu$ M, 12,44  $\mu$ M, 37,3  $\mu$ M e 112,0  $\mu$ M. Houve apenas diferença estatisticamente significativa na concentração de 336,0  $\mu$ M (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Fig  
ura

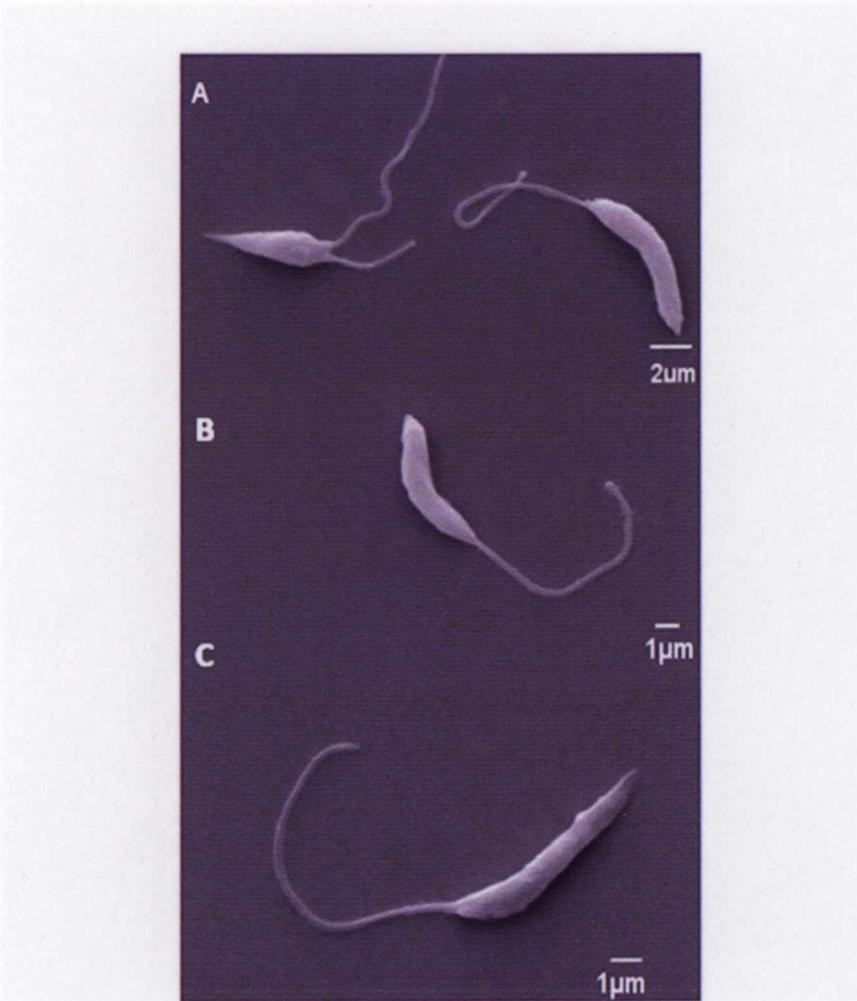
10. Avaliação da citotoxicidade da Chalconas II em esplenócitos *in vitro*. Após 24 horas de incubação não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com a chalcona II nas concentrações de 4,35  $\mu$ M e 13,04  $\mu$ M. A partir da concentração 39,12  $\mu$ M houve diferença estatisticamente significativa (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Figura 11. Avaliação da citotoxicidade da escandénina em esplenócitos *in vitro*.** Após 24 horas de incubação pode-se observar que não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com escandénina nas concentrações de 5,68  $\mu M$ , 17,04  $\mu M$  e 51,11  $\mu M$ . A partir da concentração de 153,33  $\mu M$  houve diferença estatisticamente significativa (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ).

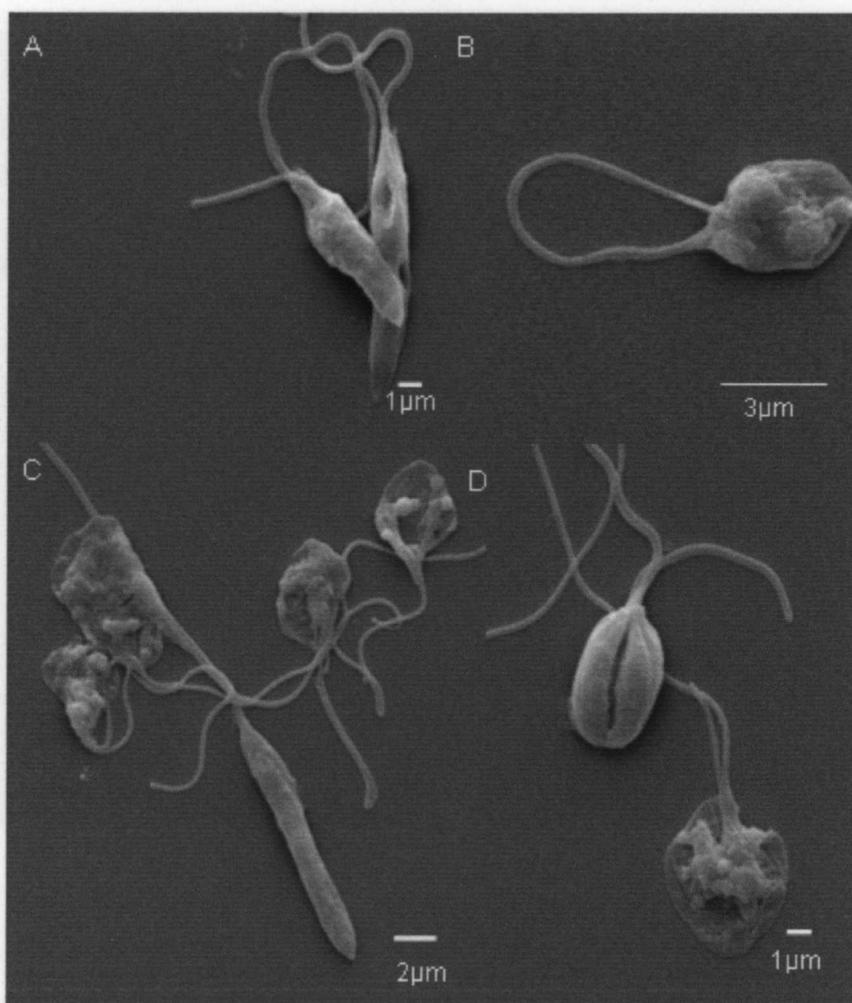
#### **5.4. Avaliação dos efeitos dos compostos Escandenina e Chalcona I e II através da Microscopia de Varredura.**

Para entender melhor os efeitos da escandenina e das chalconas I e II em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, nós incubamos as células em ausência e presença de 8,6  $\mu\text{M}$  da chalcona I, 22  $\mu\text{M}$  da chalcona II e 5,5  $\mu\text{M}$  da escandenina por 24 horas. As células controle apresentaram morfologia sem alteração na superfície de membrana (Figura 11 A-C). Os tratamentos com as chalconas I e II e escandenina promoveram alterações na morfologia dos parasitos com corrugação de superfície e desorganização da arquitetura celular (Figura 12, 13 e 14). Nas figuras 12 (A) 13 (B e D) e 14 (C) foram observados processos de divisão celular, caracterizado não apenas pela lobulação do corpo celular do parasito, como também pela presença de duplicação flagelar.

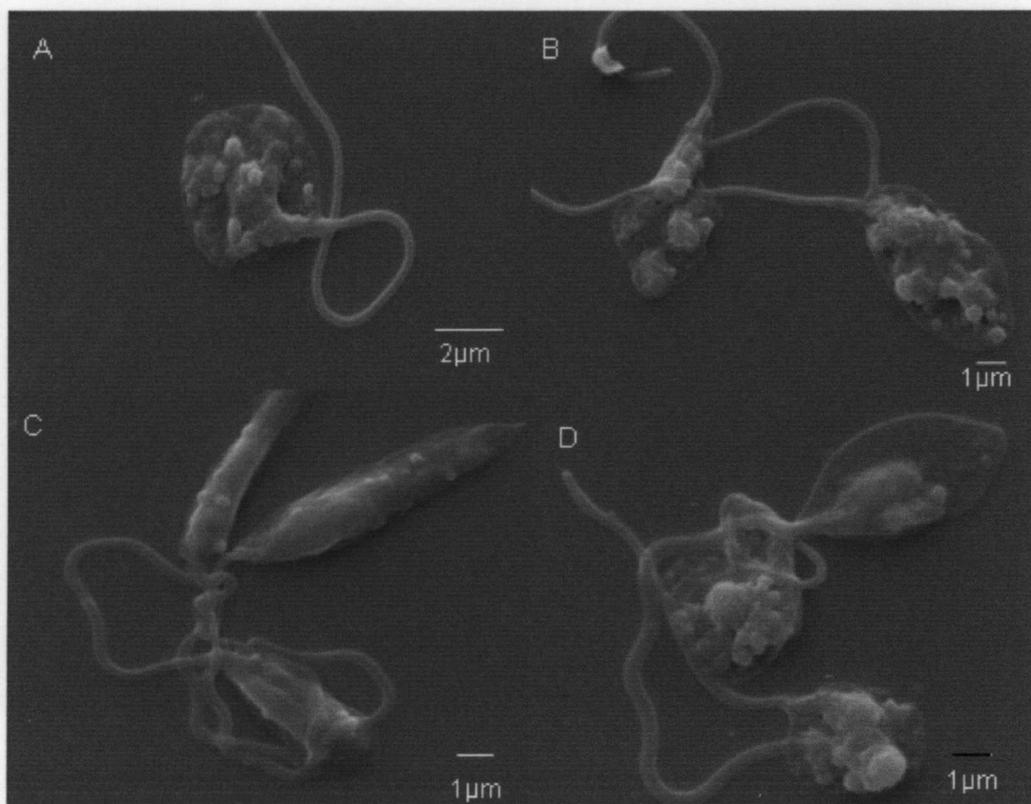


**Figura 12.** Controle de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. (A-C)

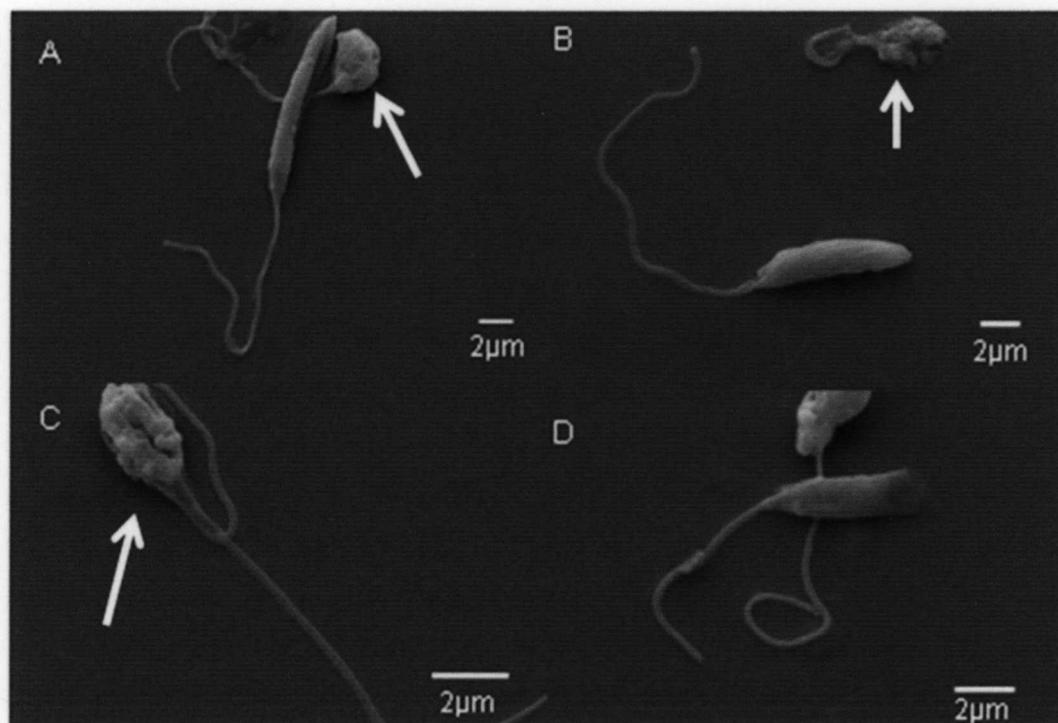
Células controle apresentando morfologia normal, sem alteração na superfície celular.



**Figura 13.** Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzidas pelo tratamento com chalcona I em uma concentração de  $8,6 \mu\text{M}$  por 24 horas. Em A-D notamos alteração na morfologia dos parasitos com corrugação de superfície e desorganização da arquitetura celular. Foram observados parasitos durante a citocinese (D), caracterizada pela lobulação do corpo celular do parasito. Foram observados perda do conteúdo citoplasmático do parasito, indicada pela grande redução do volume do corpo celular (B – D).



**Figura 14.** Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzidas pelo tratamento com chalcona II em uma concentração de 22  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Em A-D notamos alteração na morfologia dos parasitos com inúmeras conrrugações na superfície celular do parasito. Várias células exibiram componente citoplasmático, (Figuras A, B e D), presumivelmente evidenciando necrose dos parasitos tratados. Nas figuras B e D são observados processos de divisão celular.

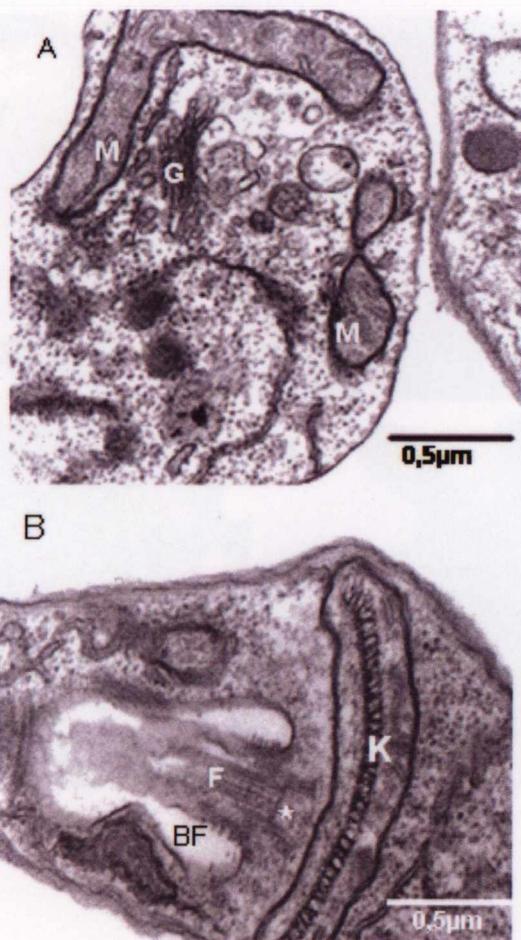


**Figura 15.** Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* induzidas pelo tratamento com escandénina 5,5  $\mu\text{M}$  por 24 horas. Em A, B, C e D foi observado alteração na morfologia dos parasitos, com corrugação de superfície e desorganização da arquitetura celular. A redução do volume celular (Figuras. A-C, setas) indica perda do conteúdo citoplasmático, provavelmente em processo necrótico.

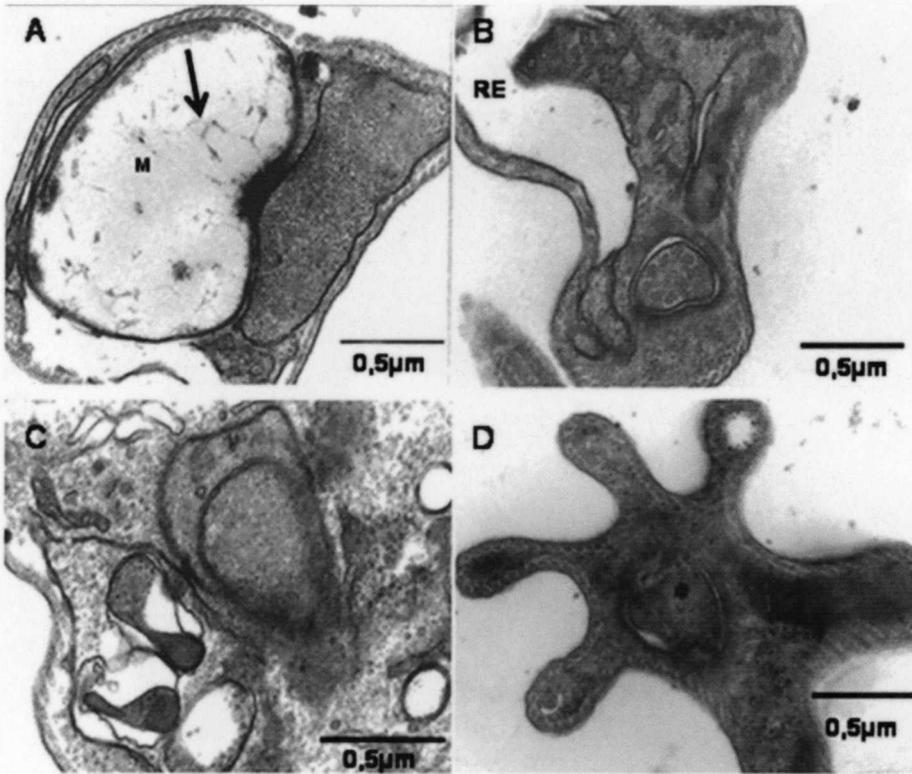
## 5.5. Avaliação ultraestrutural dos efeitos dos compostos Escandenina e Chalconas I e II através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para entender melhor os efeitos da escandenina e chalconas I e II em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, nós incubamos as células em ausência e presença de 8,6  $\mu\text{M}$  de chalcona I, de 22  $\mu\text{M}$  de chalcona II e de 5,5  $\mu\text{M}$  de escandenina por 24 horas. Células controle apresentam ultraestrutura normal (Figuras. 16 A e B). O cinetoplasto, a bolsa flagelar (Figura. 16 B), o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático foram observados (Figura. 16 A). Em parasitos tratados com chalcona I na concentração de 8,6  $\mu\text{M}$  por 24 horas foi observado alteração mitocondrial, com presença de fragmentos de DNA (Figura. 17A), dilatação do retículo endoplasmático (RE) (Figura. 17B), e amplas invaginações de membrana dão aspecto estrelados as seções transversais dos parasitos (Figura. 17D).

O tratamento das células com a chalcona II na concentração de 22  $\mu\text{M}$  por 24 horas induziu a dilatação do complexo de Golgi (G), alteração da mitocôndria, com presença de traços de DNA (Figura. 18A), dilatação do cinetoplasto (K) (Figuras 18B, C, D); presença de inclusões lipídicas (Figura 18B, L) e dilatação da bolsa flagelar (Figura. 18D). Já na ultraestrutura de parasitos tratados com escandenina na concentração de 5,5  $\mu\text{M}$  por 24 horas, observamos além de alteração mitocondrial (Figura. 19A) alteração na bolsa flagelar (Figura. 19D).



**Figura 16. Avaliação ultraestrutural de formas promastigota *L. (L.) amazonensis*.** (A) e (B) Células controle apresentando ultraestrutura normal. Estão bem característicos o cinetoplasto (K), flagelo (F) e corpúsculo basal (\*). Mitocôndria (M), bolsa flagelar (B F), Complexo de Golgi (G).



**Figura 17.** Alterações ultraestruturais de parasitos tratados com chalcona I na concentração de  $8,6 \mu\text{M}$  por 24 horas. O tratamento induziu alteração da mitocôndria, com presença de fragmentos de DNA (seta); (A), dilatação do retículo endoplasmático (RE) (B) e amplas invaginações de superfície, produzindo um perfil transversal asteromorfo (D).

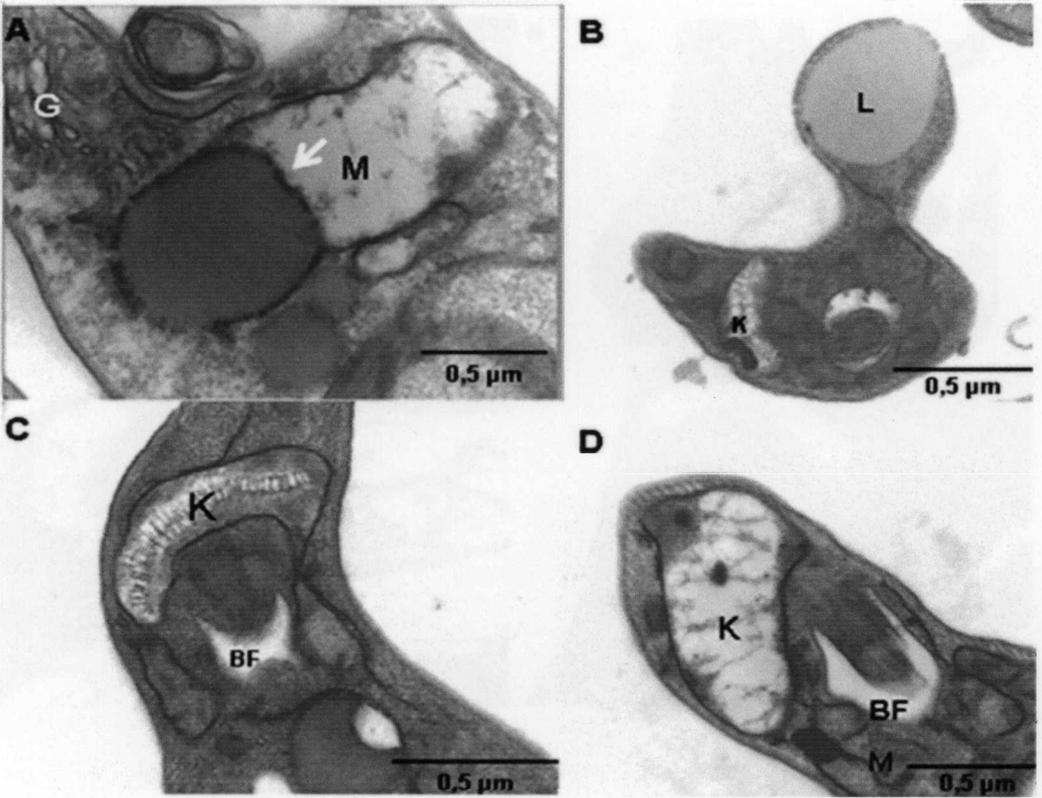
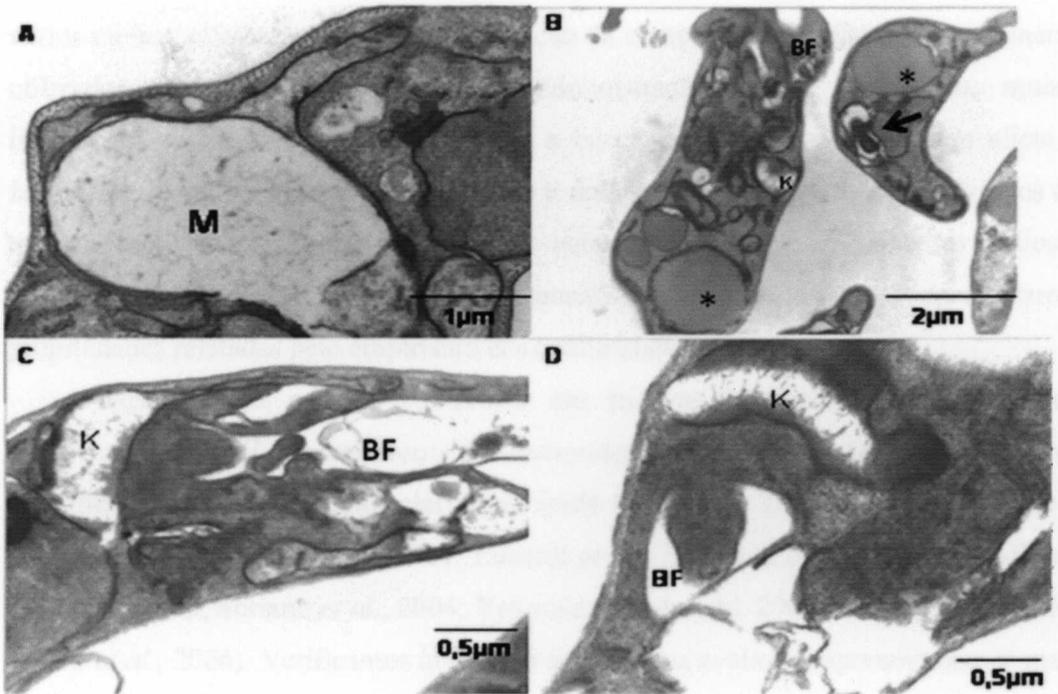


Figura 18. Alterações ultraestruturais de parasitos tratados com chalcona II na concentração de 22 μM por 24 horas. O tratamento induziu a dilatação de cisternas de golgi (G), dilatação de um compartimento delimitado por membrana contendo um material amorfo eletrodense, possivelmente de natureza lipídica e uma área eletrólucida (seta) contendo um material filamentoso possivelmente remanescente do kDNA (A), dilatação e redução da eletrondensidade do cinetoplasto (K) (B, C e D) e presença de inclusões lipídicas capazes de deformar substancialmente os parasitos (B, L).



**Figura 19.** Alterações ultraestruturais de parasitos tratados com escandena na concentração de 5,5  $\mu\text{M}$  por 24 horas. O tratamento induziu alteração da mitocôndria (A), formação de volumosas inclusões lipídicas associadas com o retículo endoplasmático (\*B), aparecimento de cisternas de membrana aparentemente do retículo endoplasmático englobando porções do citoplasma (seta, B) e redução da densidade do DNA mitocondrial (K) e dilatação da bolsa flagelar (BF, C e D).

## 6. DISCUSSÃO

Como referido anteriormente, a terapêutica para as leishmanioses apresenta vários efeitos colaterais, sobretudo em função da composição dos fármacos atualmente utilizados, além das dificuldades de administração destes. Com isso, muitas investigações têm sido incentivadas para a busca de novos compostos que aliem a facilidade de administração, o baixo custo e redução dos efeitos adversos advindos da terapêutica. Neste ínterim, os produtos naturais constituem ferramentas valiosas utilizadas pelas ciências e indústria farmacêutica em função de já apresentarem propriedades relatadas pelo empirismo das comunidades.

Neste estudo pode-se comprovar em triagem a eficiência na inibição da proliferação de *L. (L.) amazonensis* por compostos flavonóides confirmando os relatos científicos acerca do seu potencial microbicida (Peterson e Dwyer, 1998; Harborne e Willians, 2000; Olivella *et al.*, 2001; Lunardi *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Rice-Evans & Packer, 2003; Soriano *et al.*, 2004; Yokomizo & Moriaki, 2006; Ferreira *et al.*, 2006; Piñero *et al.*, 2006). Verificamos que todos os fármacos avaliados apresentaram-se mais eficientes na inibição da proliferação de *Leishmania* na concentração de 50  $\mu$ M do que relação ao pentostam, droga de primeira escolha no tratamento. Tal fato traz a motivação de que estes compostos possam ser referidos como potenciais para avaliações em amastigotas e *in vivo*.

A chalcona I e a escandenina inibiram completamente a capacidade proliferativa de promastigotas de *Leishmania* na concentração de 50  $\mu$ M em 24 horas, bem como produziram modificações ultraestruturais. A chalcona II, apesar de ter apresentado uma inibição de 67 % nestas condições também pode ser considerada promissora, uma vez que sua estrutura se assemelha a da chalcona I e tal fato traz possibilidades, ainda não reveladas neste estudo, de que outros substituintes agregados à sua configuração espacial possam potencializar seu efeito leishmanicida.

O potencial leishmanicida do grupo das chalconas é bastante conhecido na literatura (Lunardi *et al.*, 2003; Hermoso *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003; Piñero *et al.*, 2006). Contudo, vale ressaltar que as chalconas abordadas neste estudo tem atividade leishmanicida inétda.

A escandenina, por sua vez, é um fármaco da classe dos isoflavonóides. Além disso, é importante destacar que, assim como as chalconas avaliadas neste estudo, a ação leishmanicida da escandenina nunca foi mencionada na literatura científica.

A avaliação da suscetibilidade parasitária revelou efeito dose-dependente das chalconas I e II e escandenina sendo que a chalcona I foi mais eficaz em relação à chalcona II na concentração de 25  $\mu\text{M}$ , apresentando inibição de 89% e 55,6%, respectivamente. Tal constatação pode ter sido devido à diferença de polaridade que existe entre estes compostos com a chalcona I apresentando como substituinte o radical metil no carbono 5, enquanto a chalcona II apresenta na mesma posição um hidrogênio, contribuindo para uma maior difusão deste composto pela membrana plasmática do parasito e pela permeabilidade pode, presumivelmente atingir o compartimento citoplasmático e afetar sua viabilidade. De acordo com Liu *et al.* (2003), o potencial leishmanicida das chalconas pode estar relacionado com a presença de hidroxilas na cadeia aromática 1B tornando-as mais lipossolúveis.

A proliferação do protozoário foi comprometida em 60% nos testes com escandenina na concentração de 7,5  $\mu\text{M}$ , sendo que a maior concentração testada (15  $\mu\text{M}$ ) inibiu 100%. Tendo em vista sua capacidade de inibição proliferativa aqui avaliada, pode vir a constituir mais uma possibilidade terapêutica no arsenal de drogas utilizadas para leishmaniose. Além disso, devemos destacar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com chalcona I e com chalcona II como também entre o controle e as células tratadas com escandenina.

A concentração em que os fármacos inibem 50% da proliferação celular foi avaliada, sendo que a chalcona I e a escandenina apresentaram  $\text{IC}_{50}$  menor que 10  $\mu\text{M}$  (8,6  $\mu\text{M}$  e 5,5  $\mu\text{M}$ , respectivamente) e a chalcona II teve  $\text{IC}_{50}$  de 22  $\mu\text{M}$ . Nossa referencia a este evento advém, sobretudo da possibilidade de se realizar ensaios de combinações com as drogas usualmente empregadas o que pode resultar em eventos de sinergismo e /ou adição do efeito já bem caracterizado dos antimoniais (pentostam e glucantime) aplicados no tratamento das leishmanioses.

Sabendo-se que os fármacos em estudo apresentam efeito leishmanicida dose-dependente, avaliamos a citotoxicidade destes em cultura de esplenócitos, sendo que em esplenócitos tratados com chalcona I não foi verificada uma diminuição na incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina em células tratadas com até 112  $\mu\text{M}$ , porém na concentração de 360  $\mu\text{M}$ , houve diferença estatisticamente significativa (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) em relação ao controle. Apesar disso, o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado para promastigotas de *Leishmania* (i.e. 8,6  $\mu\text{M}$ ) está muito abaixo dos níveis que causam citotoxicidade nestas células de mamíferos

Em esplenócitos tratados com a chalcona II não houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com as concentrações de 4,35  $\mu\text{M}$  e 13,04  $\mu\text{M}$ , portanto nestas concentrações não houve uma diminuição da incorporação da timidina tritiada. Porém, a partir da concentração 39,12  $\mu\text{M}$  houve diferença estatisticamente significativa (\*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ ), Apesar disso, o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado para promastigotas de *Leishmania* (i.e. 22  $\mu\text{M}$ ) está muito abaixo das concentrações citotóxicas para células de mamíferos.

Já em esplenócitos tratados com escandenina não foi verificada uma diminuição na incorporação de timidina, portanto não havendo uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e as células tratadas com as concentrações de 5,68  $\mu\text{M}$ , 17,04  $\mu\text{M}$  e 51,11  $\mu\text{M}$ . Contudo, a partir da concentração 153,33  $\mu\text{M}$ , houve diferença estatisticamente significativa (\*\*  $p < 0,01$ ) e 460  $\mu\text{M}$  (\*\*\*)  $p < 0,001$ ), ocorreu uma pequena diminuição da incorporação de timidina tritiada. Apesar disso, o valor de  $\text{IC}_{50}$  encontrado para promastigotas de *Leishmania* (i.e. 5,5  $\mu\text{M}$ ) está muito abaixo dos níveis que provocam citotoxicidade nestas células de mamíferos.

A microscopia eletrônica de transmissão foi utilizada como instrumento para a elucidação dos efeitos microbicidas das chalconas I e II e escandenina, através da observação da ultraestrutura celular do parasito. Em células tratadas com 8,6  $\mu\text{M}$  de chalcona I, 22  $\mu\text{M}$  de chalcona II e 5,5  $\mu\text{M}$  de escandenina por 24 horas observamos alteração da mitocôndria, com presença de fragmentos do kDNA. Este efeito compromete o metabolismo oxidativo do parasito com a inibição do consumo de oxigênio, produção do  $\text{CO}_2$  pelo parasito e provavelmente inibição da desidrogenase mitocondrial e da enzima fumarato redutase (FRD). A perturbação da homeostase mitocondrial devido à atividade antiproliferativa destas drogas leva a uma diminuição nos níveis de ATP, podendo levar a uma série de fenômenos com inibição da duplicação de DNA, transcrição e tradução. Além disso, a ação destes compostos sobre a estrutura e função mitocondrial tem importância na quimioterapia, uma vez que esta organela em *Leishmania* é afetada por várias drogas com atividade microbicida (Vannier-Santos *et al.*, 1995; Zhai *et al.*, 1995; Delolorenzi *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2002).

Além da licochalcona A, a paramomicina (Maarouf *et al.*, 1997) e a DMC (2', 6'-diidroxí-4-metoxichalcona), isolada da planta *Piper aduncum* (Torres-Santos, 1999) também afetam a viabilidade mitocondrial.

A literatura revela a ação leishmanicida de chalconas (Chen *et al.*, 1993) atuando principalmente na ultraestrutura de mitocôndrias alterando possivelmente o seu

metabolismo oxidativo com a inibição da enzima fumarato redutase (FRD) pela licochalcona (Chen *et al.*, 2001). Além da licochalcona A, a paramomicina (Maarouf *et al.*, 1997) e a DMC (2', 6'-diidroxí-4-metoxichalcona), isolada da planta *Piper aduncum* (Torres-Santos, 1999) também afetam a viabilidade mitocondrial.

A FRD é uma enzima ausente em células de mamíferos, presente em algumas bactérias como a *Escherichia coli* (Ge *et al.*, 2000), em protozoários como *Trypanosoma* (Christimas *et al.*, 2000) *Leishmania* (Santhamma, 1995) e helmintos (Hata-Tanaka *et al.*, 1988), portanto pode funcionar como ferramenta na identificação de drogas contra leishmanioses sem afetar a viabilidade das células de seus hospedeiros mamíferos.

A FRD é uma enzima chave para o metabolismo energético de *Leishmania*, diferente de células de mamíferos em que o succinato é convertido a fumarato pela succinato desidrogenase e, logo em seguida, em malato pela fumarase para refazer o ácido oxalacético. Em *Leishmania* o malato volta à mitocôndria, onde é convertido em fumarato pela fumarase e em seguida convertido em succinato pela FRD (Blum, 1994).

Além de alterações na mitocôndria, a chalcona I promoveu à dilatação do retículo endoplasmático (RE) e amplas invaginações de superfície, produzindo um perfil transversal asteromorfo devido, provavelmente, a desestruturação do citoesqueleto, estrutura microtubular, do parasito.

Estudos acerca do efeito de agentes antimicrotubulares mostram a importância destes elementos do citoesqueleto enquanto possíveis alvos para compostos leishmanicidas, uma vez que perturbações na arquitetura celular podem interferir na sobrevivência do protozoário. Segundo Havens *et al.* (2000) o potencial de agentes antimicrotubulares, a exemplo do taxol, atua na organização da tubulina leishmanial inibindo a proliferação de promastigotas de *L. (L.) donovani*, uma vez que a partição do DNA nuclear e a citocinese apresentaram-se comprometidos.

A tubulina é um dos mais abundantes componentes protéicos dos microtúbulos em *Leishmania* e os microtúbulos estão relacionados a diversos eventos celulares tais como a manutenção da forma da célula, bem como motilidade celular, mitose e transporte de organelas (Gull, 2001; Kohl *et al.*, 2003; Dantas *et al.*, 2003).

Aspectos relevantes à organização estrutural do protozoário também foram referidos no estudo de Borges *et al.* (2005) que utilizou vinblastina como composto antimicrotubular. Assim, como a tubulina, outros elementos de citoesqueleto, podem ser alvos para várias drogas usadas no tratamento de câncer e infecções fúngicas. A

elucidação de efeitos celulares de conhecidos elementos interferentes da organização dos microtúbulos pode ser importante nas avaliações de alternativas terapêuticas no tratamento da leishmaniose.

Vale salientar que as modificações da organização do citoesqueleto contribuem para elucidação da biologia celular do protozoário mostrando a importância de componentes de ordem estrutural do parasito na manutenção de sua sobrevivência.

O tratamento com chalcona II também induziu a dilatação do complexo de golgi e presença de inclusões lipídicas, sugerindo uma possível alteração no tráfego de vesículas e glicosilações de proteínas provenientes do retículo endoplasmático rugoso. O material amorfo eletrodense observado pode ser produto de autofagia se for retículo ou mitofagia ou mitopitose se for kDNA.

Autofagia é um processo utilizado pelas células para requerimento da homeostasia através da degradação do citoplasma ou eliminação de organelas defeituosas. Resposta a condição de estresse, como por exemplo, limitação de nutrientes (Takeshige *et al.*, 1992) e acúmulo de proteínas no retículo endoplasmático (Yorimitsu *et al.*, 2006) podem levar a mecanismo de autofagia.

A presença de inclusões lipídicas pode ser atribuída a alterações na biossíntese de precursores de esterol a exemplo do esqualeno, cujo aumento de sua concentração pode contribuir com o acúmulo de lipídios causando distúrbios na membrana celular (Ryder, 1992). De acordo com Lefurgey (1990), a deposição de lipídios pode ser uma conseqüência da ruptura e digestão da membrana devido à lipoperoxidação causada pelos radicais livres liberados a partir de distúrbios mitocondriais. De acordo com Ferreira *et al.* (2006), esta peroxidação lipídica atinge todos os componentes celulares, contudo as membranas celulares são um dos componentes mais atingidos pelas espécies reativas de oxigênio. Estes eventos podem contribuir com alterações na estrutura e permeabilidade da membrana levando a perda de seletividade iônica, liberação de conteúdo das organelas até a morte celular (Pletjushkina *et al.*, 2006).

O tratamento com escandenina também induziu alteração na bolsa flagelar, sugerindo alterações no mecanismo de transporte de vesículas uma vez que essa é a única região responsável pela exocitose e endocitose em *Leishmania* (Landfear & Ignatushchenko, 2001).

A elucidação dos efeitos microbicidas de chalconas I e II e da escandenina foi possibilitada também pela microscopia eletrônica de varredura, através da observação da topografia de superfície celular do parasito. Em células tratadas com 8,6  $\mu\text{M}$  de

chalcona I, 22  $\mu\text{M}$  de chalcona II e 5,5  $\mu\text{M}$  de escandenina por 24 horas observamos, corrugação de superfície e desorganização da arquitetura celular. Em células tratadas com chalcona I observamos também o aspecto estrelado dos parasitos em corte transversal, possivelmente em decorrência do colapso do periplasto ocasionado pela perda do conteúdo citoplasmático caracterizado pela lobulação do corpo celular do parasito.

O conjunto de resultados aqui relatados e brevemente discutidos parece indicar que a abordagem da avaliação biológica de chalconas e escandenina sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* pode prover valiosa estratégia terapêutica para as leishmanioses cabendo a partir de então novos ensaios de caráter *in vivo* para avaliar os possíveis efeitos de tais fármacos sobre órgãos profundos, alvo do processo de infecção por este protozoário.

## 7. CONCLUSÕES

7.1 – As chalconas I e II e a escandenina mostraram-se eficazes na inibição dose-dependente da proliferação e/ ou na sobrevivência de formas promastigotas de *Leishmania (L) amazonensis*;

7.2 - A escandenina afetou a viabilidade do parasito em concentrações molares menores do que aquelas utilizadas com as chalconas I e II ;

7.3 - Esplenócitos tratados com escandenina e chalconas I e II não sofreram diminuição da incorporação da timidina tritiada, em concentrações próximas ao IC<sub>50</sub>;

7.4 - A chalcona I foi mais efetiva na inibição da proliferação dos parasitos do que a chalcona II;

7.5 - O tratamento com estas drogas promoveu principalmente alteração mitocondrial;

7.6 - Os resultados apresentados neste trabalho apontam mais uma abordagem na terapia contra a leishmaniose. Estudos para a avaliação dos efeitos de chalconas I e II e da escandenina *in vivo* se colocam como perspectiva em nosso trabalho.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLUWALIA, B. I.; CARYN, B.; CRISTIANE, C.; TANGIN, A.; RAJIB, C.; MUSTAKIM, A.; DIDARUL, A.; EBEN, K.; JOSEF, A.; MEGHLA, I.; YUKIKO, W.; RASHIDUL, H.; ROBERT, F. B.; JAMES, H. M. Visceral leishmaniasis: consequences of a neglected disease in a bangladeshi community. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 69(6): 624-628, 2003.
- ALVAR, J.; CANAVATE, C.; GUTIERREZ-SOLAR, B.; JIMENEZ, M.; LAGUNA, F.; LOPEZ-VELEZ, R.; MOLINA, R. & MORENO, J. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. **Clin. Microbiol. Rev.**, 10: 298-319, 1997.
- ARTHUR, G.; BITTMANR. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. **Biochim. Biophys. Acta**, 1390: 85-102, 1998.
- ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol.**, 30: 1269-81, 2000.
- BATES, P. A.; ROBERTSON, C. D.; COOMBS, G. H. Expression of cysteine proteinases by metacyclic promastigotes of *Leishmania mexicana*. **J. Eukaryot Microbiol**, 41: 199-203, 1994.
- BASSELIN, M.; LAWRENCE, F. & ROBERT-GERO, M. Altered transport properties of pentamidine-resistant *Leishmania donovani* and *L. amazonensis* promastigotes. **Parasitol. Res.**, 83: 413-418, 1997.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATA, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44: 536-546, 1991.
- BEACH, D. H.; GOAD, J. L.; HOLZ, G.G. JR. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 31: 149, 1988.
- BERMAN, J. D.; WADDELL, D. & HANSON, B. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 27: 916-920, 1985.
- BERMAN, J. D.; GALLALEE, D & BEST, J. M. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. **Biochem. Pharmacol.**, 36: 197-201, 1987.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 year. **Clin. Infect. Dis.**, 24: 684-703, 1997.
- BERMAN, J. D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, 11: 707-710, 1998.

- BEZERRA, J. L. et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, 16: 631-637, 2006.
- BIANCIARDI, P.; FASANELLA, A.; FOGLIA MANZILLO, V.; TROTTA, T.; PAGANO, A.; SORINO, S.; GRADONI, L.; OLIVA, G. The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. **Parasitol. Res.**, 93: 486-492, 2004.
- BLANCHETTE, J.; RACETTE, N.; FAURE, R.; SIMINOVITCH, K. A.; OLIVER, M. Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation. **Eur. J. Immunol.**, 29: 3737-3744, 1999.
- BLUM JJ. Energy metabolism in *Leishmania*. **J. Bioenerg. Biomembr.**, 26:147-55, 1994.
- BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J. Exp. Med.**, 191: 2121-2130, 2000.
- BORGES, V. M.; LOPES, U. G.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M. A. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitol. Res.**, 95: 90-96, 2005.
- BRAJTBURG, J.; BOLARD, J. **Clin. Microbiol. Ver.**, 9: 512, 1996.
- BRANDÃO. T. C. S. C.; ALVES, E.S.S.; SOUZA-NETA, L.C. ; RANGEL, A. L. ; GUARÉ CRUZ, F. ; MARTINS, D. ; VANNIER-SANTOS, M. A. XXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/ XXXIII. **Reunião Anual de Pesquisa Básica de Doença de Chagas**, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. **Taxa de incidência leishmaniose tegumentar americana**. 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/>>. Acesso em: 20/dez/2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. **Taxa de incidência leishmaniose tegumentar americana**. 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0204.def>>. Acesso em: 20/dez/2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde/Serviço de Vigilância Sanitária. Sistema Nacional de Agravos e Notificações. **Taxa de incidência leishmaniose visceral**. 2005. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2006/d0205.def>>. Acesso em: 20/dez/2008.
- CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J. Ethnopharmacol.**, 22: 131-4, 2005.
- CANIATO, R.; PURICELLI, L. Natural antimalarial agents. **Crit. Rev. Plant Sci**, 22: 79-105, 2003.

- CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Nature leadership against an ancient disease. 2001.
- CHAKRABORTY, A. K. & MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 152: 605-601, 1988.
- CHANG, K.P., FONG, D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. **Ciba Found Symp.**, 99: 113-37, 1983.
- CHANG, K. P. Cell Biology of *Leishmania*. In Modern Parasite Biology Cellular, Immunological and Molecular Aspects. D. W. Wyler, ed. (New York: Freeman Press): 79-90, 1990.
- CHANG, K. P. *Leishmania* virulence and genetic heterogeneity. **Clin. Dermatol.**, 17: 269-273, 1999.
- CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a Novel Antiparasitic agent With Potent Activity against Human Pathogenic Protozoan Species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 37(12): 2550-2556, 1993.
- CHEN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; BLOM, J.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of Fumarate Reductase in *Leishmania major* and *L.donovani* by Chalcones **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45(12): 2023-2029, 2001.
- CHRISTMAS, P.B., TURRENS, J.F. Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 15: 225-8, 2000.
- CHULAY, J. D., FLECKENSTEIN, L. & SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 69-72, 1988.
- CROFT, S.L.; BRAZIL RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* "in vitro". **Ann Parasitol. Med. Trop.**, 76: 37-43, 1982.
- CROFT, S.L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. J. **Antimicrob. Chemother.**, 38: 1041, 1996.
- CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol.**, 19(11): 502-508, 2003.
- CROFT, S. L; YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharm.**, 8(4): 319-342, 2002.
- CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop. Med. Int. Health**, 6: 899-905, 2001.

- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clin. Microbiol.**, 119(1): 111-26, 2006.
- CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anti-cancer alkylsophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **J. Antimicrob. Chemother.**, 38: 1041-1047, 1996.
- CUPOLITO, E., GRIMALDI, J.R., G & MOMEM, H. A general classification of new world *Leishmania* using numerical zymotaxomy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50: 296-311, 2000.
- DANTAS, AP.; BARBOSA, H.S.; DE CASTRO, S.L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.**, 35:287-294, 2003
- DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; DA CUNHA PINTO, A.; HENRIQUES, A. T.; BOU-HABIB, D. C.; SARAIVA, E. M. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 1349-1354, 2001.
- DEJARDINS, M. Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. **Trend. Cell. Biol.**, 5: 183-186, 1995.
- DEJEUX, P. **Information on the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory.** WHO Bull, WHO/LEISH/91.30.1990.
- DEJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 27: 305-318, 2004.
- DEWICK, P.M., Medicinal Natural products a biosynthetic approach. Edição: 2, **John Wiley & Sons, England**, 2002.
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N. Acidocalcisome: A novel Ca<sup>2+</sup> storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol. Today.**, 15: 443-8, 1999.
- DOCAMPO, R., MORENO, S.N. The acidocalcisome. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 114: 151-9, 2001.
- EUE, I.; ZEISING, R.; ARNDT, D. Alkylphosphocoline-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, 12: 350-356, 1995.
- FEHLBERG, I. Dissertação de Mestrado (Química Orgânica – UFBA): Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Antimicrobianas e Antiparasitárias das Substâncias Isoladas de *Myrcia guianensis* (Myrtaceae). **Universidade Federal da Bahia**, 2006.
- FERREIRA, A. C. F.; NETO, J. C.; da SILVA, A. C. M.; KUSTER, R. M.; CARVALHO, D. P. Inhibition of Thyroid Peroxidase by *Myrcia uniflora* Flavonoids. **Chem Res. Toxicol.**, 19: 351-355, 2006.

- FISCHER, C.; VOSS, A.; ENGEL, J. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, 190: 85-87, 2001.
- FOKIALAKIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; TEKWANI, B. L.; SKALTSOUNIS, A. L.; DUKE, S. O. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus sp.* and semisynthetic derivatives thereof. **Biol. Pharm. Bull.**, 29 (8): 1775-1778, 2006.
- FOURNET, A., ANGELO, A., MUÑOZ, V., ROBLLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. **J. Ethnopharmacol.**, 37: 159-64, 1992.
- FRANÇA, F.; CUBA, C. A.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; DAS VIRGENS, M. D. E. L.; MARSDEN, P. D. An evaluation of the effect of a bark extract from the cashew (*Anacardium occidentale* L.) on infection by *Leishmania Viannia braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 26 (3): 151-155, 1993.
- FREZARD, F.; DEMICHELLI, C.; FERREIRA, C. S. & COSTA, M. A. Glutathione-induce conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 913-916.
- FUNASA. **Bol. Eletr. Epidemiol.**, 1 (1): 12.03.2001.
- GANGNEUX, J. P. Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities **Presse Med.**, 28 (37): 2057-66, 1999.
- GASSER, J. R. R. A.; MAGILL, A. J.; OSTER, N.; FRANKE, E. D.; GROGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, 18: 83-90, 1994.
- GE, Z., FENG, Y., DANGLER, C.A., XU, S., TAYLOR, N.S., FOX, J.G. Fumarate reductase is essential for *Helicobacter pylori* colonization of the mouse stomach. **Microb Pathog.**, 29: 279-87, 2000.
- GOODWIN, L. G.; PAGE, J. E. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochem. J.**, 22: 236-240, 1943.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.**, 33: 1027-1034, 2003.
- GOTTLIEB, O. R.; DA SILVA, M. L.; MAIA, J. G. S. Eucalyptin from *Eugenia* and *Myrcia* species. **Phytochemistry**, 11 (3): 1185, 1972.
- GRIMALDI, G. R. & TESH, R. B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, 6: 230-250, 1993.
- GULL, K. Protist tubulins: new arrivals, evolutionary relationships and insights to cytoskeletal function. **Curr. Opin. Microbiol.**, 4: 427-432, 2001

- HARBORNE, J. B. Flavonoids and evolution of the angiosperms. **Biochem. Syst. Ecol.**, 5: 7-22, 1977.
- HARBORNE, J. B. The Flavonoids: Advances in Research since 1986. **Chapman and Hall Ltd. New York, USA**, 1992.
- HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. The Flavonoids: Advances in Research. **Chapman and Hall Ltd. New York, USA**, 1982.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 52: 481-504, 2000.
- HAVENS, C. G.; BRYANT, N.; ASHER, L. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 110: 223-236, 2000.
- HATA-TANAKA, A., KITA, K., FURUSHIMA, R., OYA, H., ITOH, S. ESR studies on iron-sulfur clusters of complex II in *Ascaris suum* mitochondria which exhibits strong fumarate reductase activity. **FEBS Lett.**, 19:183-6, 1988.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Dermatol.**, 25: 363- 370, 2000.
- HERMOSO, A.; JIMÉNEZ, I. A.; MAMANI, Z. A.; BAZZOCCHI, I. L.; PIÑERO, J. E.; RAVELO, A. G.; VALLADARES, B. Antileishmanial Activities of Dihydrochalcones from *Piper elongatum* and Synthetic Related Compounds. Structural Requirements for Activity. **Bioorg. Med. Chem.**, 11: 3975-3980, 2003.
- IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today**, 10: 65-68, 1994.
- KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffi thii*. **Phytochemistry**, 50: 75-79. 1999.
- KOHL, L.; ROBINSON, D.; BASTIN, P. Novel roles for the flagellum in cell orphogenesis and cytokinesis of trypanosomes. **EMBO J.**, 22: 5336-5346, 2003.
- KUBAR, J.; QUARANTA, J. F.; MARTY, P.; LELIEVRE, A.; LE FICHOUX, Y.; AUFEUVRE, J. P. Transmission of *L. infantum* by blood donors. **Nat. Med.**, 34: 368, 1997.
- LAINSON, R. & SHAW, J. J. – Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. **Brit. med. Bull**, 28:44-8, 1972.
- LAINSON. R., SHAW, J. J., WARD, R.D., READY, P. D., NAIFF, R. D. Leishmaniasis in Brazil. XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará state. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**; 3: 239-42, 1979.
- LANDFEAR, S.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Mol. Biochem.Parasitol.**, 155: 1-17, 2001.
- LAPA, A. J. Importância da farmacologia tradicional e novas descobertas no estudo das plantas medicinais. **Ars Cvrandi**, 46-52, 1995.

LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GR OUSSON, D.; KUBAR, J. Short- and long- term efficacy of hexadecylphosphocoline against established *Leishmania infantum* infection in Balb/c mice. **J. Antimicrob. Chemother.**, 42: 654-658, 1998.

LEGARE, D., PAPADOPOULOU, B., ROY, G., MUKHOPADHYAY, R., HAIMEUR, A., DEY, S., GRONDIN, K., BROCHU, C., ROSEN, B. P. & OUELLETTE, M. Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite-resistant. **Exp. Parasitol.**, 87: 275-282, 1997.

LEFURGEY, A; INGRAM, P; BLUM, J. J. Elemental composition of polyphosphate-containing vacuoles and cytoplasm of *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 40: 77-86, 1990.

LIU, M.; WILAIRAT, P.; CROFT, S. L.; TAN, A. L.; GO, M. Structure-Activity Relationships of Antileishmanial and Antimalarial Chalcones. **Bioorganic Med Chem.**, 11: 2729-2738, 2003.

LIRA, R.; SUNDAR, S.; MKHARIA, A.; KENNEY, R.; GAM, A.; SARAIVA, E.; SACKS; D. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian Kala- Azar is due to the emergence of Antimonies- resistant strains of *Leishmania donovani*. **J. Infect. Dis.**, 180, 1999.

LUNARDI, F.; GUZELA, M.; RODRIGUES, A. T.; CORREA, R.; EGERMANGRICH, I.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C.; ASSREUDY, J.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A.R.S. Trypanocidal and Leishmanicidal Properties os Substitution-Containing Chalcones. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 47 (4): 1449-1451, 2003.

MAAROUF, M.; DE KOUCHKOVKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P. X. & ROBERTGERO, M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Exp. Cell Res.**, 232: 339-348, 1997.

MATHIAS, L. A.; EMILY, A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará – Brazil. **J. Ethnopharmacol.**, 40: 53-75, 1993.

MARTINY, A.; MEYER-FERNANDES, J.R.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M. A. Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania amastigotes*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 102: 1-12, 1999.

MARTINY, A.; VANNIER-SANTOS, M. A.; BORGES, V. M.; MEYER-FERNANDES, J. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; DE SOUZA, W. *Leishmania*- induced tyrosine phosphorylation in the host macrophage and its implication to infection. **Eur. J. Cell Biol.**, 71: 206-215, 1996.

MATTE, C.; MARQUIS, J. F.; BLANCHETTE, J.; GROS, P.; FAURE, R.; POSNER, B. I.; OLIVIER, M. Peroxovanadium-mediated protection against murine leishmaniasis: role of the modulation of nitric oxide. **Eur. J. Immunol.**, 30: 2555-2564, 2000.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic principles of natural medicines. V. Aldose reductase inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of myrciacitrins III, IV and V. **Chem. Pharmacol.**, 50 (3): 429-431, 2002.

- MARTINEZ, S.; GONZALEZ, M.; VERNAZA, M, N. Treatment of cutaneous leishmaniasis with allopurinol and stibogluconate. **Clin. Infect. Dis.**, 24: 165-169, 1997.
- MERCHAN-HAMANN, E.; ROSA, A. C. O.; MARSDEN, P. D. Ensaio terapêutico de uso de sulfonas no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **In: Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Manaus, resumo do Congresso de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 56, 1988.
- MOLL H. Epidermal Langerhans cell are critical for immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Today**, 14: 383-387, 1993.
- MOMENI, A. Z.; AMINJAVAHARI, M. Successful treatment of non-healing cases of cutaneous *leishmaniasis*, using a combination of meglumine antimoniate plus allopurinol. **Eur. J. Dermatol.**, 13: 40-43, 2003.
- MORAES, V. R. S. Estudo fitoquímico de *Deguelia hatschbachii* A. M. G. Azevedo- Isolamento, determinação estrutural, análise por CLAE e testes Biológicos. **Tese de Doutorado, Instituto de Química- UNICAMP, Campinas-SP**, 2000.
- MOREIRA, R. C. R.; REBÊLO, J. M. M.; GAMA, M. E. A.; COSTA, J. M. L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, 18: 187-195, 2002.
- MOREIRA, R. C. R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Rev. Bras. Farmacog.**, 17(1): 59-63, 2007.
- MOTTRAM, J. C. & COOMBS, G. H. *Leishmania mexicana*: subcellular distribution of enzymes in amastigotes and promastigotes. **Exp. Parasitol**, 59: 265-274, 1985.
- MUKHOPADHYAY, R., DEY, S., XU, N., GAGE, D., LIGHTBODY, J., OUELLETTE, M., ROSEN, B.P. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, 17: 10383-7, 1996.
- MUSKUS, C. E.; MARIN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomedica**, 22: 167-177, 2002.
- NAJIM, A. A. & GREENWAY, D. C. *Leishmania braziliensis* infection in nipple. **Br. Med. J.**, 290: 433-434, 1985.
- NANDAN, D.; REINER, S. L. Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with *Leishmania donovani*: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat 1. **Infect. Immun.**, 63: 4495-4500, 1995.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M.; **Parasitologia Humana**. 10a ed., Rio de Janeiro: Atheneu, 2000.
- NYAKUNDI, P. M.; MUIGAI, R. & WERE, J. B. Congenital visceral leishmaniasis: a case reports. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 82: 564, 1988.

OLIVELLA, M. S.; ZARELLI, V. E. P.; PAPPANO, N. B.; DE BATTISTA, N. B. A comparative study of bacteriostatic activity of synthetic hydroxylated flavonoids. **Brazilian J. Microbiol.**, 32: 229-232, 2001.

OLIVIER, M.; ROMERO-GALLO, B. J.; MATTE, C.; BLANCHETTE, J.; POSNER, B. I.; TREMBLAY, M. J.; FAURE, R. Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression. **J. Biol. Chem.**, 273(22): 13944-13949, 1998.

OLIVIER, M.; BADARÓ, R.; MEDRANO, F. J.; MORENO, J. The pathogenesis of leishmania/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 97: 79-98, 2003.

OMS – Organização Mundial de Saúde: Leishmania/HIV co-infecção sudoeste da Europa 1990-1998, WHO/LEISH/2000.42. Geneva: World Health Organization, 2000. Acessado em 12 jan 2009..

OMS – Organização Mundial de Saúde. Disease Leishmania. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>> acessado em 12 jan 2009..

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H. D.; CARDOSO, D. R. C.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de N-metil-glucamina 20mgSbV/kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. **Rev. Soc Bras. Med. Trop.**, 36: 365-371, 2003.

PAREDES, R.; MUNOZ, J.; DIAZ, I.; DOMINGO, P.; GURGUI, M.; CLOTET, B. Leishmaniasis in HIV infection. **J. Postgrad. Med.**, 49: 39-49, 2003.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BREARD, J. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 48: 852, 2004.

PERSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, 22: 1-13, 1996.

PLETJUSHKINA, O.YU.; LYAMZAEV, K. G.; POPOVA, E. N.; NEPRYAKHINA, O.K.; IVANOVA, O.YU.; DOMNINA, L. V.; CHERNYAK, B. V.; SKULACHEV, V. P. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. **Biochim. Biophys. Acta**, 1757: 518-524, 2006.

PEREZ-VICTORIA, J. M.; PEREZ-VICTORIA, F. J.; PARODI-TALICE, A.; JIMÉNEZ, I. A.; RAVELO, A. G.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Alkyllysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by anovel P-glycoprotein-like transporter modulator. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 45: 2468-2474, 2001.

PEREZ-VICTORIA, F. J.; SANCHEZ-CANETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resist. Updat.**, 9: 26-39, 2006.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321: 970-974, 2008.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nut. Res.**, 18 (12): 1995-2018, 1998.

PIÑERO, J.; TEMPORAL, R. M.; SILVA-GONÇALVES, A. J.; JIMÉNEZ, I. A.; BAZZOCCHI, I. L.; OLIVA, A.; PERERA, A.; LEON, L. L.; VALLADARES, B. New administration model of trans-chalcone biodegradable polymers for the treatment of experimental leishmaniasis. **Acta Tropica**, 98: 59-65, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. nova**, 25: 45-61, 2002.

PORTIGO, C.; LLAMAS, R.; ZARCO, C.; RUBIO, R.; PUNLIDO, F.; COSTA, J. R. & IGLESIAS, L. Cutaneous lesions in patients with visceral leishmaniasis and HIV infection. **J. Infect. Dis.**, 35: 265-268, 1997.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol.**, 39: 603-613, 2001.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPERONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte, 26: 550-553, 2003.

REY, L. Parasitologia, **Ed. Guanabara Koogan S.A.**, 214-266, 2001.

RICE-EVANS, C. A., & PACKER, L. Flavonoids in Health and Disease. Ed. Marcel Dekker, New York, 2003.

ROBERTS, W. L.; BERMAN, J. D., RAINEY, P. M. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39: 1234-1239, 1995.

ROBERTS, W. L. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 126: 129-142, 2003.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA FILHO, J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, 12: 514-535. 2005.

RODRIGUES, J. C.; ATTÍAS, M.; RODRIGUEZ, C.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22, 26-azasterol, a delta (24(25))-Sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 46: 487-499, 2002.

SACKS, D. L. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp. Parasitol.**, 69: 100-103, 1989.

- SAHA, A. K.; MUKHERJE, J.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 19: 195-200, 1986.
- SAIRAFIANPOUR, M.; CHRISTENSEN, J., STAERK, D.; BUDNIK, B. A.; KHARAZMI, A.; BAGHERZADEH, K.; JAROSZEWSKI, J.W. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1,2-quinones from *Perovskia abrotanoides*: new source of tanshinones. **J. Nat. Prod.**, 64(11): 1398-403, 2001.
- SAMPAIO, R. N. R.; MARSDEN, P.D. Mucosal *leishmaniasis* unresponsive to pentavalent antimonial therapy successfully treated with ambisome. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 91: 77-87, 1997.
- SAMPAIO, R. N. R.; LUCAS, I. C.; VELLOSO, A. Estudo comparativo entre azitromicina e n-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania amazonensis* em camudongos. **An. Bras. Dermatol.**, 81: 116, 2006.
- SANTHAMMA, K.R., BHADURI, A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 75: 43-53, 1995.
- SCHLEIN, Y. *Leishmania* and sandflies interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol.Today**, 9: 255-258, 1993.
- SERENO, D. & LEMESRE, J. L. *In vitro* life cycle of pentamidine- resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 41: 1898-1903, 1997.
- SILVA-VERGARA, M. L.; SILVA, L.A.; MANEIRA, F.R. Azitromicine in the treatment of mucosal leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 42: 175-177, 2004.
- SIMÕES, C. M. O.; MARIOT, A. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 2003.
- SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. **Med. Microbiol Immunol.**, in press, 2003.
- SINDERMANN, H.; CROFT, S. L.; ENGEL, K. R.; BOMMER, W.; EIBL, H. J.; UNGER, C.; ENGEL, J. Miltefosine (Impavido®): the first oral treatment against leishmaniasis. **Med. Microbiol Immunol.**, 193: 173-180, 2004.
- SOTIROPOULOS, G., WILBUR, B. Two cases of cutaneous Leishmaniasis presenting to the emergency department as chronic ulcers. **J. Emerg. Med.**, 20: 353-6, 2001.
- SOTO, J.; BUFFET, P.; GROGL, M. & BERMAN, J. Successful treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis with four injections of pentamidine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50: 107-111, 1994.
- SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R. S.; PADILLA, J.; ENGEL, J.; FISHER, C.; VOSS, A. & BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, in oral agent. **Clin. Infect. Dis.**, 33: 57-61, 2001.

SOUZA-NETA, L. C. Estudo fitoquímico de *Deguelia longeracemosa* (Benth.) A. M. G. Azevedo: Isolamento e determinação estrutural, reações de transformação da escandenina e Testes Biológicos. Tese de doutorado, Instituto de Biologia-UNICAMP, Campinas-SP, 2003.

SUNDAR, S.; GUPTA, L. B.; MAKHARIA, M. K.; SINGH, M. K.; VOSS, A.; ROSENKAIMER, F.; ENGEL, J & MURRAY, H. Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 93: 589-597, 1999.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, 6: 849-54, 2001.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial- induced increase in intracellular  $Ca^{2+}$  through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. **J. Biol. Chem.**, 278: 25120-25132, 2003.

SURARIT, R.; SHEPHERD, M. G. **J. Med. Vet. Mycol.**, 25: 403, 1987.

TAKESHIGE, K., BABA, M., TSUBOI, S., NODA, T., OHSUMI, Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. **J Cell Biol**, 119: 301-11, 1992.

THAKUR, C.P., KUMAR, M., PANDEY, A.K. Comparison of regimes of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 45: 435-41, 1991.

THAKUR, C. P.; BHOWMICK, S.; DOLFI, L.; OLLIARO, P. Amiboginosidine plus sodium stibogluconate for treatment of Indian Kala-azar: A randomized dose-finding clinical trial. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 89: 219-223, 1995.

TORRES-SANTOS, E. C.; MOREIRA, D. L.; KAPLAN, M. A. C.; MEIRELLES, M. N.; ROSSI-BERGMANN, B. Selective effect of 2,6-Dihydroxy-4-Methoxychalcone Isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*, 43(5): 1234-1241, 1999.

TOZZI, A. M. G. A. Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus* kunth e *Deguelia* aubl. No Brasil. Tese de doutorado, Instituto de Biologia - UNICAMP, Campinas-SP, 1989.

TRACY, J. B.; WEBSTER JUNIOR, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infection: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. **The.] Pharmacol. Basis of Therapeutics**, 9: 987-1008, 1996.

UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E. A.; KIM, D. J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBL, H. Hexadecylphosphocoline, a new ether-lipid analog. Studies on the antineoplastic activity *in vitro* and *in vivo*. **Acta Oncol.**, 28: 213-217, 1989.

URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, 144: 91-99, 1997.

- VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, 42: 337-346, 1995.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA, W. The biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Curr. Pharm. Design**, 8: 297-318, 2002.
- VERTUT-DOY; HANNAERT, A. P.; BOLARD. **J. Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157: 692, 1988.
- WALTON, B. C. Leishmaniasis: a worldwide problem. **Int. J. Dermatol.**, 28: 305-307, 1989.
- WEIDENBOERNER, M.; HINDORF, H.; CHANDRA, J. H.; TSOTSONOS, P. Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of the genus *Aspergillus*. **Phytochemistry**, 29 (4): 1103-1105, 1990.
- WEINRAUCH L, LIVSHIN R, EL-ON J. Ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. **Br. J. Dermatol.**, 117: 666-8, 1987.
- WOLLENWEBER, E.; BENNET, J. P.; GOMPERS, B. D. Inhibitory effects of natural flavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. **Arzneimittelforschung.**, 31 (3): 433-437, 1981.
- WONG, E., Isoflavonoids. In: HARBONE, J.B., MABRY, H. the Flavonoids: Chapman and Hall Ltd, London, 800, 1975.
- WU, J.; WANG, X.; YI, Y.; LEE, K. Anti-AIDS Agents 54. Potent Anti-HIV Chalcone and Flavonoids from Genus *Desmos*. **Med. Bioorg. Chem. Lett.**, 13: 1813-1815, 2003.
- YADAV, R. P.; GUPTA, H. & SATTEYA, V. 1989. Congenital calazar. **Annu. Trop. Med. Parasitol.**, 83: 535-537, 1989.
- YOKOMIZO, A.; MORIWAKI, M. Effects of Uptake of Flavonoids on Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Human Intestinal Caco-2 Cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 70: 1317-1324, 2006.
- YORIMITSU, T., NAIR, U., YANG, Z., KLIONSKY, D.J. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. **J Biol Chem**, 6: 30299-304, 2006.
- YOSHIDA, Y., AOYAMA, Y. Interaction of azole antifungal agents with cytochrome P-45014DM purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. **Biochem. Pharmacol.**, 15: 229-35, 1987.
- ZHAI, L.; BOM, J.; CHEN, M.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, A. The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria. **Antimicrob. Agents Chemother.**, 39: 2742-2748, 1995.