

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

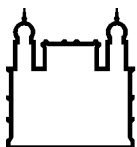
# **Avaliação do potencial terapêutico de novos derivados tetrazólicos no modelo de leishmaniose cutânea experimental**

**VIVIANE DOS SANTOS FAIÕES**

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.**

**RIO DE JANEIRO**

**2013**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*Viviane dos Santos Faiões*

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NOVOS DERIVADOS  
TETRAZÓLICOS NO MODELO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA  
EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos

**RIO DE JANEIRO**  
**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela

Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT/ FIOCRUZ – RJ

F162 Faiões, Viviane dos Santos

Avaliação do potencial terapêutico de novos derivados tetrazólicos no modelo de leishmaniose cutânea experimental / Viviane dos Santos

Faiões. – Rio de Janeiro, 2013.

xix, 73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Bibliografia: f. 60-73.

1. Tetrazóis. 2. Atividade leishmanicida. 3. *Leishmania amazonensis*.

I. Título.

CDD 616.936 4

# VIVIANE DOS SANTOS FAIÕES

## **Avaliação do potencial terapêutico de novos derivados tetrazólicos no modelo de leishmaniose cutânea experimental**

**Orientador:**

**Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

**Aprovada em: 28/02/2013**

### **EXAMINADORES:**

---

Dr.<sup>a</sup> Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro  
IOC – FIOCRUZ

---

Dr. Maurício Silva dos Santos  
UNIFEI

---

Dr.<sup>a</sup> Silvia Amaral Gonçalves da Silva  
UERJ

### **SUPLENTES:**

Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna Barreto (Revisor – FIOCRUZ)

Dr. Wallace Pacienza Lima (UFRJ)

Rio de Janeiro  
2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos.

## **DEDICATÓRIA**

A minha mãe Edna, a  
minha irmã Vanessa,  
aos meus familiares e  
amigos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tornar esse sonho possível, por ter me dado força e perseverança e por me guiar por esta caminhada que está apenas no início.

Ao meu orientador Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, por ter me recebido com tanto carinho e amizade, pela dedicação, pelo comprometimento, pela paciência e por tornar possível a conclusão deste trabalho.

À Dra. Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro por ter aberto as portas do Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos para mim e por ter possibilitado o meu ingresso no longo caminho da pesquisa.

À Dra. Leonor Leon pelo incentivo e pela confiança depositada.

Ao Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral por ter colaborado com a execução de parte deste trabalho, pelas brincadeiras e críticas construtivas.

Ao Dr. Maurício dos Santos e a Dra. Alice Maria Rolim Bernadino, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense pela síntese dos novos derivados tetrazólicos.

À Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz e a Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz, pelas análises dos parâmetros séricos.

Agradeço a minha mãe Edna que sempre acreditou em mim e me apoiou desde o início. Esta tese é dedicada a ela.

À minha irmã e melhor amiga Vanessa por me apoiar sempre, por me escutar e por me dar seu ombro amigo. Tenho certeza que em breve estarei nos agradecimentos da sua tese minha futura farmacêutica!

À Larissa Siqueira minha grande amiga. Vê se não se esquece de me convidar para a sua defesa hein!

Aos amigos Edézio Ferreira, Valter Viana, Mariela Vasconcelos e Liliane Sena, pela ajuda experimental e pelo apoio.

Aos amigos Mônica, Job, Luiza, Gérzia, Fernanda, Raquel e Karen pelo convívio, pelas brincadeiras e risadas.

Agradeço a toda a minha família! Minha avó, tios, tias e primos! Todos vocês

são de grande importância na minha vida.

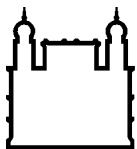
A todos aqueles que participaram e contribuíram de diversas formas durante o desenvolvimento deste trabalho e que não foram citados, deixo aqui o meu reconhecimento.

A todos vocês, os meus sinceros agradecimentos. Obrigada!



“A ciência sem a religião é parálitica  
– a religião sem a ciência é cega.”

**Albert Einstein**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

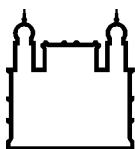
### AValiação DO POTENCIAL TERAPêUTICO DE NOVOS DERIVADOS TETRAZóLICOS NO MODELO DE LEISHMANIOSE CUTânea EXPERIMENTAL

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Viviane dos Santos Faiões**

As leishmanioses são causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, e estas vão desde infecções cutâneas, mucocutâneas até a forma visceral, constituindo um sério problema de saúde pública. Os fármacos utilizados na clínica são tóxicos e muitas vezes ineficientes. Desta forma, uma busca racional por novas alternativas terapêuticas torna-se necessária. Em nosso estudo foi investigada a atividade anti-*Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) de nove derivados tetrazólicos sintéticos. Entre todos os derivados, o composto 5-[5-amino-1-(4'-metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]-1H-tetrazol (MSN20) mostrou atividade sobre promastigotas (IC<sub>50</sub> de 37,1 μM) e amastigotas intracelulares (IC<sub>50</sub> de 22,3 μM) e baixa toxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos (LD<sub>50</sub> = 210,6 μM). A quantificação de nitrito no sobrenadante de macrófagos infectados e tratados com MSN20 sugeriu uma redução na produção de NO, embora não estatisticamente significativa. Em contrapartida, o tratamento de macrófagos não infectados e estimulados com LPS (5μg/mL) e IFN-γ (1ng/mL) levou a uma redução concentração-dependente da produção de nitrito. No modelo murino de leishmaniose cutânea a MSN20 foi capaz de reduzir o tamanho das lesões e reduzir a carga parasitária significativamente quando administrada por via oral. A avaliação de marcadores sorológicos foi realizada ao término do tratamento sistêmico, indicando ausência de danos hepático e renal. Como os azóis antifúngicos são inibidores conhecidos da biossíntese do ergosterol e muitos ainda induzem estresse oxidativo, a composição esteroídica e o metabolismo oxidativo de promastigotas tratadas com MSN20 foram avaliados. A análise por cromatografia em camada fina não apontou alterações no perfil de esteróis, mesmo em concentrações acima da IC<sub>50</sub>. O tratamento com MSN20 não levou a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), nem a redução do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ<sub>m</sub>) de promastigotas de *L. amazonensis*. Desta forma, a MSN20 se apresentou como um novo protótipo tetrazólico, ativo por via oral na leishmaniose cutânea murina, com mecanismo de ação distinto dos demais azóis, que permanece a ser elucidado.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NOVOS DERIVADOS TETRAZÓLICOS NO MODELO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Viviane dos Santos Faiões**

Leishmaniasis is caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, and these range from skin infections, mucocutaneous to visceral form, constituting a serious public health problem. The drugs used in the clinic are toxic and often ineffective. Thus, a rational search for new therapeutic alternatives becomes necessary. In this study we investigated the anti-*Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) activity of nine synthetic tetrazoles derivatives. Among all derivatives, the compound 5 - [5-amino-1-(4'-methoxyphenyl)-1*H*-pyrazol-4-yl]-1*H*-tetrazole (MSN20) showed activity against promastigotes (IC<sub>50</sub> of 37.1 μM) and intracellular amastigotes (IC<sub>50</sub> of 22.3 μM) and low toxicity to murine peritoneal macrophages (LD<sub>50</sub> = 210.6 μM). Quantification of nitrite in the supernatants of infected macrophages treated with MSN20 suggested a reduction in NO production, although not statistically significant. In contrast, non-infected macrophages stimulated with LPS (5μg/mL) and IFN-γ (1ng/mL) led to a concentration-dependent reduction of nitrite production. In murine model of cutaneous leishmaniasis the MSN20 was able to reduce both the size of the lesions and the parasite burden significantly when administered orally. Evaluation of serological markers was performed at the end of systemic treatment indicating absence of liver and kidney damage. As the azole antifungal agents are known inhibitors of the biosynthesis of ergosterol, and many of them also induce oxidative stress, the sterol composition and the oxidative metabolism of MSN20-treated promastigotes were evaluated. Analysis by thin layer chromatography showed no change in the sterol profile, even at concentrations above the IC<sub>50</sub>. MSN20 treatment did not induce to production of reactive oxygen species (ROS) or reduction in mitochondrial membrane potential (ΔΨ<sub>m</sub>) of promastigotes. Thus, MSN20 is a new tetrazole prototype, orally active in murine leishmaniasis, with a distinct mechanism of action from other azoles that remains to be elucidated.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Doenças tropicais negligenciadas	01
1.2. As leishmanioses	02
1.3. Parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	11
1.4. Ciclo do parasito	14
1.5. Vetores das leishmanioses	16
1.6. Mecanismos de evasão em <i>Leishmania</i> sp.	18
1.7. Quimioterapia das leishmanioses	20
1.7.1. Derivados azólicos	24
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1. Fármacos	27
3.1.1. Derivados tetrazólicos	27
3.1.2. Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime, Sanofi-Aventis)	27
3.2. Parasitos	27
3.3. Animais	27
3.4. Atividade <i>in vitro</i> dos novos derivados tetrazólicos	28
3.4.1. Avaliação da citotoxicidade	29
3.4.2. Produção de óxido nítrico (NO)	29
3.5. Atividade <i>in vivo</i>	30
3.5.1. Toxicologia renal e hepática	31
3.6. Avaliação do mecanismo de ação da MSN20	31
3.6.1. Perfil de esteróis	31
3.6.2. Espécies reativas de oxigênio (ERO)	32
3.6.3. Integridade da membrana plasmática	32

3.6.4. Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	32
3.6.5. Ciclo celular	33
3.6.6. Fragmentação de DNA	34
3.7. Análises estatísticas	34
4. RESULTADOS	35
4.1. Atividades antipromastigota e antiamastigota	35
4.2. Avaliação dos efeitos citotóxicos dos derivados tetrazólicos	38
4.3. Avaliação do efeito da MSN20 sobre a produção de óxido nítrico (NO)	40
4.4. Avaliação da atividade leishmanicida da MSN20 <i>in vivo</i>	42
4.5. Avaliação toxicológica sistêmica do tratamento <i>in vivo</i>	44
4.6. Avaliação do efeito da MSN20 sobre o metabolismo de esteróis do parasito	47
4.7. Avaliação do efeito da MSN20 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO)	48
4.8. Avaliação do efeito da MSN20 sobre a integridade da membrana plasmática	49
4.9. Avaliação do efeito da MSN20 sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ )	50
4.10. Avaliação do efeito da MSN20 sobre o ciclo celular	52
4.11. Avaliação da fragmentação de DNA	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÕES	59
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Fármacos desenvolvidos nos últimos 30 anos para o tratamento das doenças negligenciadas	02
Figura 1.2.	Distribuição mundial das leishmanioses cutânea (a) e visceral (b)	04
Figura 1.3.	As principais formas clínicas das leishmanioses	06
Figura 1.4.	Evolução da lesão ulcerada na leishmaniose cutânea	07
Figura 1.5.	Densidade de casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil em 2007	08
Figura 1.6.	Densidade de casos de leishmaniose visceral no Brasil em 2007	09
Figura 1.7.	Mortalidade de leishmaniose visceral no Brasil	09
Figura 1.8.	Taxonomia da família Trypanosomatidae	12
Figura 1.9.	Formas evolutivas de <i>Leishmania spp.</i>	13
Figura 1.10.	Ciclo evolutivo dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	15
Figura 1.11.	Insetos vetores das leishmanioses	16
Figura 1.12.	Via de regulação e ativação do sistema complemento	19
Figura 1.13.	Mecanismos de evasão em <i>Leishmania spp.</i>	20
Figura 1.14.	Estruturas químicas dos inibidores da biossíntese do ergosterol	25
Figura 4.1.	Alterações morfológicas em promastigotas induzidas pelo protótipo MSN20	35
Figura 4.2.	Atividade anti-mastigota do protótipo MSN20	37
Figura 4.3.	Fotomicrografia de macrófagos infectados e tratados com o protótipo MSN20	38
Figura 4.4.	Efeito citotóxico do protótipo MSN20	39
Figura 4.5.	Efeito citotóxico do protótipo MSN20 por dosagem de LDH	40
Figura 4.6.	Efeito de MSN20 na produção de nitrito em cultura de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	41

Figura 4.7. Efeito da MSN20 na produção de nitrito em cultura de macrófagos não infectados e estimulados com LPS e IFN- $\gamma$	41
Figura 4.8. Atividade <i>in vivo</i> da MSN20 por vias sistêmicas	43
Figura 4.9. Carga parasitária pós-tratamento por via oral com MSN20	44
Figura 4.10. Toxicologia hepática do tratamento por via oral com MSN20	45
Figura 4.11. Toxicologia renal do tratamento por via oral com MSN20	46
Figura 4.12. Efeito da MSN20 sobre o metabolismo de esteróis de <i>L. amazonensis</i>	47
Figura 4.13. Efeito da MSN20 sobre a produção de espécies reativas de oxigênio em formas promastigotas	48
Figura 4.14. Efeito da MSN20 sobre a integridade de membrana das promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 24 horas de tratamento	49
Figura 4.15. Efeito da MSN20 sobre o $\Delta\Psi_m$ de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	50
Figura 4.16. Promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com MSN20 não apresentam diminuição do $\Delta\Psi_m$	51
Figura 4.17. Avaliação do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com MSN20 por 24 e 48 horas	52
Figura 4.18. Histograma do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com MSN20 por 24 horas	53
Figura 4.19. Histograma do ciclo celular de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com MSN20 por 48 horas	54
Figura 4.20. Efeito da MSN20 na fragmentação do DNA de promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1.	Incidência global reportada e estimada das leishmanioses cutânea e visceral	05
Tabela 1.2.	Incidência de casos reportados e estimados das leishmanioses cutânea e visceral nas Américas	10
Tabela 1.3.	Principais espécies de <i>Leishmania</i> , seus vetores e reservatórios no Brasil	17
Tabela 1.4.	Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses	21
Tabela 1.5.	Esquema terapêutico do antimoniato de N-metilglucamina segundo a OMS no Brasil	22
Tabela 4.1.	Relação estrutura-atividade dos derivados tetrazólicos sobre as formas promastigota e amastigota intracelulares de <i>L. amazonensis</i>	36
Tabela 4.2.	Efeitos citotóxicos dos derivados tetrazólicos	39
Tabela 4.3.	Análise do $\Delta\Psi_m$ de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com MSN20	51



## LISTA DE ABREVIATURAS

$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
ADP	Adenosina difosfato
ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CL	Células de Langerhans
CTL	Controle
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa de medicamentos para doenças negligenciadas
DTNs	Doenças tropicais negligenciadas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FAL	Fosfatase alcalina
FCCP	Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
gp63	Glicoproteína de superfície
H <sub>2</sub> DCFDA	Diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína
HBSS	Solução salina balanceada de Hanks
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IBEs	Inibidores da biossíntese de esteróis
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50 % da atividade testada
IF	Índice de infecção
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IP	Intraperitonal
IV	Índice de variação

IS	Índice de seletividade
JC-1	Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro 1, 1', 3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboanina
LC	Leishmaniose cutânea
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LDC	Leishmaniose difuso-cutânea
LDH	Lactato desidrogenase
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
LVA	Leishmaniose visceral americana
LPG	Lipofosfoglicanos
LPS	Lipopolissacarídeo
MAC	Complexo de ataque à membrana
MS	Ministério da Saúde
MSF	Médicos sem fronteiras
MTT	Brometo de tiazolil azul tetrazólio
NO	Óxido nítrico
ODC	Ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Salina tamponada com fosfato (Phosphate Buffered Saline)
PI	Iodeto de propídeo
PNUD	Programa para o Desenvolvimento das Nações Unidas
PKC	Proteína cinase C
PTKs	Proteínas tirosina cinases
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SFB	Soro fetal bovino
TDR	Programa para pesquisa em doenças da pobreza
TLC	Cromatografia em camada fina (thin layer chromatography)
TUNEL	Marcação terminal com desoxiuridina biotinizada pela desoxinucleotidil transferase terminal
UNICEF	Fundo das Nações Unidas para a Infância (United Nations Children's Fund)

# 1. INTRODUÇÃO

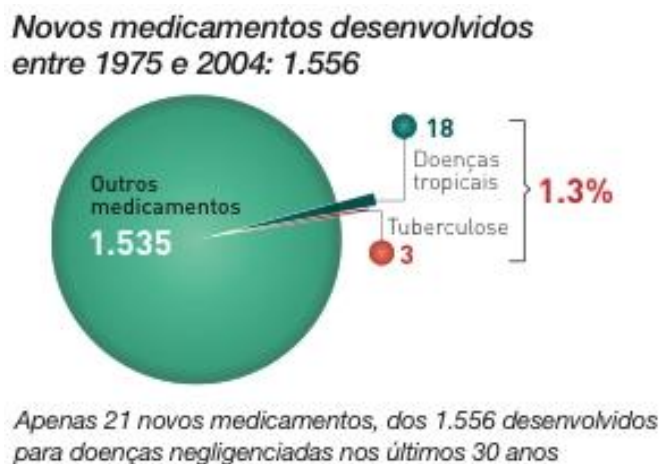
## 1.1. Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são endêmicas em 149 países (WHO, 2012) e afetam principalmente as populações pobres dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Dentre as DTNs estão a doença de Chagas, as leishmanioses, a tripanossomíase africana ou doença do sono, a malária, a dengue e a esquistossomose (DNDi, 2012). Estas enfermidades são assim denominadas, pois não existem atualmente políticas públicas efetivas para tratamento e controle e por atingirem as camadas sociais mais carentes do mundo (Beyrer e cols., 2007; Lindoso e cols., 2009). Segundo a organização Médicos sem Fronteiras (MSF), as doenças negligenciadas são definidas como doenças mortais ou muito graves cuja opções de tratamento são inadequadas ou não existem; e o seu mercado potencial de drogas é insuficiente para provocar uma pronta resposta do setor privado além do baixo interesse do governo em lutar contra esse tipo de doença (MSF, 2001).

Segundo a OMS, as 17 DTNs afetam mais de 1 bilhão de pessoas (WHO, 2012) e apresentam um elevado índice de morbidade, com cerca de mais de 1 milhão de óbitos por ano, onde as leishmanioses encontram-se dentre as mais negligenciadas (TDR, 2010). Constituem um grupo de doenças com diferentes formas clínicas e severidades, e ampla distribuição e ocorrência (Alvar e cols., 2006; Alvar e cols., 2012; Yamey e cols., 2002). Entretanto, pelos motivos anteriormente mencionados, não gera uma grande resposta das indústrias farmacêuticas para o desenvolvimento de novos fármacos. Levantamento recente revelou que dos 1556 medicamentos lançados no mercado entre 1975 e 2004, apenas 21 são destinados a pacientes com DTNs, ou seja, um investimento inferior a 2% (Figura 1.1) (DNDi, 2012; Lindoso e cols., 2009).

É importante salientar que em 1975, foi criado o Programa para pesquisa em doenças da pobreza (TDR). Tendo como principal objetivo influenciar os esforços mundiais para eliminar as doenças que afetam os mais desfavorecidos através de patrocínios da UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento), o Banco Mundial e OMS (Organização Mundial de Saúde). Em 2003, foi criada a Iniciativa de medicamentos para doenças negligenciadas (DNDi), com objetivo de fornecer novos medicamentos e apoiar diversos projetos através de parcerias. Na América Latina, além da colaboração com a

FIOCRUZ e seu Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, diversos outros parceiros destacam-se, com o único objetivo de identificar candidatos ao desenvolvimento de novos fármacos (DNDi, 2012).



**Figura 1.1.** Fármacos desenvolvidos nos últimos 30 anos para o tratamento das doenças negligenciadas (DNDi, 2012).

## 1.2. As leishmanioses

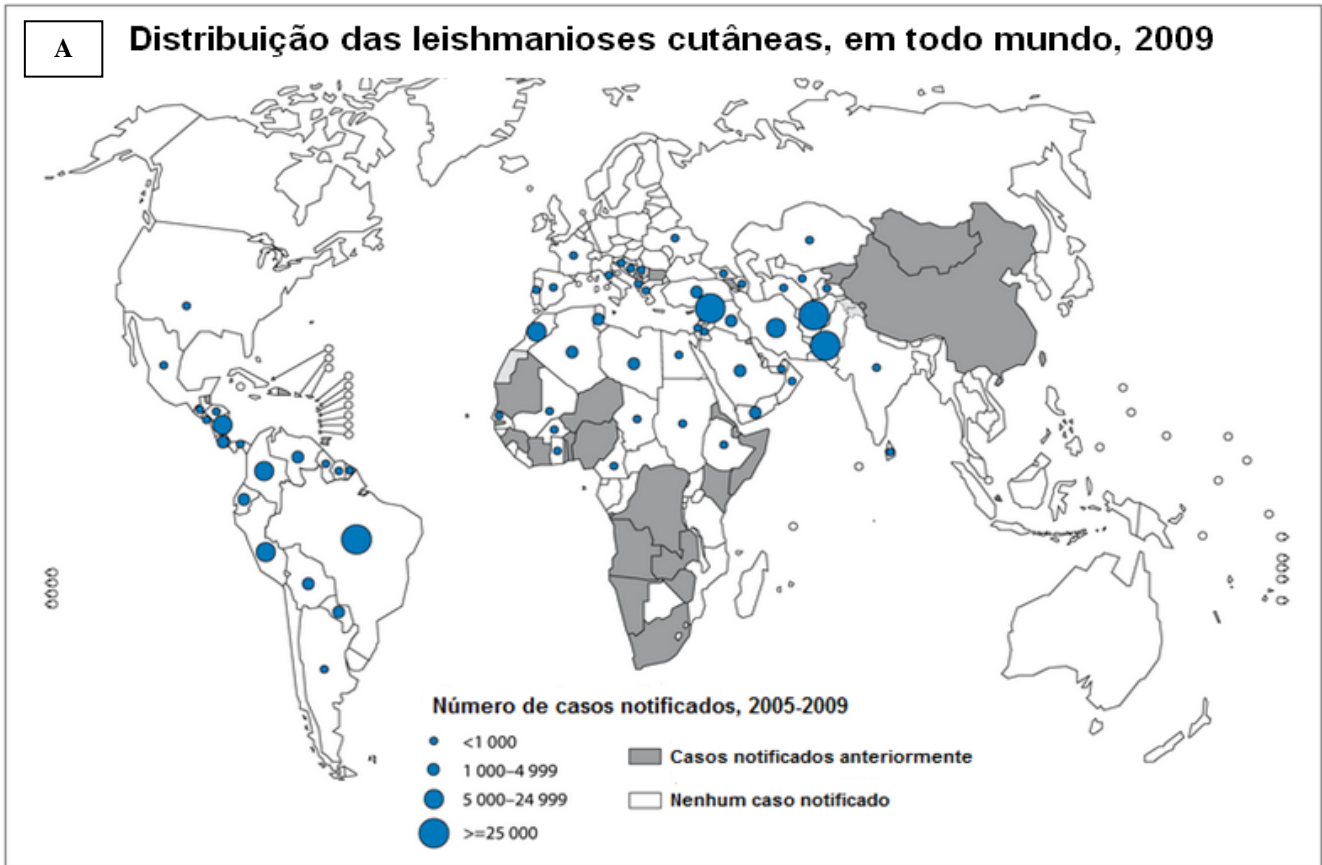
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são endêmicas em 98 países (Alvar e cols., 2012), onde se estima a existência de 12 milhões de casos, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Atualmente, cerca de 1,6 milhões de novos casos ocorrem a cada ano, sendo 500 mil casos de leishmaniose visceral (LV) e 1,1 milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) (Figura 1.2), estando cerca de 350 milhões de pessoas em áreas de risco de infecção (WHO, 2010). A LC possui maior incidência na região do Mediterrâneo e nas Américas (Tabela 1.1), com cerca de 70 a 75% casos registrados no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Costa Rica, Peru e no norte do Sudão. A LV apresenta maior incidência no sul da Ásia, na África e nas Américas (Tabela 1.1) com cerca de 90% dos casos de LV na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, no Brasil e na Etiópia. No continente americano, entre os anos de 2003 e 2007, o Brasil apresentou em disparado a maior incidência dos casos de LV (Alvar e cols., 2012). É importante ressaltar que as

leishmanioses apresentam mortalidade anual superior a 50 mil pessoas, número somente superado pela malária entre as DTNs (WHO, 2010).

A leishmaniose é uma zoonose, naturalmente transmitida de reservatórios vertebrados para humanos, através de um vetor invertebrado (flebotomíneo). Entretanto, tem apresentado características de antroponose, transmitida entre humanos através da picada do vetor flebotomíneo, em países como a Índia e o Afeganistão (Ashford, 2000; Rotureau, 2006). Constituem um espectro de doenças com diversas características clínicas e epidemiológicas, causadas por diferentes protozoários parasitos do gênero *Leishmania* (Croft e cols., 2006). Esta grande variação entre as formas clínicas está intimamente relacionada à espécie do parasito que foi transmitida e a resposta imune do hospedeiro vertebrado (Santos e cols., 2008).

No homem, a enfermidade apresenta duas grandes formas clínicas e assim é dividida em: leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar (LT) (de acordo com variações clínicas podem ser classificadas em cutâneo localizado, cutâneo difusa e cutâneo mucosa) e em leishmaniose visceral (LV), forma mais grave que pode levar o indivíduo acometido ao óbito.

No Velho Mundo, a *L. tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* são os principais agentes etiológicos causadores da leishmaniose tegumentar. No novo mundo são causadoras da leishmaniose tegumentar americana (LTA): *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) venezuelensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) peruviana*, *L.(L.) pifanoi*, *L.(L) garnham*. *L. (V.) shawi*, *L. (V.) naiffi* e *L.(V.) lainsoni* (Ministério da Saúde, 2006a). *L. donovani* é causadora da LV no Velho Mundo e *L. infantum* (syn *L.chagasi*) é responsável pela leishmaniose visceral americana (LVA) no Novo Mundo (Ministério da Saúde, 2006b). No Brasil, as espécies de maior importância epidemiológica são *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis*, e *L. infantum* (syn *L. chagasi*) (Ministério da Saúde, 2006a).



**Figura 1. 2.** Distribuição mundial das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) (WHO, 2010).

**Tabela 1.1.** Incidência global reportada e estimada das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) [Tabela adaptada de (Alvar e cols., 2012)].

<b>A</b>	<b>Casos LC reportados Casos/ano</b>	<b>5 anos de dados</b>	<b>Estimativa anual da incidência de LC</b>
Américas	66.941	14/20 (70%)	187.200 a 307.800
África Subsaariana	155	5/15 (33%)	770 a 1500
África Oriental	50	0/6 (0%)	33.300 a 90.500
Mediterrâneo	85.555	17/26 (65%)	239.500 a 393.600
Oriente Médio até a Ásia Central	61.013	16/18 (89%)	226.200 a 416.400
Sul Asiático	322	2/2 (100%)	1900 a 3500
<b>Total Global</b>	<b>214.036</b>	<b>53/87 (61%)</b>	<b>690.900 a 1.213.300</b>

<b>B</b>	<b>Casos LV reportados Casos/ano</b>	<b>5 anos de dados</b>	<b>Estimativa anual da incidência de LV</b>
Américas	3662	8/11 (73%)	4500 a 6800
África Subsaariana	1	3/11 (27%)	
África Oriental	8569	5/8 (63%)	29.400 a 56.700
Mediterrâneo	875	21/26 (81%)	1200 a 2000
Oriente Médio até a Ásia Central	2496	14/17 (82%)	5000 a 10.000
Sul Asiático	42.623	3/6 (50%)	162.100 a 313.600
<b>Total Global</b>	<b>58.227</b>	<b>54/79 (68%)</b>	<b>202.200 a 389.100</b>

A LTA apresenta uma variedade de formas clínicas e dessa maneira é classificada em função das suas principais características em: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucocutânea (LMC) ou leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) e leishmaniose difuso-cutânea (LDC). A LCL é causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (El-On, 2009) e possui como característica a formação de úlceras únicas limitadas à derme, onde a epiderme pode ou não encontrar-se ulcerada (Figura 1.3). Primeiramente forma-se um eritema inchado e avermelhado no local da inoculação pelo inseto vetor. Em seguida, o eritema desenvolve-se em uma pápula e em um nódulo que progressivamente resulta em úlceras típicas, em um período de duas semanas a seis meses (Figura 1.4). As úlceras geralmente são auto-resolutivas, mas em alguns casos podem não curar espontaneamente (Reithinger e cols., 2007). A leishmaniose cutânea passa a ser denominada disseminada quando o indivíduo acometido pela enfermidade apresenta mais de cinco lesões, distantes do local da picada em diferentes regiões do corpo. As lesões são ulceradas e respondem ao tratamento convencional (Ministério da Saúde, 2006a; Neves, 2005).





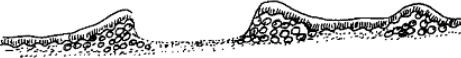
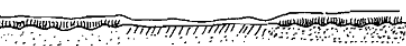


**Figura 1.3.** (A) Leishmaniose cutânea (Ministério da Saúde, 2007); (B) Leishmaniose muco-cutânea (Ministério da saúde, 2006); (C) Leishmaniose difuso-cutânea (Ministério da Saúde, 2007); (D) Leishmaniose visceral (Murray e cols., 2005).

A LMC é uma forma progressiva da leishmaniose cutânea e é tradicionalmente associada a *L.(Viannia) braziliensis*. Entretanto, há descrições de casos associados a *L.(V) guyanensis* e *L.(V) panamensis*, *L.(L) amazonensis* e *L.(L) major* (Goto e Lindoso, 2010). Apresenta como característica lesão crônica, destrutiva que pode ser única ou múltipla, em mucosas do nariz, boca e faringe. Essa forma progressiva pode ser resultante da evolução crônica da forma cutânea curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Goto e Lindoso, 2010) e gera lesões desfigurantes que em alguns casos segregam os indivíduos acometidos do meio social (Figura 1.3).

A LDC é a forma anérgica e sistêmica da leishmaniose tegumentar, sendo uma forma rara desta enfermidade. No Brasil é causada por *L. amazonensis* (Leon e cols., 1991). Esta forma da doença apresenta lesões cutâneas difusas não ulceradas características (Figura 1.3), resultante da disseminação do parasito através dos vasos linfáticos, ou por migração de macrófagos infectados (Neves, 2005).

A LVA, conhecida popularmente como “Calazar”, é causada por *L. infantum* (syn *L. chagasi*) e representa a forma mais grave da doença podendo levar ao óbito. Devido ao viscerotropismo desta espécie, os indivíduos acometidos apresentam comprometimento de diversos órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea. Caracteriza-se por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia e hepatomegalia (Maltezou, 2010).

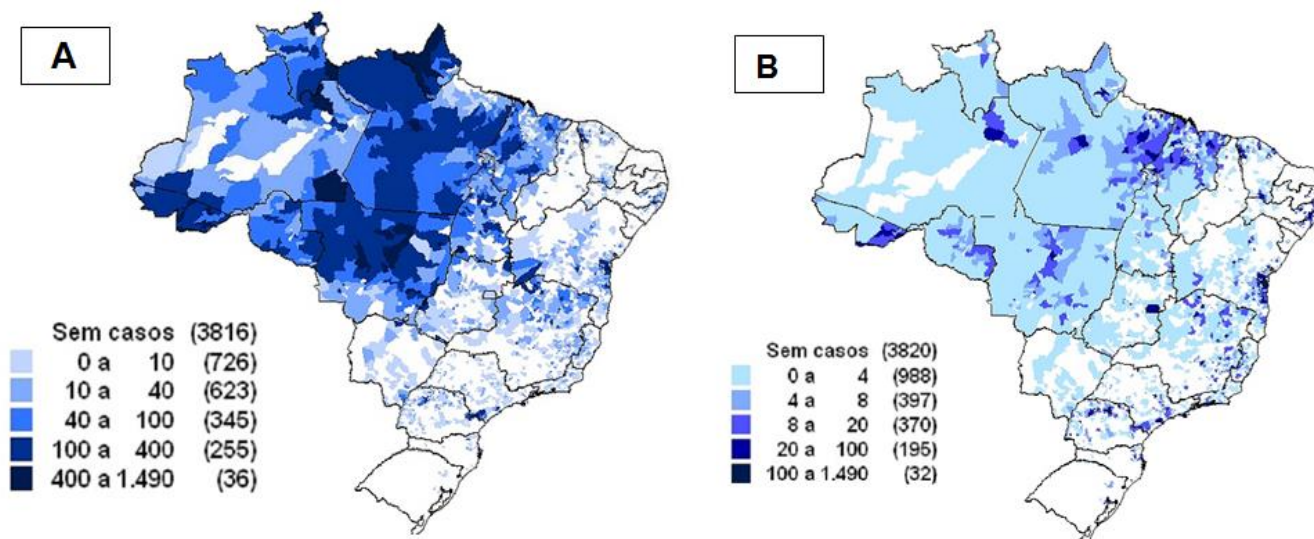
	ESTÁGIO	HISTOLOGIA
	Nódulo	Epiderme intacta, forte infiltrado de macrófagos, numerosos parasitos
	Úlceração inicial	Úlceração superficial, forte infiltrado de linfócitos, macrófagos numerosos parasitos
	Úlcera estabilizada com lesão-satélite	Úlcera profunda, processo inflamatório ativo na periferia, lesões-satélites, poucos parasitos
	Lesão cicatrizada	Leve depressão na pele epiderme fina, fibrose dérmica, ausência de parasitos

**Figura 1.4.** Evolução da lesão ulcerada na leishmaniose cutânea (Neves, 2005).

Na ausência de tratamento, a progressão da doença leva ao emagrecimento, edema na região abdominal decorrente da hepatoesplenomegalia, debilidade progressiva até o óbito (Figura 1.3). Além de ser a forma clínica mais severa, os casos de co-infecção *Leishmania*/HIV na Europa, tornaram a LV a terceira doença oportunista de maior frequência em pacientes portadores do vírus HIV (Desjeux e Alvar, 2003).

No continente americano, o Brasil apresenta a maior incidência de casos de LV e LC. No período de 2003 a 2007, foram registrados 26.008 casos de LC por ano, com 217 municípios com transmissão intensa ou moderada em 2010 (Tabela 1.2) (Alvar e cols., 2012). A região Norte vem contribuindo com o maior número de casos de LC, seguida das regiões Nordeste e Centro-oeste (Figura 1.5) (Ministério da Saúde, 2010). *L. braziliensis* é a espécie que apresenta maior prevalência territorial, ocorrendo nos estados do Pará, Ceará, Amapá, Paraíba, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso (Neves, 2005). Nas regiões Norte e Nordeste, *L. amazonensis*, foco de nosso estudo, é descrita como causadora de diferentes formas clínicas: LMC, LDC e LV (Almeida e Cols., 1996; Leon e cols.,

1990). Recentemente foi descrito o primeiro caso de LDC causado por *L. amazonensis* no estado do Rio de Janeiro (Azeredo- Coutinho e cols., 2007).



**Figura 1.5.** (A) Taxa de detecção por 100.000 habitantes de LTA por município brasileiro no ano de 2007; (B) Densidade de casos de LTA por município brasileiro no ano de 2007 (Ministério da Saúde, 2008).

A região Nordeste concentra o maior número de casos de LV no Brasil (Figura 1.6), causada por *L. infantum* (syn. *L. chagasi*) (Maia-Elkhoury e cols., 2008; Ministério da Saúde, 2008). Entre 1998 e 2010 foram registrados 32.459 casos de LV em 21 estados brasileiros e recentemente o número de casos fatais relatados tem aumentado gradualmente (Figura 1.7) (Alvar e cols., 2012).

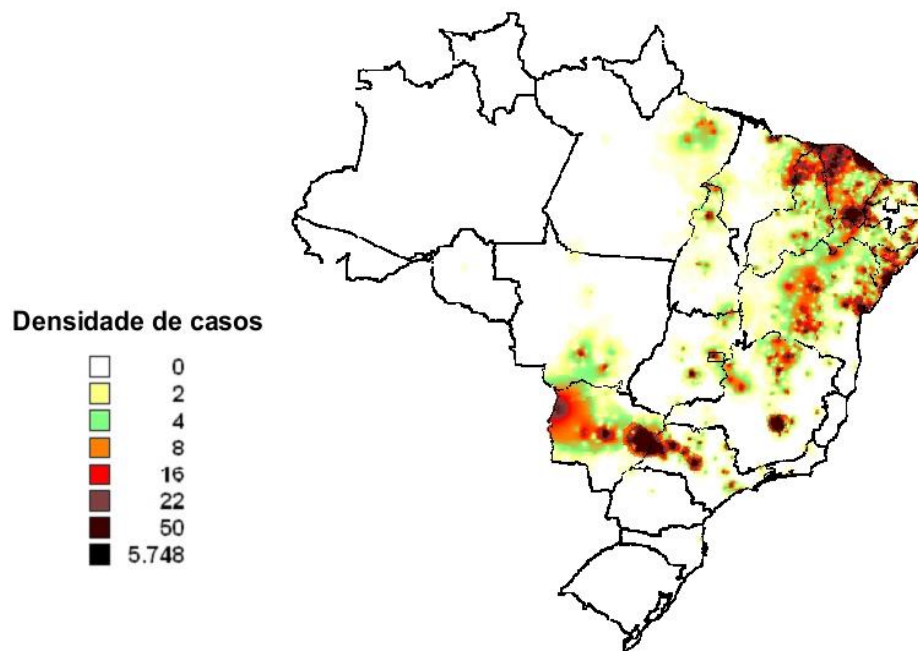


Figura 1.6. Densidade de casos de LV no Brasil em 2007 (Ministério da Saúde, 2008).

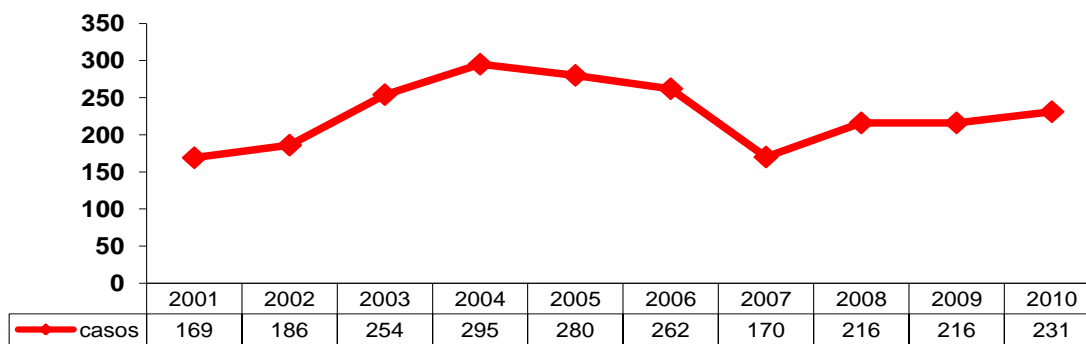


Figura 1.7. Mortalidade de leishmaniose visceral no Brasil no período de 2001 a 2010 (Alvar e cols., 2012).

**Tabela 1.2.** Incidência de casos reportados e estimados das leishmanioses cutânea (A) e visceral (B) no continente americano. [Tabela adaptada de (Alvar e cols., 2012)].

<b>Países</b>	<b>Casos LC reportados Casos/ano</b>	<b>Período</b>	<b>Estimativa anual da incidência de LC</b>
<b>Argentina</b>	<b>261</b>	<b>2004-2008</b>	<b>730 a 1.200</b>
<b>Belize</b>			
<b>Bolívia</b>	<b>2.647</b>	<b>2004-2008</b>	<b>7.400 a 12.200</b>
<b>Brasil</b>	<b>26.008</b>	<b>2003-2007</b>	<b>72.800 a 119.600</b>
<b>Colômbia</b>	<b>17.420</b>	<b>2005-2009</b>	<b>48.800 a 80.100</b>
<b>Costa Rica</b>	<b>1.249</b>	<b>2002-2006</b>	<b>3.500 a 5.700</b>
<b>República Dominicana</b>			<b>0 a 0</b>
<b>Equador</b>	<b>1.724</b>	<b>2004-2008</b>	<b>4.800 a 7.900</b>
<b>El-Salvador</b>			<b>0 a 0</b>
<b>Guiana- Francesa</b>	<b>233</b>	<b>2004-2008</b>	<b>650 a 1.100</b>
<b>Guatemala</b>	<b>684</b>	<b>2004-2008</b>	<b>1.900 a 3.100</b>
<b>Guiana</b>	<b>16</b>	<b>2006-2008</b>	<b>50 a 70</b>
<b>Honduras</b>	<b>1.159</b>	<b>2006-2008</b>	<b>3.200 a 5.300</b>
<b>México</b>	<b>811</b>	<b>2004-2008</b>	<b>2.300 a 3.700</b>
<b>Nicarágua</b>	<b>3.222</b>	<b>2003-2007</b>	<b>9.000 a 14.800</b>
<b>Panamá</b>	<b>2.188</b>	<b>2005-2009</b>	<b>6.100 a 10.100</b>
<b>Paraguai</b>	<b>431</b>	<b>2004-2008</b>	<b>1.200 a 2.000</b>
<b>Peru</b>	<b>6.405</b>	<b>2004-2008</b>	<b>17.900 a 29.500</b>
<b>Suriname</b>	<b>3</b>	<b>2005-2007</b>	<b>8 a 14</b>
<b>Venezuela</b>	<b>2.480</b>	<b>2004-2008</b>	<b>6.900 a 11.400</b>
<b>Região</b>	<b>66.941</b>		<b>187.200 307.800</b>

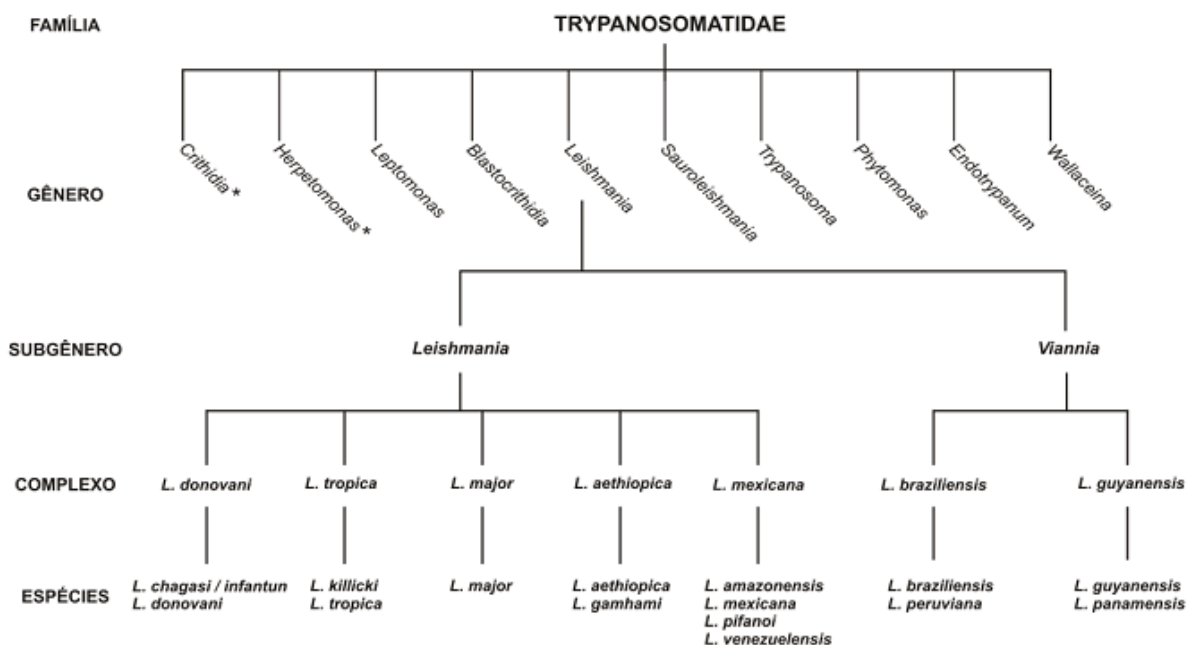
Países	Casos LV reportados Casos/ano	Período	Estimativa anual da incidência de LV
Argentina	8	2004-2008	20 a 30
Bolívia	0	2008	
Brasil	3.481	2003-2007	4.200 a 6.300
Colômbia	60	2004-2008	70 a 110
<b>El-Salvador</b>			
Guatemala	15	2004-2008	20 a 30
Honduras	6	2004-2008	7 a 10
México	7	2004-2008	8 a 12
Nicarágua	3	2003-2007	3 a 5
Paraguai	48	2004-2008	100 a 200
Venezuela	40	2004-2008	50 a 70
<b>Região</b>	<b>3.668</b>		<b>4.500 a 6.800</b>

### 1.3. Parasitos do gênero *Leishmania*

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e foram descritos pela primeira vez por Leishman e Donovan, no final do século XIX (Rey, 2008). A ordem Kinetoplastida é constituída por protozoários que apresentam uma estrutura específica, o cinetoplasto (extremidade da mitocôndria única do parasito, onde se localiza o DNA da organela).

Dentre os Kinetoplastida, a família Trypanosomatidae reúne parasitos que infectam uma variedade de organismos, sendo cerca de 30 espécies capazes de infectar mamíferos (Cupolillo, 2000). Todos os tripanosomatídeos apresentam flagelo único, que emerge da região da bolsa flagelar e microtúbulos localizados sob a membrana plasmática, denominados microtúbulos subpeliculares. Esta família possui grande importância clínica, pois nesta estão agrupados os agentes etiológicos da tripanossomíase africana (*Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense*), da doença de Chagas (*T. cruzi*) e das leishmanioses (gênero *Leishmania*).

A sistemática do gênero *Leishmania* apresenta grande complexidade, com a introdução de dois níveis intermediários subgênero e complexo por alguns autores, conforme ilustrado na Figura 1.8 (Stuart e cols., 2008).



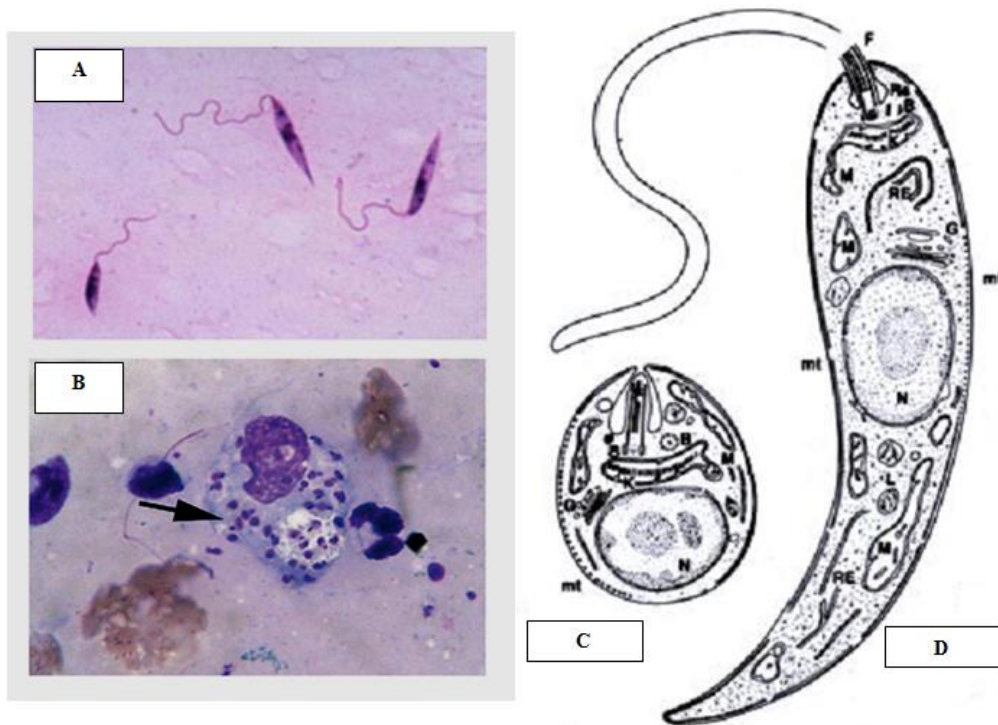
**Figura 1.8.** Taxonomia da família Trypanosomatidae [adaptado de (Mishra e cols., 2009)].

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas durante o seu ciclo evolutivo a forma promastigota e a forma amastigota intracelular (Figura 1.9). A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo dos insetos vetores (flebotomíneos) e apresenta corpo celular alongado, com o núcleo situado na região mediana e cinetoplasto próximo a região anterior, de onde emerge o flagelo (Figura 1.9) (Rey, 2008).

A forma amastigota possui forma arredondada, sendo encontrada principalmente no interior de células do sistema fagocítico mononuclear. Possui flagelo interiorizado ao espaço intracelular (Figura 1.9) e multiplica-se por divisão binária dentro do fagolisossomo do macrófago, a um pH entre 4,5 a 5,0 (Rey, 2008).

Além da infecção macrofágica típica, recentemente foi descrita a infecção de *Leishmania sp.* em neutrófilos. Este tipo celular quando infectado sofre morte celular por apoptose. Os macrófagos reconhecem e fagocitam o corpo apoptótico e não entram em contato direto com o parasito, de forma que não são ativados. Este modelo tem sido

descrito como “Cavalo de Tróia”, pois como não há ativação de fagócitos profissionais o estabelecimento da lesão é facilitado (Van Zandbergen e cols., 2004).



**Figura 1.9.** Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania sp.* por microscopia de luz (A e B) e representação esquemática (C e D). Formas promastigotas (A e D) e amastigotas intracelulares (B e C). N: núcleo; mt: microtúbulos subpeliculares; M: mitocôndria; RE: retículo endoplasmático; G: complexo de golgi; L: lisossomo; F: flagelo. (WHO, 2003; Murray e cols., 2005; Rey, 2008).

Por sua vez, células de Langerhans (CL), que são células dendríticas encontradas na epiderme, também podem ser infectadas. Entretanto, existem controvérsias em relação ao papel deste tipo celular na infecção em modelo murino. Segundo Kautz-Neu e colaboradores (2011), CL regulam negativamente a resposta leishmanicida. Animais que tiveram CL depletadas e foram infectados com *L. major* apresentaram lesões menores em relação ao grupo controle; todavia, segundo Von Stebut e colaboradores (1998), estas células atuam mediando a indução de imunidade protetora através da produção de IL-12.



#### 1.4. Ciclo do parasito

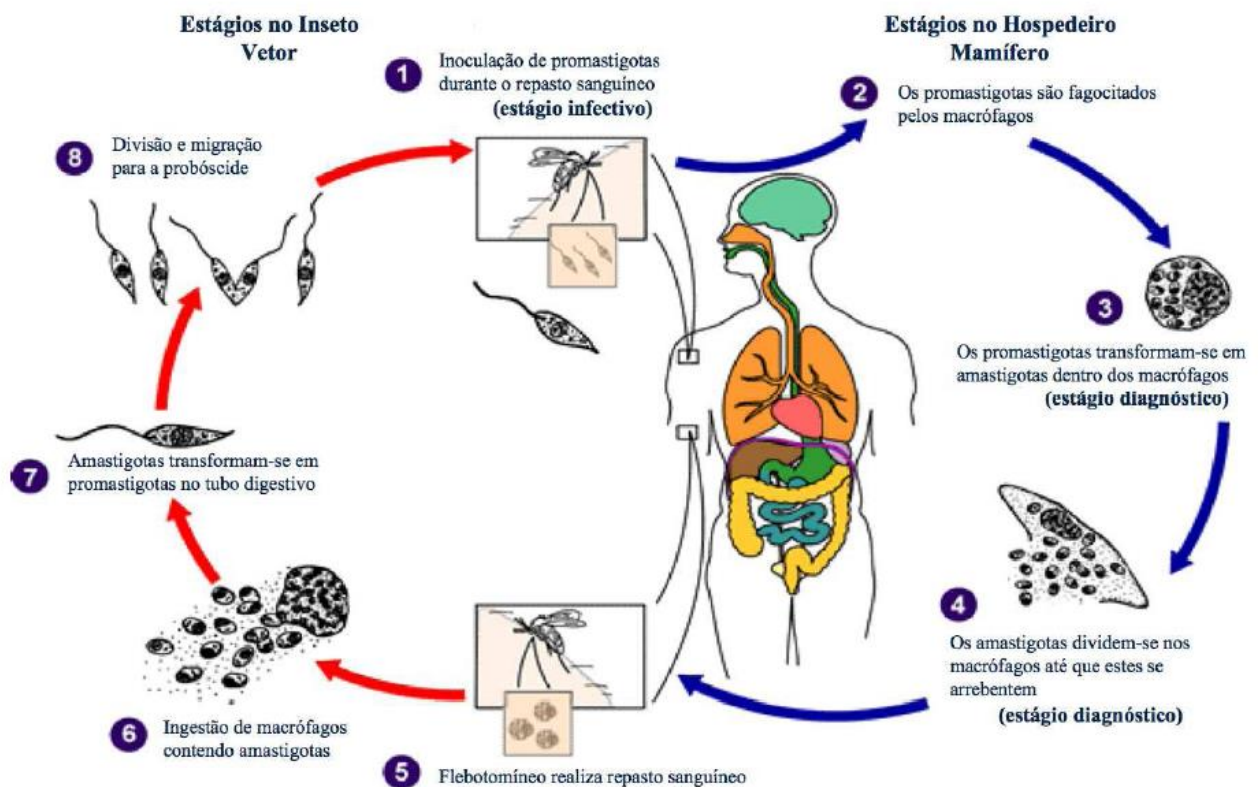
O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* tem início durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo em um hospedeiro vertebrado, como roedores, canídeos, alguns marsupiais e o homem, que funcionam como reservatórios naturais (Neuber, 2008). Dentre os flebotomíneos, somente as fêmeas possuem o hábito da hematofagia que é fundamental para o acúmulo de vitelo nos ovos (vitelogênese) e sua consequente maturação. Estes insetos possuem peças bucais curtas que não permitem que seja realizada a sucção sanguínea diretamente do vaso sanguíneo, por isso dilaceram o tecido provocando hemorragia da qual obtém o sangue (*pool feeding*). Dessa forma, o inseto obtém o sangue oriundo do vaso sanguíneo lesado podendo conter as formas amastigotas presentes no tecido (Coura, 2005).

As formas amastigotas ingeridas durante o repasto logo irão se diferenciar em promastigotas no trato digestivo do inseto. Essas formas do parasito possuem a capacidade de resistir à ação das enzimas digestivas sendo envolvidas juntamente com o sangue pela matriz peritrófica. Esta matriz atua como um sistema de defesa do inseto contra patógenos. Entretanto, quitinases de promastigotas permitem o parasito evadir essa barreira, perfurando a matriz e alcançando o epitélio (Coura, 2005; Rey, 2008).

As diferentes espécies de *Leishmania* colonizam regiões distintas do trato digestivo do inseto se fixando ao epitélio. Os parasitos que colonizam as porções anteriores do estômago (comportamento suprapilárico) foram agrupados no subgênero *Leishmania*, já os que colonizam a porção posterior abdominal do estômago e pilórica (comportamento peripilórico) foram agrupados no subgênero *Viannia*. Nesses locais, as formas promastigotas multiplicam-se intensamente por divisão binária, diferenciam-se em promastigotas metacíclicas e direcionam-se para a faringe, cárdia e esôfago que acabam bloqueados pelo acúmulo parasitário, além da presença de uma densa camada de proteofosoglicana filamentosa (fPPG) sintetizada pelos parasitos. Dessa forma, a fêmea fortemente infectada regurgita os parasitos quando torna a realizar o repasto sanguíneo e permitindo a infecção (Coura, 2005).

Ao inocular as formas promastigotas infectantes na pele de um hospedeiro vertebrado, estas são rapidamente fagocitadas por macrófagos teciduais. Nessas células, ocorre a diferenciação em amastigotas que são capazes de resistir à ação microbicida das hidrolases ácidas (Russel e Talams-Rohana, 1989). Esta forma intracelular se

multiplica rapidamente por divisão binária levando as células a lise e a consequente liberação do parasito. Este parasito pode ser novamente fagocitado por macrófagos, disseminando a infecção (Stuart e cols., 2008). O ciclo se fecha quando o flebotomíneo realiza novo repasto sanguíneo (Figura 1.10).

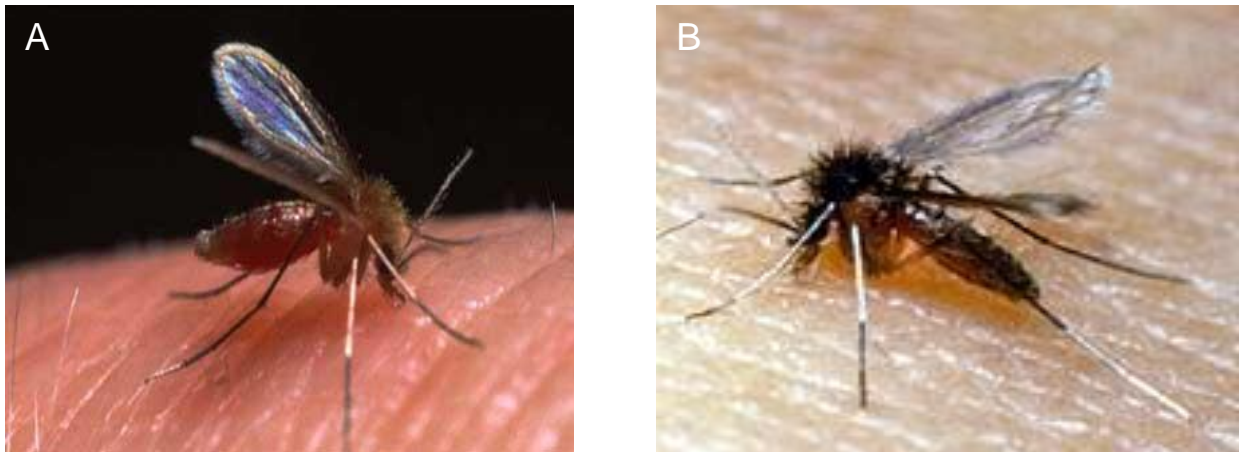


**Figura 1.10.** Ciclo biológico da *Leishmania* spp.  
(modificado de CDC, [www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/leishmaniasis\\_il.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/leishmaniasis_il.htm), 2011).  
Acessado em 07 de fevereiro de 2013.

### 1.5. Vetores de leishmanioses

Os insetos vetores das leishmanioses são dípteros da seção Nematocera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae onde somente dois gêneros possuem importância: *Phlebotomus* no Velho Mundo (África, Europa e Ásia) e *Lutzomia* no Novo mundo (Américas) (Figura 1.11). Como mencionado anteriormente, apenas as fêmeas transmitem a infecção, pois somente estas possuem o hábito da hematofagia necessária para a maturação dos ovos (Sacks, 1989; Walters e cols., 1989).

No Brasil, o vetor da leishmaniose visceral é principalmente *Lu. longipalpis* que possui comportamento sinantrópico e antropofílico e que transmite *L. infantum* (syn *L. chagasi*) desde a região amazônica até as regiões Sul e Sudeste. *Lu. intermedia* e *Lu. whitmani* são importantes na disseminação da LC transmitindo *L. braziliensis* nas regiões Nordeste e Sudeste. *Lu. umbratilis* e *Lu. flaviscutelata* apesar de possuírem hábitos menos antropofílicos são as grandes responsáveis pela transmissão de *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (Tabela 1.3) foco deste estudo (Alvar e cols., 2012; Coura, 2005).



**Figura 1.11.** Insetos vetores das leishmanioses. (A) *Phlebotomus* sp., (B) *Lutzomia longipalpis*. (Centre for applied Entomology and Parasitology, 2005; National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID, 2004). Acessado em 07 de fevereiro de 2013.

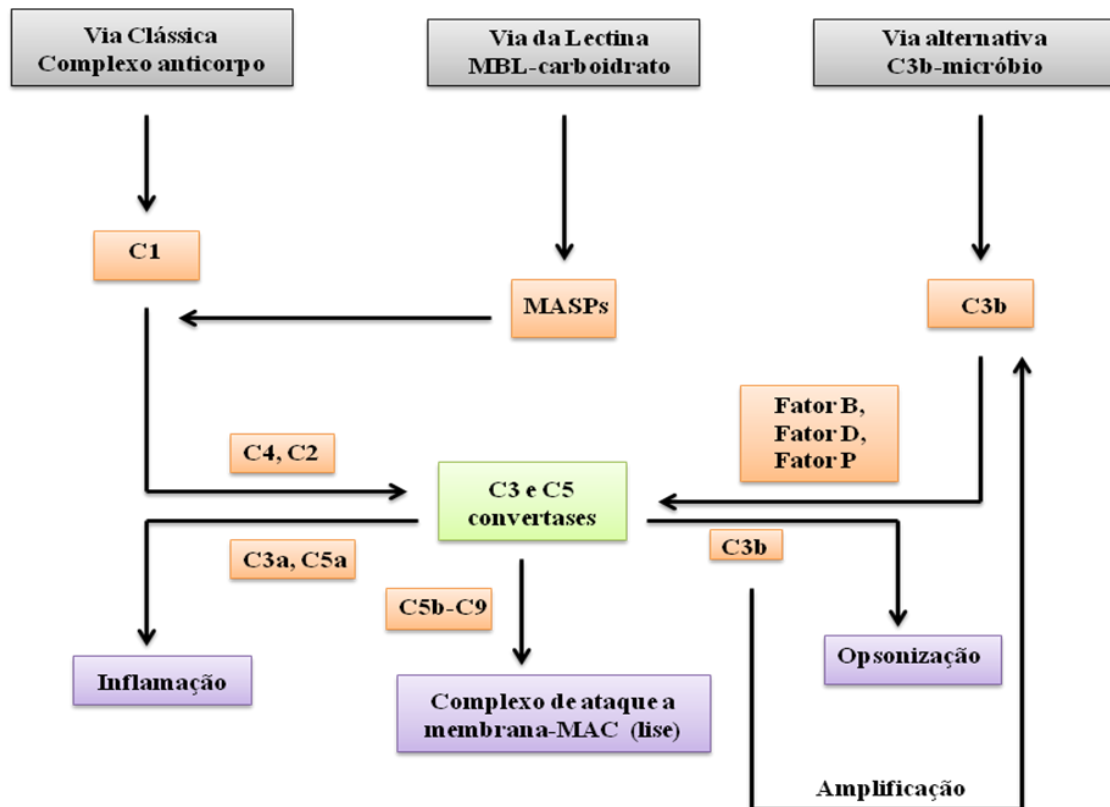
**Tabela 1.3.** Principais espécies de *Leishmania*, seus vetores e reservatórios no Brasil [adaptado de (Alvar e cols., 2012)].

<b>Espécies <i>Leishmania</i></b>	<b>Forma clínica</b>	<b>Espécies de vetores</b>	<b>Reservatórios</b>
<i>L. guyanensis</i>	LC	<i>Lu. umbratilis</i> , <i>Lu. anduzei</i> , <i>Lu. whitmani</i>	<i>Choloepus sp.</i> , <i>Tamandua sp.</i> , <i>Didelphis</i> <i>sp.</i> , <i>Proechimys sp.</i>
<i>L. amazonensis</i>	LC	<i>Lu. flaviscutellata</i> , <i>Lu. longipalpis</i>	<i>Proechimys sp.</i> , <i>Oryzomys sp.</i> , <i>Wiedomys</i> <i>sp.</i>
<i>L. braziliensis</i>	LC, LCM	<i>Lu. whitmani</i> , <i>Lu. intermedia</i> , <i>Lu. wellcomei</i> , <i>Lu. complexa</i> , <i>Lu. neivai</i> , <i>Lu. edwardsi</i> , <i>Lu. migonei</i>	<i>Canis familiaris</i> , <i>Rattus</i> <i>rattus</i> , <i>Akodon</i> <i>arviculoides</i> , <i>Bolomys</i> <i>sp.</i> , <i>Nectomys sp.</i> , <i>Thrichomys sp.</i> ,
<i>L. infantum</i>	LV	<i>Lu. longipalpis</i> , <i>Lu. cruzi</i> , <i>Lu. almerio</i> , <i>Lu. salesi</i>	<i>Canis familiaris</i> , <i>Lycalopex vetulus</i> , <i>Cedocyon thous</i> , <i>Didelphis albiventris</i>
<i>L. lainsoni</i>	LC	<i>Lu. ubiquitalis</i>	<i>Agouti paca</i>
<i>L. shawi</i>	LC	<i>Lu whitmani</i>	<i>Cebus apella</i> , <i>Chiropotes satanus</i> , <i>Nasua nasua</i> , <i>Bradypus</i> <i>tridactylus</i> , <i>Choloepus</i> <i>didactylus</i>
<i>L. naiffi</i>	LC	<i>Lu. squamiventris</i> , <i>Lu.</i> <i>paraensis</i> , <i>Lu. amazonensis</i> , <i>Lu. ayrozai</i>	<i>Dasyopus novemcinctus</i>
<i>L. lindenbergi</i>	LC	Desconhecido	Desconhecido

## 1.6. Mecanismos de evasão em *Leishmania sp.*

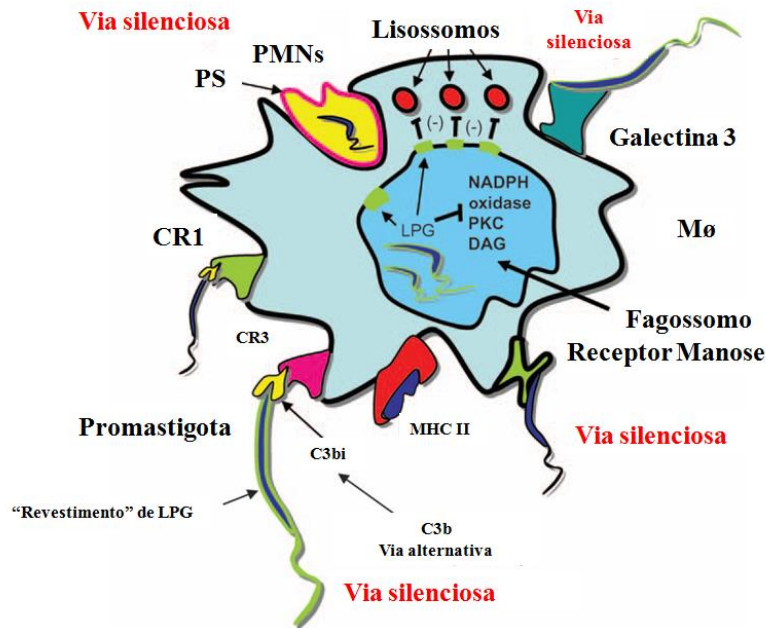
O material regurgitado pelo inseto contendo parasito tem como principal componente a proteoglicana filamentosa (fPPG), glicoproteína secretada pela *Leishmania* capaz de aumentar a capacidade de sobrevivência e patogenicidade dos parasitos. Diferentes estudos mostraram que a inoculação de parasitos na ausência da fPPG gera lesões mais discretas, diferentemente de quando é inoculado na presença em animais de laboratório que passam a apresentar uma exarcebação da doença (Coura, 2005). Contudo, a saliva do flebotomíneo também tem papel importante nesta fase inicial, pois possui o maxadilán, que além de possuir ação vasodilatadora, apresenta ação imunomoduladora que facilita o sucesso da infecção (Coura, 2005).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os parasitos precisam evadir aos mecanismos de defesa extra e intracelulares para estabelecer a infecção. O sistema complemento é um dos principais mecanismos de combate extracelular inicial, fazendo parte da resposta inespecífica do hospedeiro. Este sistema é formado por uma cadeia enzimática que resulta na lise celular, no processo de opsonização ou na geração de fragmentos peptídicos que vão atuar na ativação dos macrófagos. A forma metacíclica de *Leishmania* que é inoculada pelo inseto, sofre alterações membranares que dificultam a inserção do complexo C5b-C9, que fazem parte do complexo de ataque à membrana (MAC) do sistema complemento (Figura 1.12), evitando a formação de canais transmembranares no parasito e assim a lise e morte celular (McConville e cols., 1992; Sacks e Sher, 2002). Além disso, os promastigotas metacíclicos possuem elevada expressão de gp63 (glicoproteína de superfície) que cliva a molécula C3b na sua forma inativa C3bi, impedindo novamente a formação do complexo MAC (Brittingham e cols., 1995). Os receptores C3b e C3bi ainda acabam por promover a infecção, pois atuam na opsonização sem ativar mecanismos oxidativos microbicidas do fagócito (Sacks & Sher, 2002; Wright e cols., 1983). Estudos recentes indicam que o sistema complemento pode ainda exercer pressão seletiva na infecção por *Leishmania* com ação importante no controle da parasitemia (Laurenti e cols., 2004). Além da gp63 estar associada à resistência à lise pelo complemento, a elevada expressão desta em algumas espécies de *Leishmania* está sendo correlacionada ao aumento da virulência (Thiakaki e cols., 2006; Wilson e cols., 1989).



**Figura 1.12.** Via de regulação e ativação do sistema complemento [adaptado de (Kemper e Atkinson, 2007)].

Após evadirem da ação do sistema complemento, as formas promastigotas são fagocitadas preferencialmente por macrófagos, mas também podem ser fagocitadas por células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos, nas quais precisam modular o ambiente intracelular de forma a estabelecer a infecção. A ação fagocítica depende da interação de receptores (por exemplo: CR1, CR3, manose-fucose) do hospedeiro e moléculas de superfície do parasito, principalmente os lipofosfoglicanos (LPG) e gp63 (Figura 1.13) (Sacks e Sher, 2002; Turco e cols., 2001; Zambrano e cols., 2002). Após a entrada do parasito no macrófago, a LPG atua retardando a fusão fagolisossomal, o que evita que a forma promastigota seja destruída pelo ambiente ácido e inicie a diferenciação em amastigota, que é uma forma mais adaptada à explosão oxidativa do macrófago (Dermine e cols., 2000; Desjardins e Descoteaux, 1997). Antes da transformação em amastigota, a LPG e a gp63 ainda estão envolvidas na inibição da proteína cinase C (PKC) que possui sua translocação membranar diminuída (Giorgione e cols., 1996; Moore e cols., 1993; Olivier e cols., 1992).



**Figura 1. 13.** Mecanismos de evasão em *Leishmania spp.* [adaptado de (Peters e Sacks, 2006)].

A PKC e as proteínas tirosina cinases (PTKs), que são ativadas através de diferentes estímulos externos, são de suma importância na resposta microbicida do macrófago, pois se relacionam à síntese de intermediários reativos do oxigênio. A PKC e as PTKs ativam a NADH oxidase, responsável pela produção de superóxido e peróxido de hidrogênio pelo macrófago (Sacks e Sher, 2002). Desta forma, a inibição destas compromete a resposta microbicida do macrófago frente ao patógeno.

### 1.7. Quimioterapia das leishmanioses

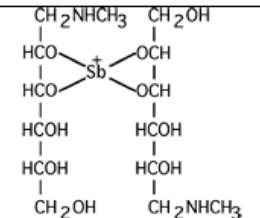
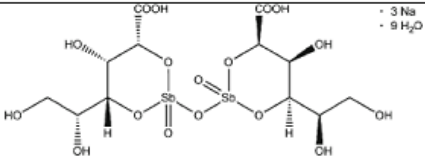
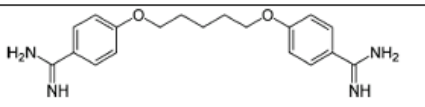
Atualmente na clínica os fármacos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes. O primeiro trabalho publicado acerca do tratamento das leishmanioses utilizando o antimônio data do século passado, em 1912, pelo médico brasileiro Gaspar Vianna que utilizava na clínica o antimônio trivalente (Vianna, 1912). Visando diminuir os efeitos tóxicos dos sais trivalentes surgiram os antimoniais pentavalentes na década de 20 e desde 1945 estão disponíveis duas formulações, o antimoníato de N-metilglucamina (Glucantime<sup>®</sup>) e o estibogluconato de sódio (Pentostam<sup>®</sup>) (Tabela 1.4). No Brasil a formulação utilizada

para o tratamento clínico é o antimoniato de N-metilglucamina (Tabela 1.5) (Ministério da Saúde, 2010).

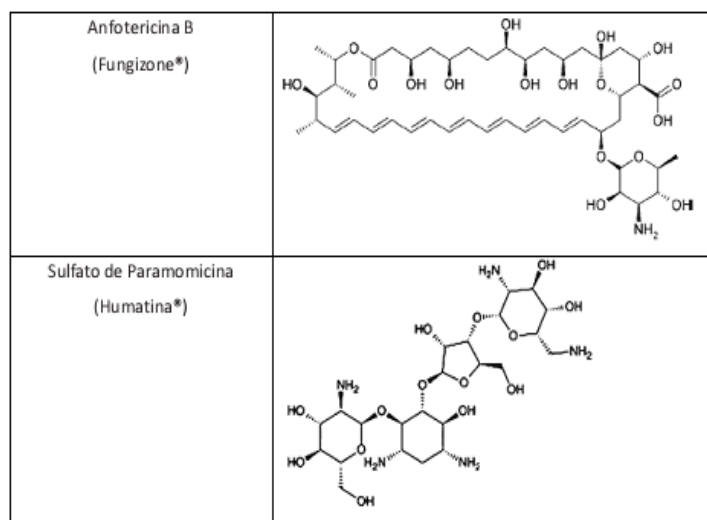
A forma de administração deste fármaco é por via intramuscular ou endovenosa diariamente por períodos de 20 a 30 dias de acordo com a forma clínica (Tabela 1.5) e que frequentemente requer hospitalização acarretando desconforto para o indivíduo acometido e elevando os custos. Até o momento, não se sabe precisamente o mecanismo de ação dos antimoniais, onde provavelmente sua ação se dá após a redução *in vivo* da forma pentavalente para a trivalente. Entretanto sabe-se que os antimoniais agem em diferentes alvos fundamentais para o parasito como a glicólise, a beta-oxidação de ácidos graxos e a inibição da fosforilação do ADP, a inibição da topoisomerase I, além de alterar o potencial tio-redox dos parasitos tornando-os mais suscetíveis (Chakraborty e Majumder, 1988; Franco e cols., 1995; Wyllie e cols., 2004).

O fato dos antimoniais serem utilizados na clínica há mais de 60 anos não confere uma vantagem, pois estes medicamentos apresentam variados e severos efeitos colaterais como náusea, dor abdominal, mialgia, nefrotoxicidade, pancreatite, arritmia cardíaca, hepatotoxicidade além de indícios de indução de mutagênese (Berman, 1988; Gasser e cols., 1994; Hepburn e cols., 1994; Léonard e Gerber, 1996; Sundar e cols., 1998). Além desses inconvenientes existe uma taxa de ineficácia crescente devido aos casos de resistência, sendo na Índia o seu uso descontinuado devido a este aumento (Croft e Coombs, 2003; Lira e cols., 1999; Sundar e cols., 2000).

**Tabela 1.4.** Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses (Singh e cols, 2004).

NOME: QUÍMICO E COMERCIAL	Estrutura Química
Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)	
Estibogluconato de Sódio (Pentostam®)	
Isotionato de Pentamidina (Pentamidina®)	





Atualmente são utilizados como fármacos de segunda escolha a anfotericina B e a pentamidina (Tabela 1.4). A anfotericina B (Fungizone®) é um antifúngico usado classicamente para micoses profundas a sua introdução no tratamento das leishmanioses ocorreu na década de 60, e a sua administração realizada através de infusão endovenosa (Carvalho e cols., 2000; Croft e Yardley, 2002; Croft e cols., 2006). A atividade leishmanicida da anfotericina B é decorrente da sua afinidade por esteróis de esqueleto ergostano, majoritários na membrana plasmática do parasito, formando poros levando a lise do protozoário. Entretanto, este fármaco também pode se ligar ao colesterol, que é componente principal da membrana plasmática de mamíferos, gerando efeitos colaterais sérios como anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, calafrios, febre, flebite, anemia, convulsões, anorexia e nefrotoxicidade (Carvalho e cols., 2000).

**Tabela 1.5.** Esquema terapêutico do antimoníato de N-metilglucamina segundo a OMS no Brasil [adaptado de (Ministério da Saúde, 2006)].

Forma clínica	Dose	Tempo de duração
LC	10-20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia (recomenda-se 15mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia)	20 dias
LCD	20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	20 dias
LM	20 mg/Sb <sup>+5</sup> /kg/dia	30 dias

Na busca de minimizar os efeitos tóxicos, novas formulações surgiram como a anfotericina B associada à liposomas (AmBisome<sup>®</sup>) que diminuiu a toxicidade com sucesso (Croft e Yardley, 2002). Contudo, o custo de sua produção é significativamente elevado (Sundar, 2001). No Brasil, o tratamento de casos de LMC com AmBisome<sup>®</sup> tem sido descrito com sucesso (Sampaio e Marsden, 1997), estando outras formulações disponíveis como o complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet<sup>®</sup>) e anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil<sup>®</sup>) que também tem mostrado resultados promissores para o tratamento das leishmanioses (Blum e Hatz, 2009).

A pentamidina é uma poliamina administrada por via parenteral, utilizada como segunda escolha no tratamento de pacientes acometidos por LV resistente ao tratamento com antimônio (Piscopo e Mallia, 2006). Sua atividade leishmanicida está associada com a interferência da síntese de poliaminas, inibindo a *S*-adenosil-L-metionina, a ornitina descarboxilase (ODC) e a espermidina sintase (Basselin e cols., 1997). Entretanto, o uso deste fármaco tem sido limitado devido à sua toxicidade levando a sintomas como dores locais, dores de cabeça, hipotensão, síncope, hipoglicemia, náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade (David e cols., 2009; Goto e cols., 2010; Ministério da Saúde, 2007).

A miltefosina representa um avanço recente no tratamento das leishmanioses, sendo o único medicamento administrado por via oral. Foi desenvolvido inicialmente pela ASTA Medica para o tratamento do câncer e sua atividade leishmanicida foi descrita em 1987 sobre *L. donovani* e licenciada em 2002. Sua atividade sobre o parasito se deve a interação com lipídeos, fosfolipídeos e esteróis da membrana plasmática (Barratt e cols., 2009; Rakotomanga e cols., 2007), bem como a interferência da funcionalidade de diferentes enzimas relacionadas com o metabolismo de fosfolipídeos, culminando na indução de apoptose nos parasitos (Barratt e cols., 2009). Os efeitos adversos citados são distúrbios gastrointestinais como náuseas, vômito e diarreia e toxicidade renal (JHA e cols., 1999; Sinderman e Engel, 2006). A miltefosina é contra-indicada durante a gravidez devido ao seu potencial efeito teratogênico.

A paromomicina é um aminoglicosídeo que teve sua atividade leishmanicida demonstrada em 1968 por Neal e colaboradores (Tabela 1.4). Este fármaco tem sido utilizado em formulação parenteral para o tratamento da LV em triagem clínica de fase III, e no tratamento da LC em formulação tópica e parenteral (Croft e cols., 2006). Três preparações de pomadas de paromomicina têm sido utilizadas para LC apresentando

resultados variáveis. Os efeitos adversos encontrados nos pacientes tratados com essas formulações foram erupções cutâneas e prurido local (Sundar e Chakravarty, 2008).

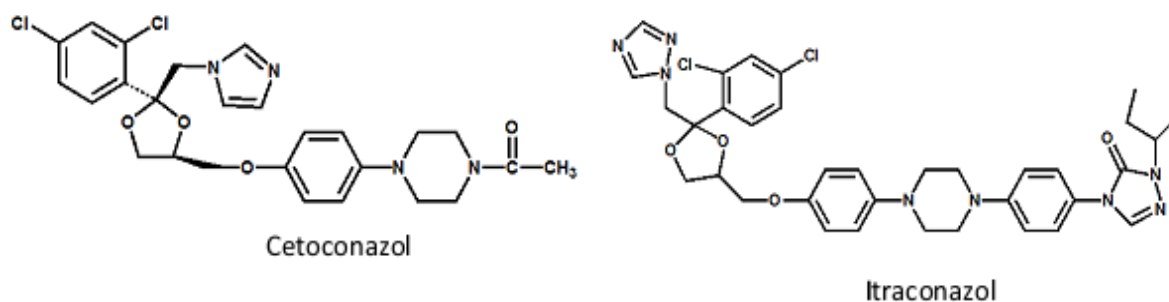
Outras propostas terapêuticas alternativas também têm sido avaliadas como a utilização do alopurinol em associação com o antimônio que tem apresentado resultados divergentes. Outros compostos como a dapsona, a rifampicina, a azitromicina, a sitamaquina, o imiquimod, dentre outros também têm tido sua atividade leishmanicida testada (Goto e cols., 2010; Singh e cols., 2004; Tuon e cols., 2008).

### **1.7.1. Derivados azólicos**

Azóis são conhecidos pela sua ampla utilização na quimioterapia de infecções fúngicas e em meados de 1980 teve descrita a sua atividade leishmanicida (Bermam e cols., 1984). Os azóis são assim definidos, pois são sistemas heterocíclicos nitrogenados aromáticos de cinco membros que podem conter adicionalmente oxigênio ou enxofre e podem ser classificados em: pirazol, imidazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, tetrazol e pentazol. De forma geral possuem grande importância farmacológica e alguns destes têm sido utilizados de forma alternativa para o tratamento da LC.

O cetoconazol, antifúngico que possui em sua estrutura um sistema imidazólico, é um conhecido inibidor da C-14 desmetilase inibindo a biossíntese dos esteróis do parasito, sendo utilizado em alguns casos clínicos de LC (Figura 1.14) (Blum e cols., 2009). Alguns resultados também indicam sua eficácia no tratamento da LV (Singh e cols., 2004). Outros antifúngicos como o itraconazol e o fluconazol apresentam nas suas estruturas o sistema 1,2,4-triazol sendo também conhecidos inibidores da biossíntese de esteróis (IBEs).

O itraconazol já foi avaliado para o tratamento da LC e LMC no Novo Mundo (Figura 1.14) (Amato e cols., 2007; Consigli e cols., 2006; Firooz e cols., 2006; White e cols., 2006) enquanto o fluconazol foi estudado apenas no tratamento da forma cutânea (Alrajhi e cols., 2002; Blum e cols., 2009). Outro derivado triazólico, o posoconazol também se mostrou eficaz no tratamento da infecção cutânea em modelo murino (Al Abdely e cols., 1999).



**Figura 1.14.** Estruturas químicas dos inibidores da biossíntese do ergosterol (Roberts e cols., 2003).

Os antifúngicos imidazólicos e triazólicos fazem parte da mesma classe de substâncias nitrogenadas heterocíclicas dos tetrazóis sendo descritos por sua atividade leishmanicida através da inibição da biossíntese de esteróis (Beach e cols., 1986; Berman e cols., 1986; Goad e cols., 1984; Ramos e cols., 1994). Alguns dos tetrazóis utilizados atualmente na clínica são o losartan (Corus<sup>®</sup>, Cozaar<sup>®</sup>) e o valsartan (Diovan<sup>®</sup>, Tareg<sup>®</sup>), que atuam bloqueando os receptores AT1 da angiotensina II, revertendo os efeitos vasoconstritores e da secreção da aldosterona, promovendo a atividade anti-hipertensiva (Bhuiyan e cols., 2009; Hanayama e cols., 2012).

Os tetrazóis também apresentam diferentes atividades biológicas como ação antiinflamatória, antitumoral, antimalárica e antifúngica (Bepary e cols., 2008; Biot e cols., 2004; Culakova e cols., 2012; Romagnoli e cols., 2012; Upadhayaya e cols., 2004). Recentemente, um novo derivado tetrazólico com atividade antifúngica (7-clorotetrazolo [5,1- c] benzo [1,2,4]triazina, CTBT) foi descrito como indutor de estresse oxidativo, aumentando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) em quatorze fungos testados (Culakova e cols., 2012). Entretanto, ainda não existem descrições sobre a atividade leishmanicida de derivados tetrazólicos. Neste contexto, na busca contínua por novos protótipos promissores, diferentes derivados tetrazólicos foram sintetizados e a sua atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* avaliada, assim como a interferência na biossíntese de esteróis e seu efeito sobre o metabolismo oxidativo de *L. amazonensis*.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral:**

Avaliar o potencial terapêutico de novos derivados tetrazólicos em ensaios pré-clínicos de leishmaniose cutânea experimental.

### **2.2. Objetivos específicos:**

- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* de novos derivados tetrazólicos;
- Avaliar a seletividade do protótipo selecionado sobre o parasito e a toxicidade sobre a célula hospedeira;
- Avaliar a atividade do protótipo selecionado em modelo murino de LC bem como a sua toxicologia renal e hepática;
- Investigar o mecanismo de ação do protótipo selecionado;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Fármacos**

##### **3.1.1. Derivados tetrazólicos**

Foram planejados e sintetizados nove derivados tetrazólicos no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense e gentilmente cedidos como parte de um projeto de colaboração pelo Dr. Maurício Santos e pela Dr<sup>a</sup> Alice Maria Rolim Bernadino.

##### **3.1.2. Antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime, Sanofi-Aventis)**

Utilizado como referência no experimento *in vivo*, foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (FIOCRUZ).

#### **3.2. Parasitos**

Foram utilizados para os ensaios *in vitro* e *in vivo* parasitos da espécie *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016), previamente isolados de lesões de camundongos infectados. Os parasitos foram mantidos a 26 °C em meio Schneider (Sigma, Sant Louis, EUA), acrescido de 10 % de soro fetal bovino (SFB), 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, até a quinta passagem.

#### **3.3. Animais**

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos BALB/c, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fiocruz (CECAL/FIOCRUZ – RJ). Os estudos realizados com estes animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais – CEUA (Licença CEUA – LW07/2010).

### **3.4. Atividade *in vitro* dos novos derivados tetrazólicos**

#### **Atividade antipromastigota**

Para avaliar a atividade antipromastigota dos derivados tetrazólicos promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio Schneider, foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado. Os parasitos foram ressuspensos ( $1 \times 10^7$  parasitos/mL) no sobrenadante previamente armazenado. As promastigotas foram então incubadas por 24h na presença de concentrações variadas dos derivados tetrazólicos (25-400 $\mu$ M) em placas de 96 poços (Costar, Nova Iorque, USA) a 26 °C.

Após o período de incubação, foram adicionados 22 $\mu$ L de MTT (5mg/mL) (brometo de tiazolil azul tetrazólio, Sigma) por poço. Este ensaio colorimétrico do MTT consiste na redução deste composto por redutases mitocondriais, formando cristais de formazana, que são solúveis em solventes orgânicos. Baseado neste princípio, após 2h da adição do MTT, foram adicionados 80 $\mu$ L de DMSO por poço (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 570nm em leitor de microplaca ( $\mu$ Quant Bio-Tek Instruments, Winooski). O cálculo do IC<sub>50</sub> (concentração que mata 50% dos parasitos) foi feito por análise de regressão logarítmica.

#### **Atividade antiamastigota**

Para avaliar a atividade sobre amastigotas intracelulares, macrófagos murinos foram obtidos por lavagem peritoneal em camundongos BALB/c com 5mL de meio RPMI gelado suplementado com 10% de SFB (Sigma, Sant Louis, USA). Macrófagos peritoneais ( $2 \times 10^6$ /mL) foram plaqueados em câmaras LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, EUA). Após 1h, as culturas foram lavadas com meio RPMI para remoção das células não aderentes e infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* (3 parasitos/macrófago). Posteriormente, as células foram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> e após 4h, as câmaras foram lavadas para remover os parasitos livres. A cultura foi então incubada com os derivados tetrazólicos em diferentes concentrações (0-200 $\mu$ M) por 72h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, as lâminas foram coradas com Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e atividade antiamastigota avaliada microscopicamente por contagem de pelo menos 100

macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos em índice de infecção (IF), utilizando a seguinte fórmula:  $IF = \% \text{ de células infectadas} \times \text{número de amastigotas/número total macrófagos}$ . O cálculo do  $IC_{50}$  foi feito por análise de regressão logarítmica.

### **3.4.1. Avaliação da citotoxicidade**

A citotoxicidade dos tetrazóis foi avaliada por duas metodologias distintas: por ensaio com MTT e pela dosagem de lactato desidrogenase no sobrenadante das culturas. Inicialmente, macrófagos peritoneais murinos não infectados foram plaqueados ( $2 \times 10^6$ ) em meio RPMI suplementado com 10% de SFB e incubados com os derivados tetrazólicos em diferentes concentrações a  $37^\circ\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$ , por 72h. Após o período de incubação o sobrenadante foi retirado e sobre as células foram adicionados 200 $\mu\text{L}$  de PBS contendo MTT 5mg/mL por poço. Após o período de 2h de incubação, o sobrenadante foi descartado, 80 $\mu\text{L}$  de DMSO foram adicionados por poço e a leitura da densidade óptica realizada no comprimento de onda de 570nm em leitor de microplaca.

Para dosar a lactato desidrogenase (LDH) liberada por células que tiveram a sua membrana plasmática rompida, macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* foram incubados com o protótipo MSN20 em diferentes concentrações por 72h. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e a liberação da enzima quantificada através da utilização de kit comercial (Doles, Goiânia, Brasil). A leitura da densidade óptica foi realizada no comprimento de onda de 510nm em leitor de microplaca. Os resultados foram expressos através do cálculo do  $LD_{50}$  (dose letal para 50% das células hospedeiras) e do índice de seletividade (IS) ( $LD_{50}/IC_{50}$  em amastigota intracelular).

### **3.4.2. Produção de Óxido Nítrico (NO)**

A produção de óxido nítrico foi estimada indiretamente pela quantificação de nitrito no sobrenadante, como descrito por Green e cols. (1982). Macrófagos peritoneais murinos ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) infectados por *L. amazonensis*, foram incubados com MSN20 em diferentes concentrações a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , pelo período de 72h. Em paralelo, macrófagos de linhagem J774 ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) não infectados foram estimulados



com LPS (5µg/mL) e IFN-γ (1ng/mL) e incubados com diferentes concentrações do protótipo MSN20 (25-100µM) a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> pelo período de 72h. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e adicionados com igual volume de reagente de Griess. Como padrão foi efetuada uma curva de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) a partir de solução estoque (200mM). Após a adição do reagente de Griess, foi mantida uma curta incubação de 20 min e realizada a leitura da densidade óptica no comprimento de onda de 540nm em leitor de microplaca.

### **3.5. Atividade *in vivo***

Camundongos BALB/c (5 por grupo), foram infectados no orelha direita com promastigotas de *L. amazonensis* (2 x 10<sup>6</sup>). O tratamento teve início 72h após a infecção de forma semelhante à descrita por Mendez e cols. (2009). Os animais infectados foram tratados por via oral com 30 mg/kg/dia e 7,5 mg/kg/dia de MSN20 por 46 dias. Os animais tratados com 30 mg/kg/dia de MSN20 foram infectados no dia zero e após o terceiro dia deu-se início ao tratamento que foi ininterrupto até o décimo terceiro dia, após esse período o tratamento foi realizado cinco vezes por semana até o quadragésimo nono dia. Os animais tratados com 7,5 mg/kg/dia de MSN20 também foram infectados no dia zero e após o terceiro dia o tratamento deu-se início e mantido ininterruptamente até o quadragésimo nono dia. Os animais controle foram tratados ou não por via intraperitoneal (IP) com 60 mg/kg/dia de antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>), ininterruptamente até o quadragésimo nono dia. O curso da doença foi acompanhado medindo-se a espessura da orelha infectada com paquímetro (Mitutoyo, São Paulo, Brasil), a cada 3 dias num total de 46 dias de tratamento. No final do experimento, os animais foram eutanasiados por inalação controlada de CO<sub>2</sub>, conforme preconizado pelo Manual de Utilização de Animais/Fiocruz e a carga parasitária da orelha infectada foi estimada pela análise por diluição limitante.

### **3.5.1. Toxicologia renal e hepática**

A coleta de sangue para análise bioquímica foi realizada de acordo com o Manual de Utilização de Animais/Fiocruz. As amostras coletadas foram centrifugadas a 3000g por 10 min. O soro obtido foi utilizado para análise dos seguintes parâmetros séricos: alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), além de fosfatase alcalina, para verificar a função hepática. Os parâmetros creatinina, ácido úrico e ureia foram avaliados para verificar a função renal. Essas análises foram realizadas através da Plataforma de Análises Clínicas de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz.

### **3.6. Avaliação do mecanismo de ação da MSN20**

#### **3.6.1. Efeito do protótipo MSN20 sobre o perfil de esteróis**

Promastigotas de *L. amazonensis* ( $1 \times 10^6$ ) foram incubadas na ausência e presença de diferentes concentrações de MSN20 em meio Schneider a 26°C por 72h. Como controle positivo, os parasitos foram incubadas em paralelo com 6µM de cetoconazol, um conhecido inibidor da C-14 desmetilase. Após 72h, as promastigotas foram centrifugadas, lavadas em PBS e ao pellet foi adicionada uma mistura de clorofórmio: metanol (2:1). Após a extração, o solvente foi evaporado em atmosfera de N<sub>2</sub> e os lipídios ressuspensos em clorofórmio. As placas de sílica gel (60F<sub>254</sub>; Merck) foram previamente impregnadas com nitrato de prata 1% em metanol. Os solventes utilizados para ascender pela placa em um primeiro momento foram hexano (60 ml), éter dietílico (40 ml) e ácido acético (1 ml), na segunda corrida foram utilizados hexano (80 ml), clorofórmio (20 ml) e ácido acético (1 ml). As amostras “plotadas” na placa de sílica gel foram reveladas com reagente de Charring (8% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 10% CuSO<sub>4</sub>; 5H<sub>2</sub>O) e posterior aquecimento em estufa a 200°C. As amostras então foram analisadas por cromatografia em camada fina (TLC).

### **3.6.2. Efeito do protótipo MSN20 sobre a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)**

Promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de MSN20 (25-100 $\mu$ M) a 26°C. Após 1, 2, 4 e 24 horas de incubação, os parasitos (1x10<sup>7</sup> parasitos/mL), foram lavados três vezes e ressuspensos em 600 $\mu$ L de solução salina balanceada de Hanks (HBSS) e foram plaqueados em triplicatas (200 $\mu$ L). A cada amostra foram adicionados 4 $\mu$ L de H<sub>2</sub>DCFDA por poço (1mM) (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína) (Invitrogen, Eugene, EUA). As amostras foram incubadas ao abrigo da luz por 30 min. A análise foi realizada em espectrofluorímetro (Spectra Max GEMINI XPS- Molecular Devices, Silicon Valley, EUA) com excitação a 507nm e a 530nm emissão.

### **3.6.3. Efeito do protótipo MSN20 sobre a integridade da membrana plasmática**

Promastigotas foram incubadas por 24h com diferentes concentrações (0-100 $\mu$ M) da MSN20. Os parasitos (5x10<sup>6</sup>/mL) foram incubados com 10 $\mu$ L de iodeto de propídeo (PI) (1mg/mL) por 10 min e mantidas refrigeradas até o momento da análise. O controle positivo foi obtido pelo aquecimento das células que foram levadas ao banho-maria por 10 min a 65°C. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o canal FL-2 e posteriormente analisados no programa Summit v4.3.

### **3.6.4. Efeito do protótipo MSN20 sobre o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) de promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado por duas ferramentas distintas: citometria de fluxo e por espectrofluorimetria. Os parasitos foram incubados com concentrações de 0-100 $\mu$ M do protótipo selecionado (MSN20) por 24h a 26°C. Para citometria de fluxo as promastigotas foram ajustadas para a concentração de 5x10<sup>6</sup>/mL e incubadas com

10µg/mL de rodamina 123 (Sigma-Aldrich) por 20 min protegido da luz. Como controle positivo células não tratadas foram incubadas com 20µM FCCP (Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona) por 20 min previamente à incubação com rodamina 123. A obtenção dos dados foi realizada no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o canal FL-1. Os dados foram posteriormente analisados no programa Summit v4.3. A análise das alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 foi quantificada a partir do Índice de Variação (IV) obtido pela equação:  $(MT - MC) / MC$  (Menna-Barreto e col., 2009) onde MT é a mediana de fluorescência dos parasitos tratados e MC é a mediana de fluorescência dos parasitos controle.

Alternativamente, promastigotas tratadas ( $2 \times 10^6$ ) com MSN20 por 24h em diferentes concentrações foram lavadas em PBS, ressuspensas em HBSS e 10µL do corante catiônico JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) (Sigma-Aldrich). Os parasitos foram incubados por 10 min protegidos da luz e em seguida centrifugados por 20 mins. Após a centrifugação, os protozoários foram ressuspensos em HBSS e transferidos para placas negras de 96 poços. As amostras foram analisadas em espectrofluorímetro (Spectra Max GEMINI XPS - Molecular Devices) nos comprimentos de onda 480/485nm de excitação e 530/590nm de emissão. A análise da razão entre intensidade de fluorescência vermelha/verde foi quantificada e representa o potencial mitocondrial.

### **3.6.5. Efeito do protótipo MSN20 sobre o ciclo celular**

Promastigotas ( $1 \times 10^6$ /mL) foram incubadas com MSN20 (0-100µM) pelo período de 24 e 48 h, ajustadas, fixadas em etanol 70% e mantidas a -20°C por 1h. Após a fixação as células foram centrifugadas e pellet ressuspensado em 500µL de RNase (200µg/mL) solubilizada em PBS e mantidas por uma hora a 37°. Posteriormente, adicionou-se 20 µL de iodeto de propídeo (PI) (1mg/mL) e os parasitos foram mantidos protegidos da luz em temperatura ambiente por 20 min. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o canal FL-2. Posteriormente, os dados foram analisados no programa Summit v4.3.

### 3.6.6. Efeito do protótipo MSN20 na fragmentação de DNA

A avaliação da ocorrência de fragmentação de DNA foi realizada através do ensaio de TUNEL (Promega, Madison, EUA). Promastigotas foram incubadas com MSN20 em diferentes concentrações (25-100 $\mu$ M) pelo período de 48h. Parasitos não tratados foram incubados com DNase (5 $\mu$ g/mL) por 10 min em temperatura ambiente e utilizadas como controle positivo. Os protozoários foram incubados (1x10<sup>7</sup>/mL) com a solução de fixação/ permeabilização (1mL) por 30 minutos a 25°C. Em seguida, foram lavados e foi adicionado o tampão de equilíbrio (80 $\mu$ L) por 5 min. As células foram centrifugadas e ressuspensas no tampão de marcação (51 $\mu$ L) e mantidas por 1h a 37°C, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida por adição de EDTA (20mM) e as células foram centrifugadas e ressuspensas em solução de BSA 5mg/mL + 0,1% de Triton-X-100. Em seguida, as células foram novamente centrifugadas, lavadas e ressuspensas em 500 $\mu$ L de solução de RNase (250 $\mu$ g/mL) em PBS. Os dados foram adquiridos no citômetro de fluxo FACSCalibur utilizando-se o canal FL-1. Posteriormente, os dados foram analisados no programa Summit v4.3.

### 3.7. Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados no mínimo em triplicata e repetidos pelo menos 2 vezes. As análises estatísticas foram realizadas no programa *Graph Pad Prism* 5.0. Os dados foram comparados pelos testes ANOVA com pós-teste de Bonferroni (\* p<0,05, \*\* p<0,001, \*\*\* p<0,001) e teste *t* de Student.

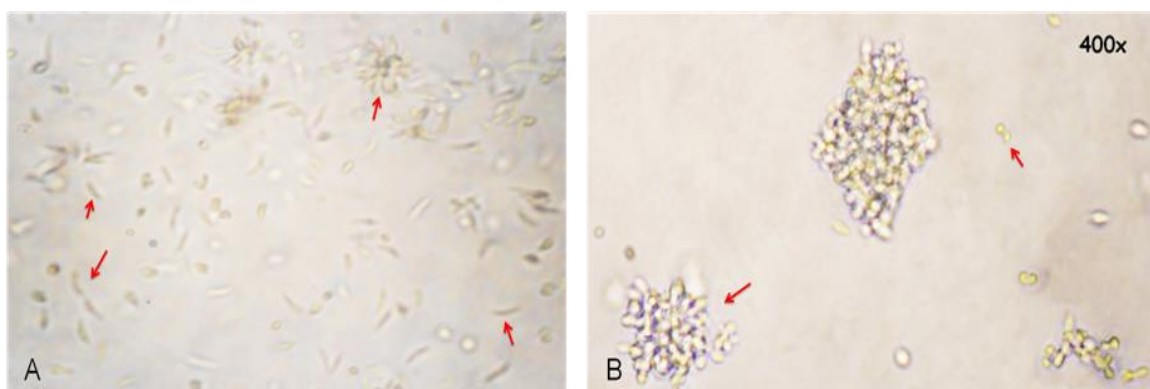
## 4. RESULTADOS

### 4.1. ATIVIDADES ANTIPROMASTIGOTA E ANTIAMASTIGOTA

Na busca por novos protótipos promissores, uma série de nove derivados tetrazólicos foi sintetizada. Entre os derivados da série, a única diferença estrutural reside na natureza ou na posição dos substituintes ligados ao anel aromático (inserto na tabela 4.1) e inicialmente foi investigada a atividade leishmanicida *in vitro* dos diferentes protótipos.

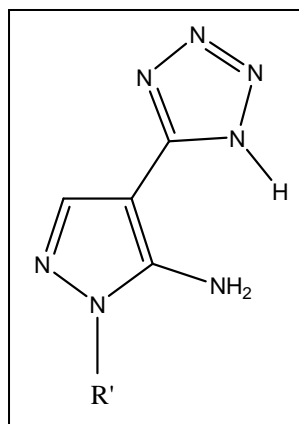
Primeiramente os derivados foram avaliados contra promastigotas *L. amazonensis* pelo período de 24h. Dentre os derivados testados, apenas os halogenados 2-Cl (MSN08), 2-F (MSN09), 3-Br (MSN14) e o metoxilado na posição 4 (MSN20) apresentaram atividade antipromastigota ( $IC_{50} < 100\mu M$ ). Desta série, o derivado 4-metoxi (MSN20) foi o mais ativo dentre os novos protótipos tetrazólicos testados com  $IC_{50}$  de 37,1  $\mu M$  (Tabela 4.1).

Promastigotas tratadas com MSN20 por 72h apresentaram alterações morfológicas como o arredondamento do corpo celular quando observadas por microscopia de luz (Figura 4.1).



**Figura 4.1.** O protótipo MSN20 induz alterações morfológicas em promastigotas. (A) Promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas apresentam corpo celular tipicamente alongado. (B) Parasitos incubados com MSN20 (100 $\mu M$ ) por 72h apresentam corpo celular arredondado, quando observados por microscopia de luz. Setas vermelhas indicam o fenótipo predominante em cada condição.

**Tabela 4.1.** Relação estrutura-atividade dos derivados tetrazólicos sobre as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*.

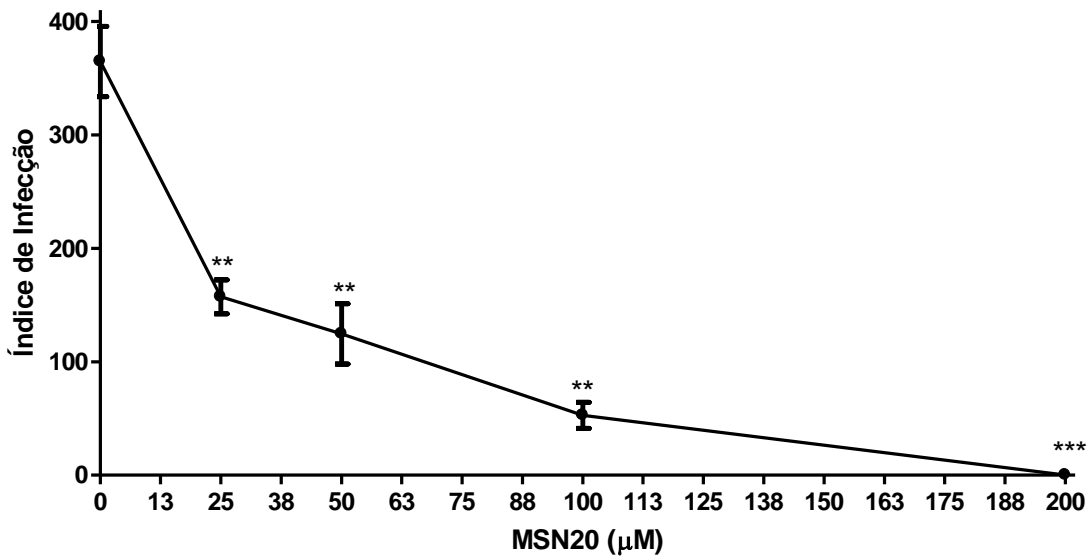


**Estrutura química básica dos derivados**

Compostos	R'	IC <sub>50</sub> (μM)/24h	
		Promastigotas	Amastigotas
MSN01		388± 6	130,5
MSN02		379± 3.1	-
MSN08		75,8± 7.2	46,5
MSN09		91,4±0.1	>100
MSN10		102,6±13.1	97,0
MSN11		144,8±0.0	-
MSN14		78,5±3.4	106,6
MSN20		37,1 ± 1.0	22,3

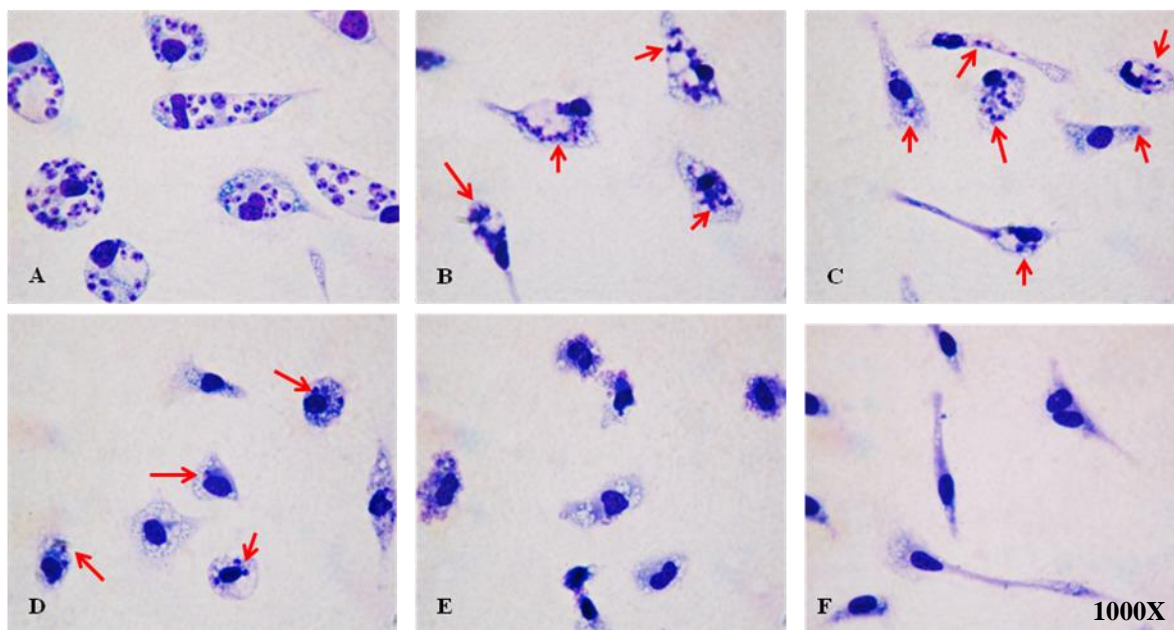
O derivado 4-metoxi (MSN20) mostrou-se o mais ativo contra amastigotas intracelulares dentre todos os derivados tetrazólicos da série, com IC<sub>50</sub> de 22,3 µM (Tabela 4.1). O índice de infecção, que correlaciona o número de amastigotas intracelulares e o percentual de macrófagos infectados, também apresentou redução dose dependente (Figura 4.2).

Os macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* e tratados com o protótipo MSN20 não apresentaram alterações morfológicas à microscopia de luz. Não foi observado efeito tóxico aparente durante o tratamento com diferentes concentrações de MSN20 pelo período de 72 h, sugerindo que o protótipo é seletivamente citotóxico para os parasitos (Figura 4.3).



**Figura 4.2.** Atividade anti-amastigota do protótipo MSN20. Macrófagos peritoneais murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com MSN20 nas concentrações indicadas. Este gráfico é representativo de 3 experimentos realizados em triplicatas (n = 3). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 em relação ao controle.





**Figura 4.3.** Fotomicrografia de macrófagos infectados e tratados com MSN20 por 72h. Macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* foram incubados com o protótipo MSN20. (A) Controle; (B) MSN20 (25 $\mu$ M); (C) MSN20 (50 $\mu$ M); (D) MSN20 (100 $\mu$ M); (E) MSN20 (200 $\mu$ M); (F) Macrófagos não infectados. Observe as setas em vermelho indicando os parasitos intracelulares encontrados no tratamento com as menores concentrações do protótipo.

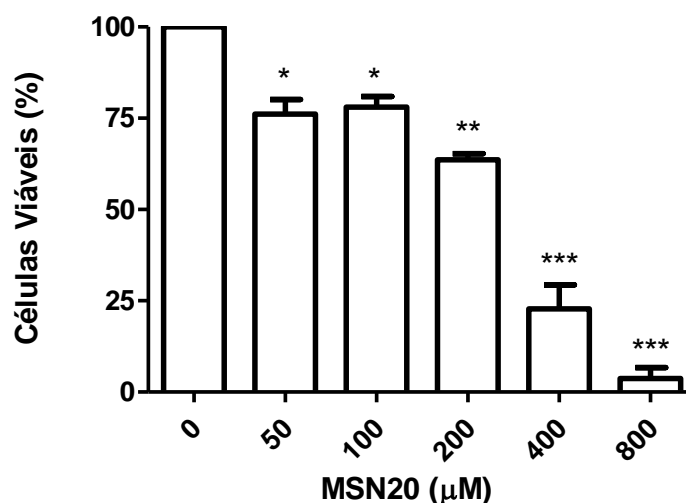
#### 4.2. AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DOS DERIVADOS TETRAZÓLICOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINOS

Para investigar os efeitos citotóxicos dos derivados tetrazólicos sobre a célula hospedeira, macrófagos peritoneais murinos foram incubados com os diferentes protótipos pelo período de 72h e a viabilidade avaliada colorimetricamente por ensaio com MTT (Tabela 4.2). MSN20 apresentou LD<sub>50</sub> (dose letal pra 50% das células hospedeiras) igual a 210,6 $\mu$ M (Figura 4.4) e índice de seletividade (LD<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> em amastigota intracelular) igual a 9,42 de forma que é necessário uma concentração 9 vezes maior do que a concentração que mata 50% dos parasitos intracelulares pra causar efeitos tóxicos para a célula hospedeira.

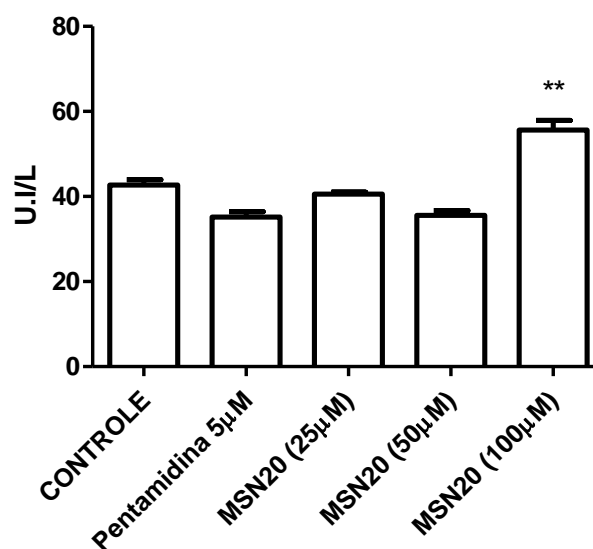
**Tabela 4.2.** Efeitos citotóxicos dos derivados tetrazólicos. Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com diferentes concentrações dos derivados tetrazólicos pelo período de 72h. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente por ensaio com MTT.

DERIVADOS TETRAZÓLICOS	LD <sub>50</sub> (μM)
MSN01	>500
MSN02	>500
MSN04	192,2
MSN08	185,2
MSN09	93,92
MSN10	>250
MSN11	>500
MSN14	500
MSN20	210,6

Adicionalmente, o protótipo MSN20 teve seu efeito citotóxico corroborado através da dosagem de LDH. A dosagem de LDH no sobrenadante dos macrófagos infectados revelou que o tratamento com MSN20 não alterou significativamente a concentração desta em relação ao controle (Figura 4.5). Somente em concentrações elevadas, como 100 μM de MSN20 foi detectado um aumento significativo da enzima no sobrenadante.



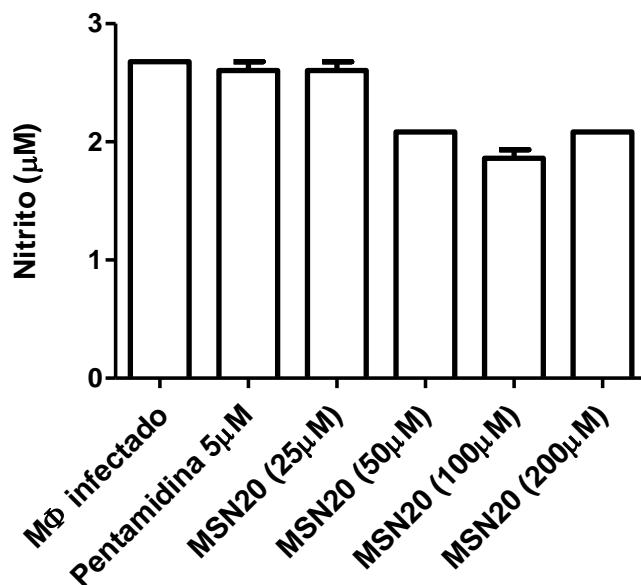
**Figura 4.4.** Efeito citotóxico do protótipo MSN20. Macrófagos peritoneais murinos foram incubados com MSN20 em diferentes concentrações pelo período de 72h. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente por ensaio com MTT. Este gráfico é representativo de 3 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.



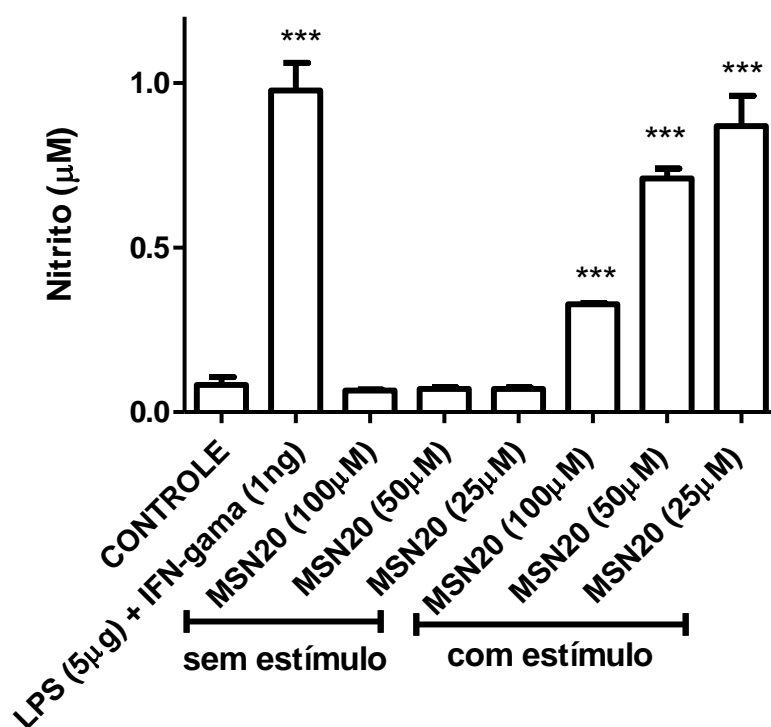
**Figura 4.5.** Efeito citotóxico do protótipo MSN20 por dosagem de LDH. Macrófagos infectados com *L. amazonensis* foram incubados na ausência e na presença de MSN20 por 72 h a 37°C. A pentamidina foi utilizada como fármaco de referência. \*U.I./L: Unidades internacionais por litro. Este gráfico é representativo de 2 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.

### 4.3. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

Macrófagos peritoneais murinos infectados e tratados com MSN20 em diferentes concentrações por 72h tiveram a determinação indireta de NO realizada por dosagem em sobrenadantes de cultura do seu metabólito nitrito, através da reação de Griess. A análise da produção de nitrito apontou uma tendência estatisticamente não significativa de redução de produção de NO (Figura 4.6). Experimentais adicionais utilizando estímulos indutores da iNOS foram realizados. Macrófagos de linhagem J774 sem qualquer infecção, estimulados com LPS (5µg/mL) e IFN-γ (1ng/mL) foram tratados com diferentes concentrações do protótipo MSN20. A análise da produção de nitrito apresentou redução da produção de NO dependente da concentração (Figura 4.7).



**Figura 4.6.** Dosagem de nitrito. Macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis* foram incubados com MSN20 por 72h. O nitrito no sobrenadante foi quantificado com base na reação de Griess. Este gráfico é representativo de 2 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.



**Figura 4.7.** Dosagem de nitrito. Macrófagos de linhagem J774 foram estimulados com LPS (5µg/mL) e IFN-γ (1ng/mL) e incubados com MSN20 por 72 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. O nitrito no sobrenadante foi quantificado com base na reação de Griess. Este gráfico é representativo de 2 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.

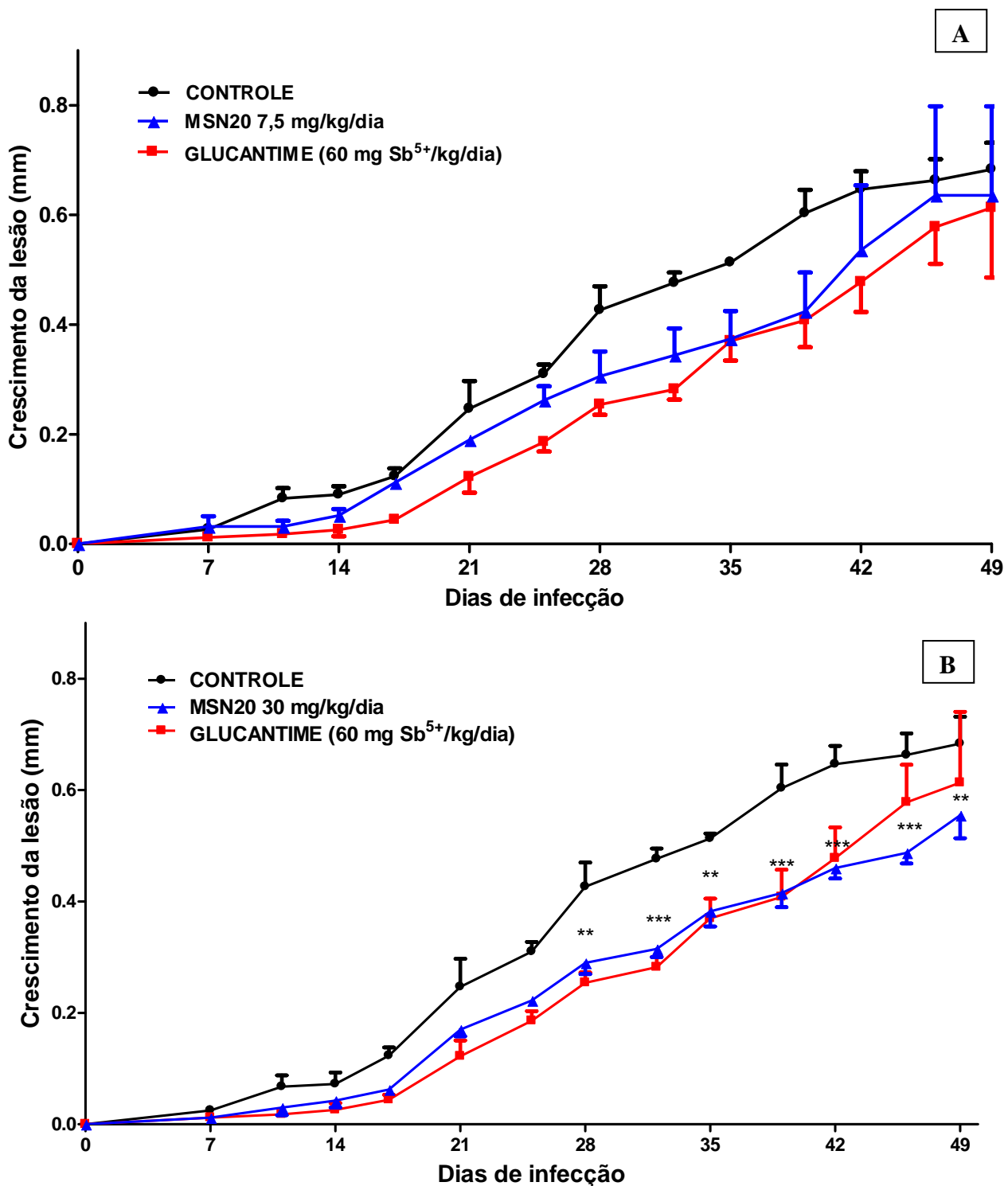
#### **4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA MSN20 *in vivo* POR VIA ORAL**

Considerando os resultados dos experimentos *in vitro*, avaliou-se a eficácia da administração oral de MSN20 no modelo murino de LC. O tratamento com MSN20 foi eficiente e reduziu o desenvolvimento da lesão no modelo murino de leishmaniose cutânea (Figura 4.8 a e b).

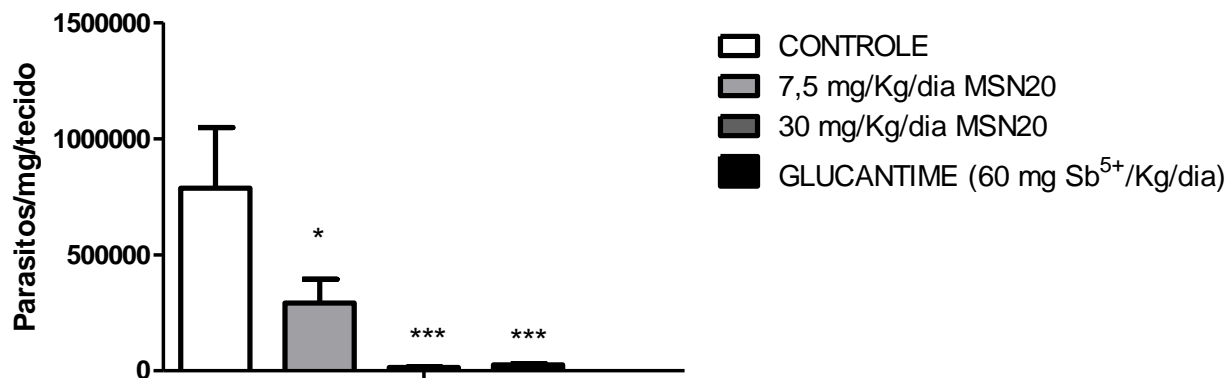
O tratamento com 7,5 mg/kg/dia de MSN20 apresentou uma redução a partir do vigésimo oitavo dia, entretanto a concentração administrada não foi suficiente para manter a redução no tamanho das lesões até o término do tratamento (Figura 4.8 a). Quando a concentração foi aumentada para 30 mg/kg/dia de MSN20 o tratamento foi eficiente e reduziu significativamente as lesões a partir do vigésimo oitavo dia (Figura 4.8 b).

A carga parasitária nas lesões foi analisada ao término dos 46 dias de tratamento e também apresentou redução significativa em todos os grupos tratados com MSN20 (30 mg/kg/dia e 7,5 mg/kg/dia) em relação ao grupo controle que recebeu apenas o veículo (Figura 4.9).

É importante ressaltar que durante o tratamento não foram observados sinais de toxicidade nos camundongos como, redução significativa do peso, perda de pêlos ou letargia.



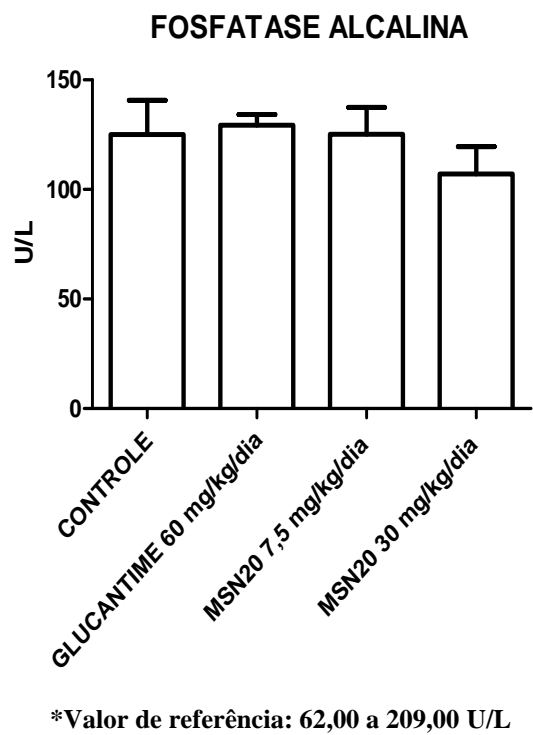
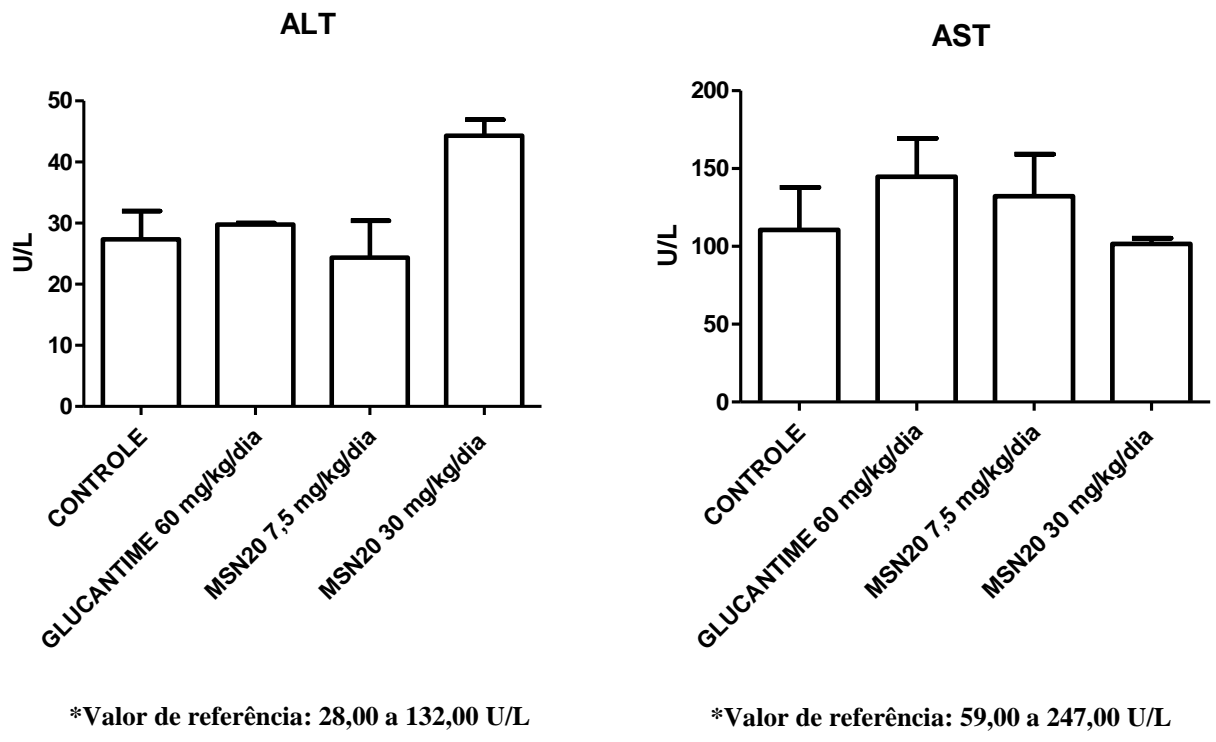
**Figura 4.8.** Atividade *in vivo* da MSN20 por vias sistêmicas. Camundongos BALB/c infectados por via subcutânea na orelha direita com  $2 \times 10^6$  promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Tratados por via oral com 7,5 mg/kg/dia. (B) Tratados por via oral com 30 mg/kg/dia de MSN20. Como controle positivo camundongos foram tratados com 60 mg Sb<sup>5+</sup>/kg/dia de Glucantime® por via intraperitoneal. O desenvolvimento da lesão foi acompanhado 2 vezes por semana, medindo a orelha infectada com paquímetro. Ao final do tratamento os animais foram eutanasiados. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.



**Figura 4.9.** Redução da carga parasitária após o tratamento por via oral com MSN20. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

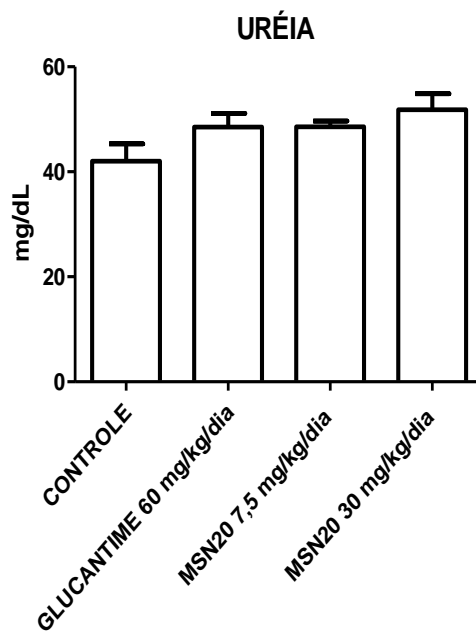
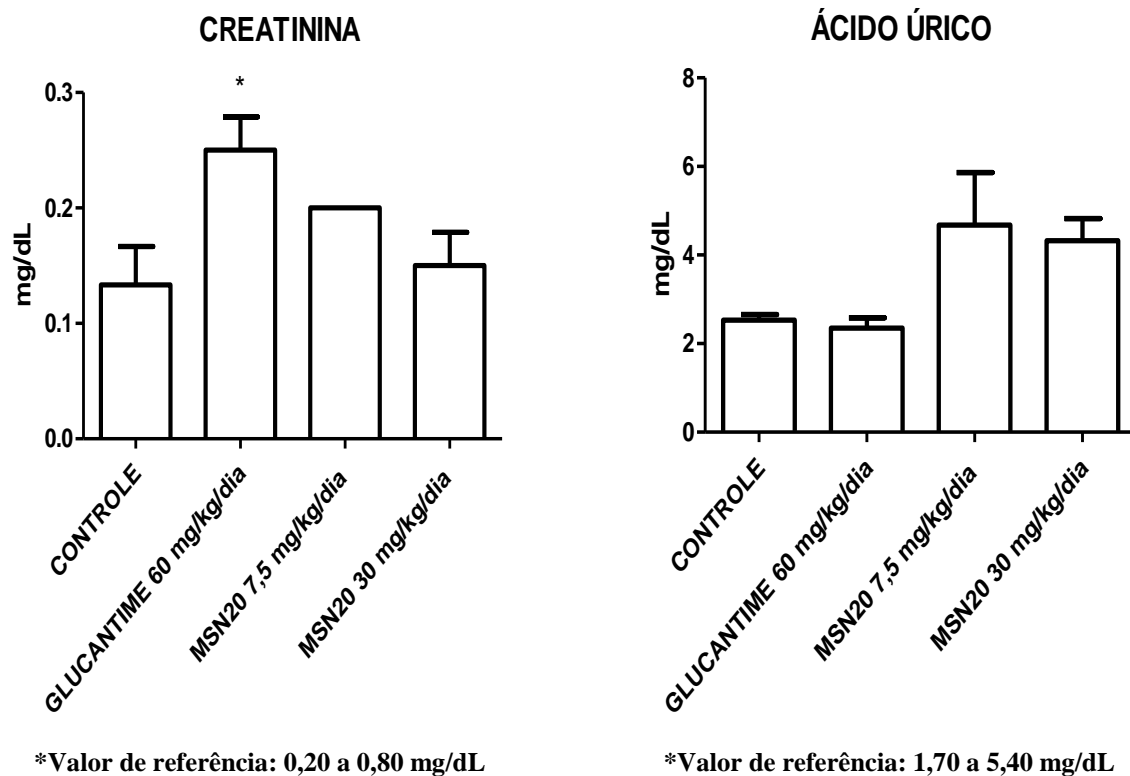
#### 4.5. AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA SISTÊMICA DO TRATAMENTO *in vivo*

Marcadores sorológicos foram avaliados em animais tratados por via oral com MSN20. Não houve diferenças significativas nos níveis séricos das transaminases hepáticas (ALT e AST) bem como nos níveis de fosfatase alcalina (Figura 4.10). É importante ressaltar que todos os grupos apresentaram resultados dentro dos valores de referência de cada um dos marcadores sorológicos dosados para investigar a atividade hepática. Para avaliar se o tratamento com o protótipo gerou dano renal foram dosados os níveis séricos de creatinina, ácido úrico e uréia. O protótipo MSN20 não elevou significativamente os níveis séricos de nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 4.11), sendo observado um aumento nos níveis séricos de creatinina apenas após tratamento com 60 mg/Kg/dia de Glucantime. Os grupos apresentaram resultados dentro dos valores de referência dos marcadores creatinina e ácido úrico e todos os grupos apresentaram valores de uréia superiores aos valores de referência.



**Figura 4.10.** O tratamento sistêmico com MSN20 não alterou marcadores hepáticos de toxicidade. No dia 49 após a infecção, o sangue foi coletado, e o soro utilizado para a determinação colorimétrica de alanino aminotransferase (ALT), aspartato transaminase (AST) e fosfatase alcalina (FAL), como parâmetros de toxicidade para o fígado. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.



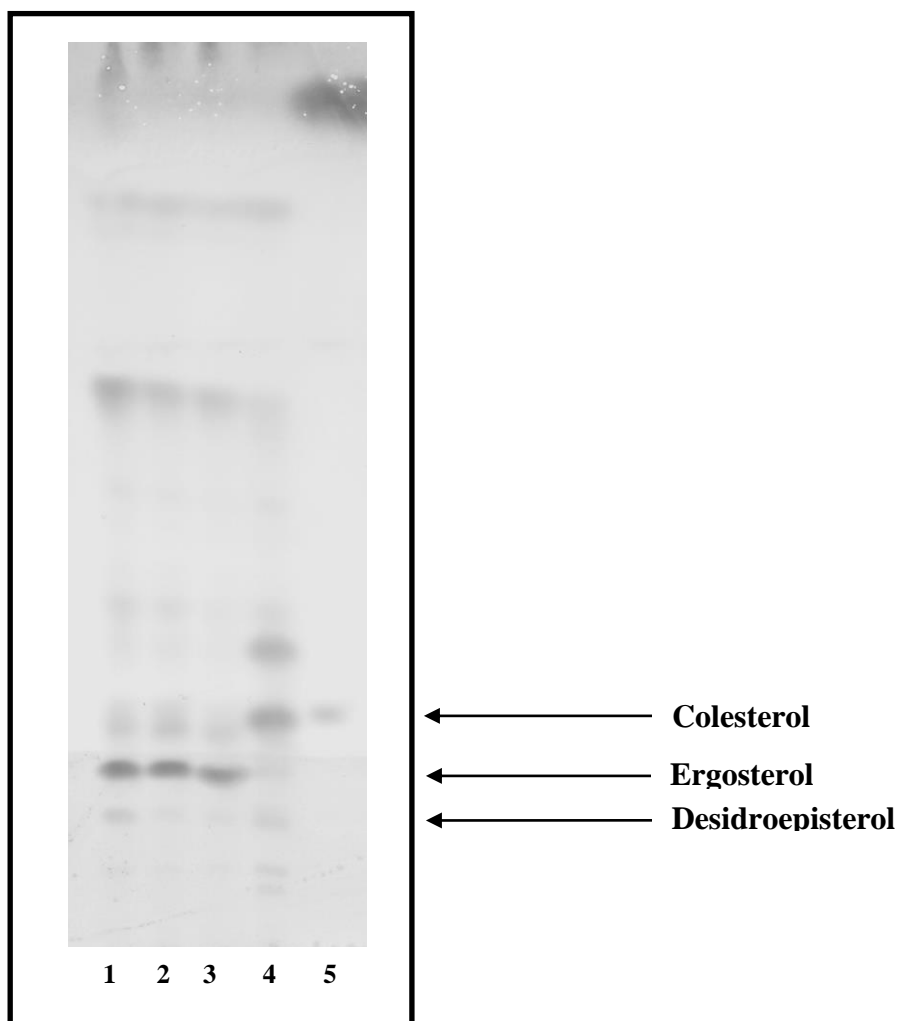


\*Valor de referência: 18,00 a 29,00 mg/dL

**Figura 4.11.** O tratamento sistêmico com MSN20 não alterou marcadores renais de toxicidade. No dia 49 após a infecção, o sangue foi coletado, e o soro utilizado para a determinação colorimétrica de creatinina, ácido úrico e uréia, como parâmetros de toxicidade renal. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao controle.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE O METABOLISMO DE ESTERÓIS DO PARASITO

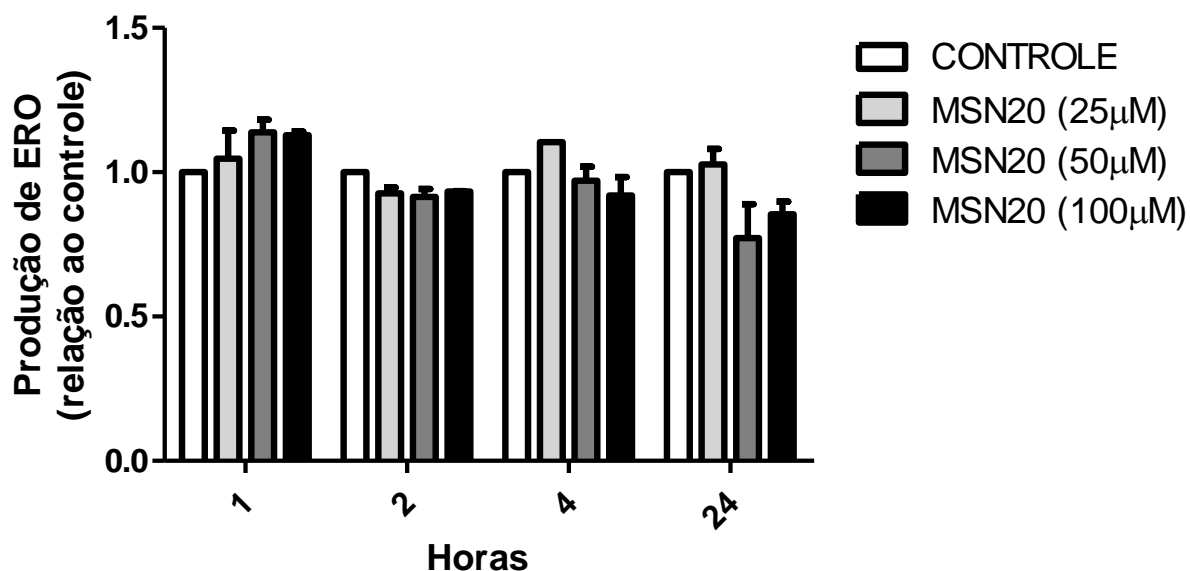
O efeito da MSN20 sobre a biossíntese de ergosterol foi investigado por TLC. Promastigotas foram tratadas com concentrações superiores ao  $IC_{50}$  e como controle positivo, foram tratadas com cetoconazol ( $6\mu M$ ) que é inibidor da C-14 desmetilase. Entretanto, em todos os extratos de parasitos tratados com MSN20 não houve alteração no perfil de esteróis, mesmo na maior concentração de  $100\mu M$  (Figura 4.12).



**Figura 4.12.** A MSN20 não interfere com a biossíntese de esteróis. Promastigotas foram incubadas na ausência e na presença de diferentes concentrações de MSN20 ( $50-100\mu M$ ) e  $6\mu M$  de Cetoconazol por 72h. Os lipídeos neutros foram extraídos e a separação foi realizada em cromatografia de camada fina (TLC). 1- Controle; 2- MSN20 ( $100\mu M$ ); 3- MSN20 ( $50\mu M$ ); 4- Cetoconazol  $6\mu M$ ; 5-Colesterol.

#### 4.7. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)

Para investigar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) em formas promastigotas, foi utilizado o marcador H<sub>2</sub>DCFDA. Promastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de MSN20 pelo período de 1, 4 e 24 horas. O tratamento com o protótipo MSN20 em diferentes concentrações não revelou aumento significativo na geração de ERO (Figura 4.13).

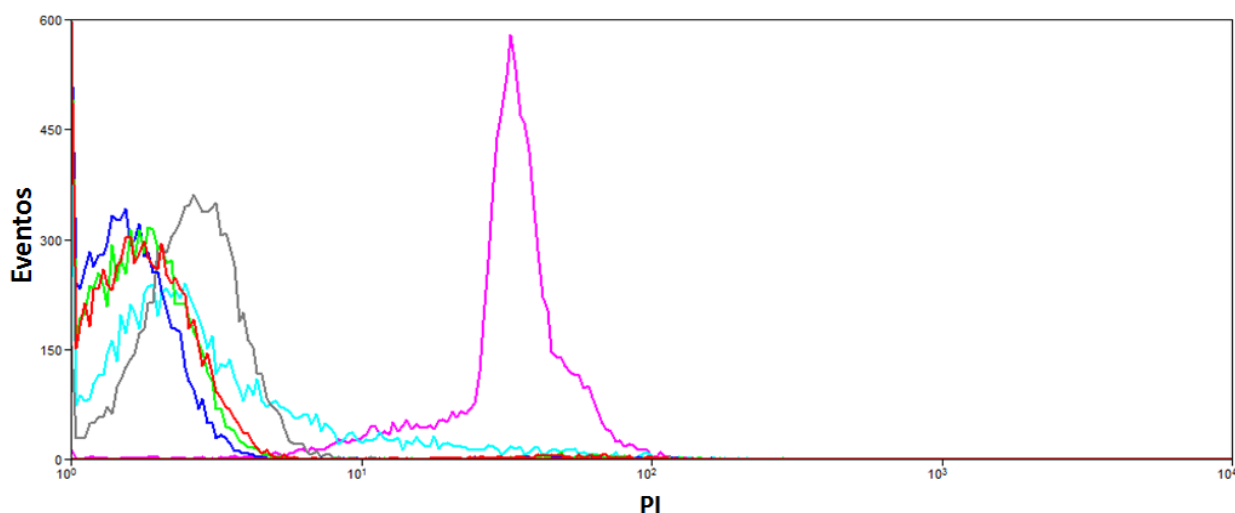


**Figura 4.13.** Quantificação de espécies reativas de oxigênio. Promastigotas foram incubadas na ausência e na presença do MSN20 em diferentes concentrações pelo período de 1, 4 e 24 horas e posteriormente incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA. O tratamento com o protótipo MSN20 não revelou aumento significativo na produção de ERO. Este gráfico é representativo de 3 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.

#### 4.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE A INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

Para avaliar se o tratamento com o MSN20 induz perda da integridade nas membranas de promastigotas utilizou-se a marcação de parasitos não fixados com PI e posterior análise por citometria de fluxo. O PI é um conhecido intercalante de DNA que não atravessa membranas celulares íntegras, de forma que a marcação por este corante é um método eficaz para analisar a integridade de membranas celulares.

O tratamento com o MSN20 não alterou a integridade da membrana celular, de forma que células tratadas e não tratadas não apresentaram marcação de PI (Figura 4.14), apresentando perfil distinto ao controle positivo.

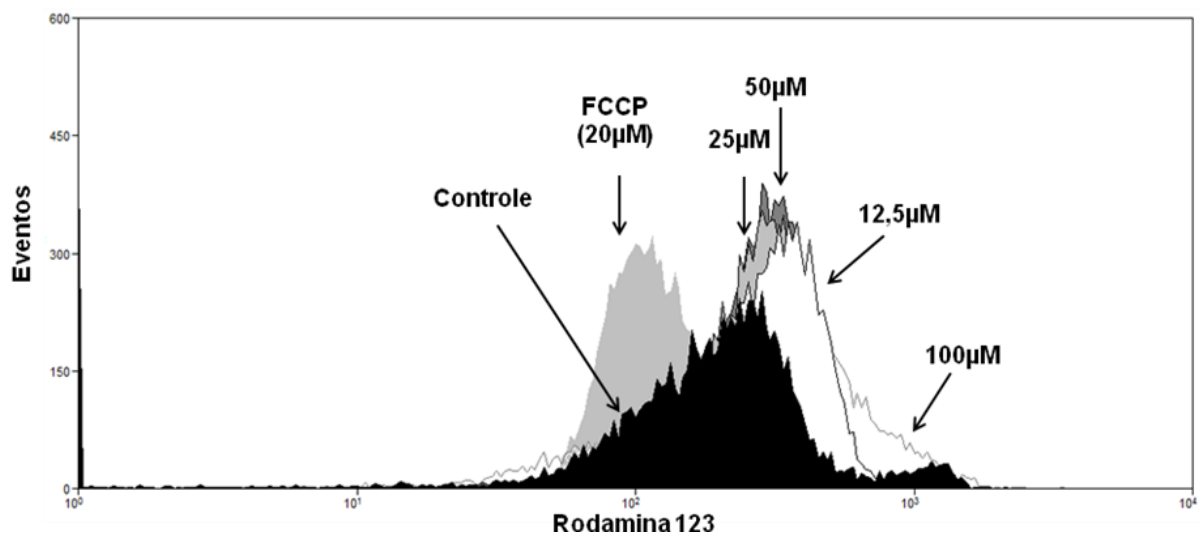


**Figura 4.14.** A MSN20 não altera a integridade da membrana plasmática de promastigotas. Promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de MSN20 (12,5-100 $\mu$ M) por 24h e posteriormente foram incubadas com PI. Como controle positivo, células não tratadas foram aquecidas a 65°C por 10 min. Vermelho: controle; verde: 12,5 $\mu$ M MSN20; azul marinho: 25 $\mu$ M MSN20; cinza: 50 $\mu$ M MSN20; azul claro: 100 $\mu$ M; rosa: controle positivo. A sobreposição é representativa de 3 experimentos.. Os histogramas foram obtidos usando-se o programa Summit v4.3.

#### 4.9. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE O ( $\Delta\Psi_m$ )

Para investigar se o tratamento com MSN20 induz a perda do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ), utilizou-se duas abordagens distintas por citometria de fluxo, usando o fluorocromo rodamina 123 e espectrofluorimetria com o corante catiônico JC-1.

Promastigotas tratadas com MSN20 em concentrações gradativas e analisadas por citometria de fluxo, não apresentaram a intensidade de marcação de rodamina 123 reduzida, o que indica que o tratamento com este protótipo não induziu a despolarização da membrana mitocondrial (Figura 4.15). A intensidade de fluorescência também foi quantificada a partir do IV e os parasitos tratados com MSN20 não apresentaram valores negativos correspondentes à perda do  $\Delta\Psi_m$  (Tabela 4.3).

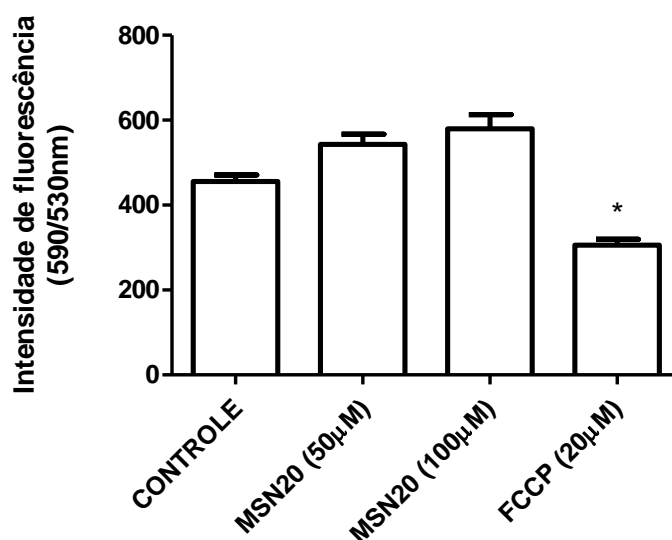


**Figura 4.15.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. O protótipo MSN20 não induziu a despolarização da membrana mitocondrial. Setas indicam na sobreposição dos histogramas referentes aos parasitos sem tratamento (controle), incubados com diferentes concentrações de MSN20 (12,5-100 $\mu$ M) e incubados com o desacoplador mitocondrial FCCP (20 $\mu$ M). Esta sobreposição é representativa de 3 experimentos. Os histogramas foram obtidos usando-se o programa de Summit v4.3.

**Tabela 4.3.** Análise  $\Delta\Psi_m$  e índice de variação (IV) de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com MSN20.

Agente	$\mu\text{M}$	Índice de Variação
MSN20	0	0,00
	25	0,287
	50	0,333
	100	0,986
FCCP	20	-0,438

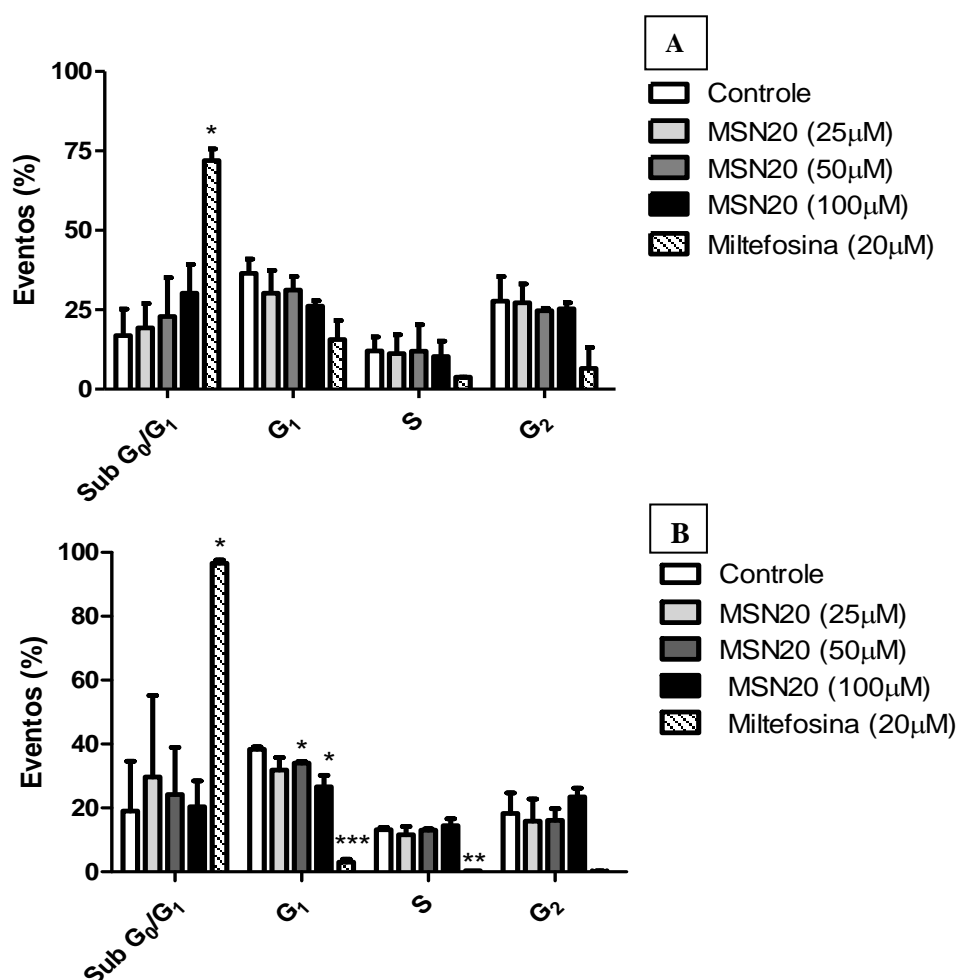
O  $\Delta\Psi_m$  também foi investigado espectrofluorimetricamente, através de marcação com o corante catiônico JC-1. De maneira similar ao ensaio por citometria de fluxo, a MSN20 em diferentes concentrações não induziu a redução do  $\Delta\Psi_m$  de promastigotas tratadas (Figura 4.16).



**Figura 4.16.** Avaliação do potencial de membrana mitocondrial por espectrofluorimetria. Formas promastigotas foram incubadas por 24 horas na ausência e na presença do MSN20 em diferentes concentrações e posteriormente incubadas com o JC-1. O protótipo MSN20 não induziu redução do potencial de membrana mitocondrial. Este gráfico é representativo de 3 experimentos realizados em triplicatas (n =3). \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.

#### 4.10. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA MSN20 SOBRE O CICLO CELULAR

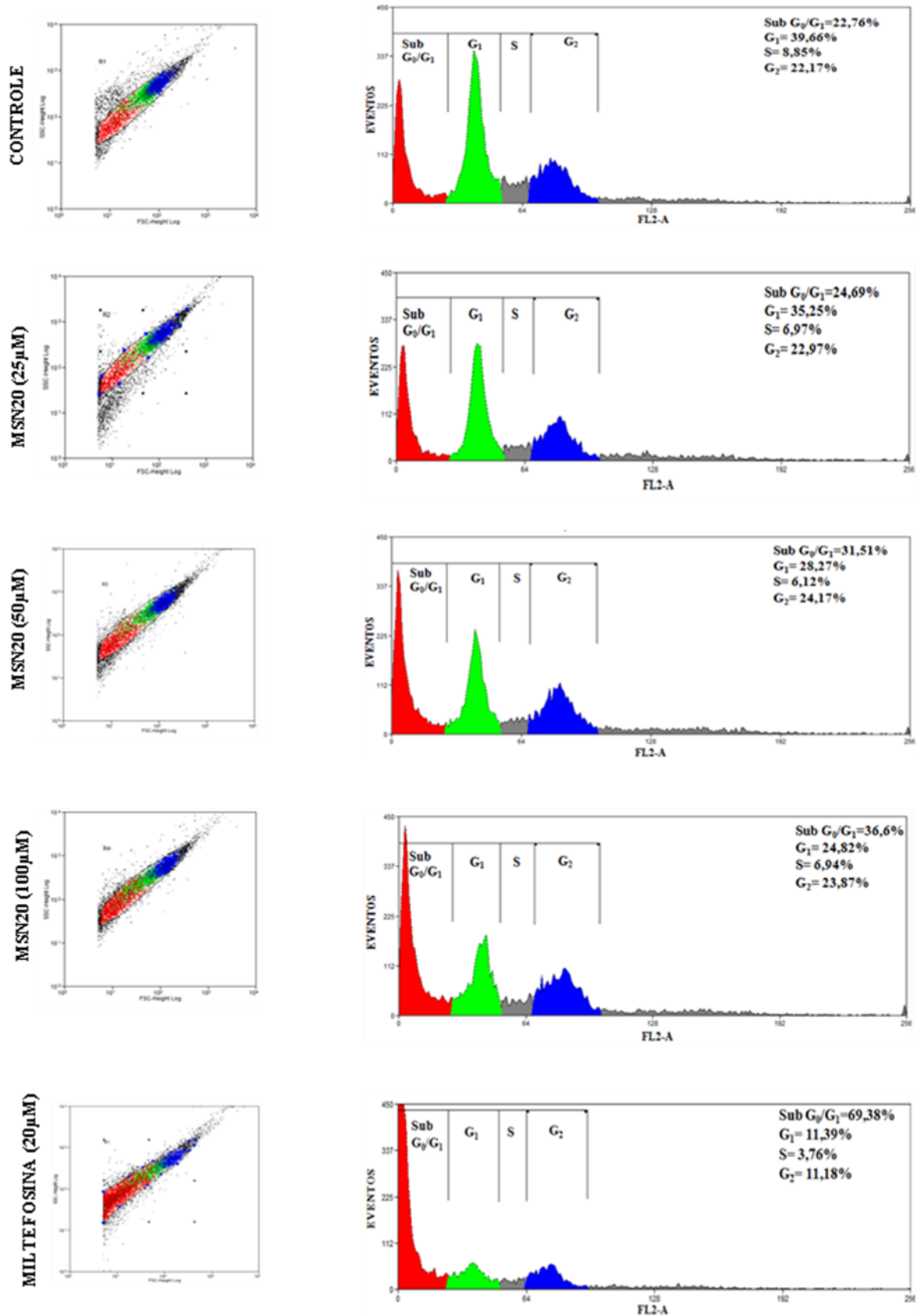
Para análise do ciclo celular, foi realizado o ensaio de incorporação de PI em parasitos permeabilizados. Promastigotas incubadas na ausência e na presença de MSN20 (25-100 $\mu$ M) pelo período de 24 e 48h foram permeabilizadas e marcadas com PI. Como controle positivo promastigotas foram incubadas com miltefosina (20 $\mu$ M) e avaliadas por citometria de fluxo. O tratamento com MSN20 não interferiu significativamente com o ciclo celular dos parasitos em nenhum dos tempos avaliados (Figuras 4.17, 4.18 e 4.19).



**Figura 4.17.** Avaliação do efeito da MSN20 sobre o ciclo celular de *L. amazonensis* por citometria de fluxo. (A) Promastigotas foram incubadas com MSN20 por 24h. (B) Promastigotas foram incubadas com MSN20 por 48h. O protótipo MSN20 não interferiu significativamente com o ciclo celular do parasito. Este gráfico é referente a 3 experimentos (n =3). \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 em relação ao controle.

## MORFOLOGIA

## FENÓTIPO

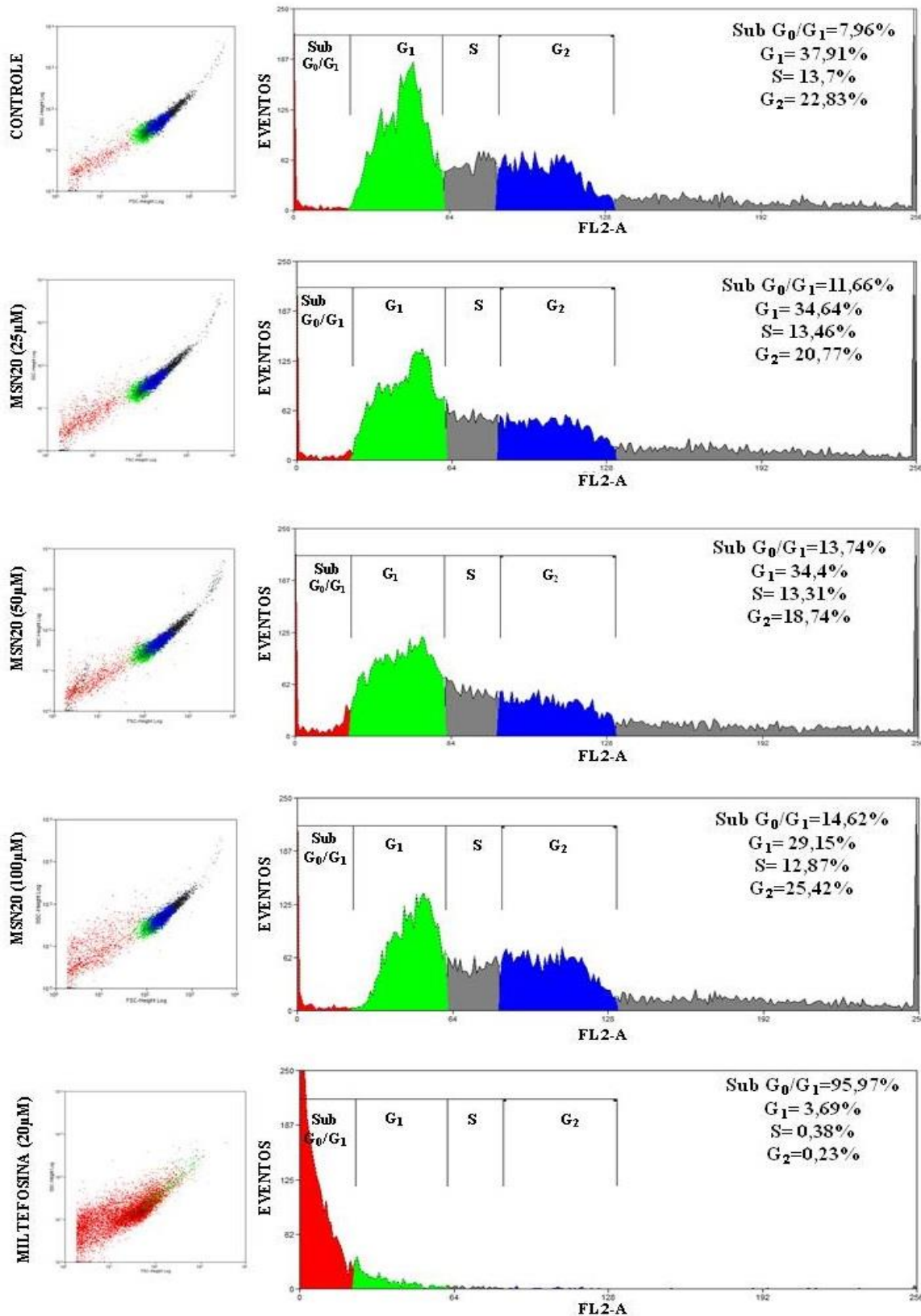


**Figura 4.18.** Efeito da MSN20 sobre o ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas incubadas com MSN20 por 24 h. Os histogramas são representativos de 3 experimentos e foram obtidos usando-se o programa Summit v4.3. Vermelho: Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; verde: G<sub>1</sub>; cinza: S; azul: G<sub>2</sub>.



## MORFOLOGIA

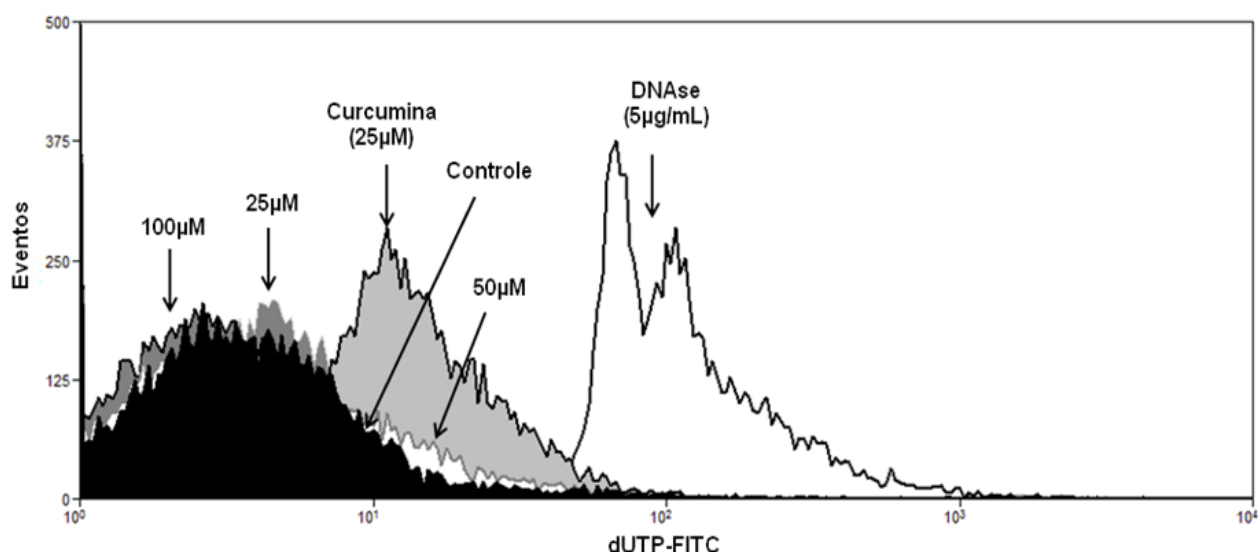
## FENÓTIPO



**Figura 4.19.** Efeito da MSN20 sobre o ciclo celular de promastigotas de *L. amazonensis*. Promastigotas incubadas com MSN20 por 48 h. Os histogramas são representativos de 3 experimentos e foram obtidos usando-se o programa Summit v4.3. Vermelho: Sub G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>; verde: G<sub>1</sub>; cinza: S; azul: G<sub>2</sub>.

#### 4.11. AVALIAÇÃO DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Para avaliar se o tratamento com o MSN20 induz a fragmentação do DNA de promastigotas foi utilizada como ferramenta o ensaio de TUNEL. Após 48 horas de tratamento a MSN20 não foi capaz de induzir a fragmentação de DNA, mesmo quando tratadas em concentrações superiores ao IC<sub>50</sub> (Figura 4.20).



**Figura 4.20.** Efeito da MSN20 sobre a fragmentação de DNA em promastigotas de *L. amazonensis* por citometria de fluxo. Parasitos foram incubados com MSN20 (25-100µM) por 48 h. Como controle positivo promastigotas foram incubadas com 5µg/mL de DNase. Os histogramas são representativos de 3 experimentos e foram obtidos usando-se o programa Summit v4.3.

#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho se propôs a estudar potenciais candidatos a fármacos leishmanicidas dentro da classe dos tetrazóis. Tetrazóis 1-substituídos são amplamente encontrados em antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e em preparações antifúngicas, além de tetrazóis 5-substituídos serem muito utilizados em substituição isostérica a grupos carboxílicos. Esse bioisosterismo ocorre devido a propriedade dos tetrazóis serem ionizados em pH fisiológico ( $\sim 7.4$ ) e apresentarem estrutura planar que lhe confere dez vezes mais lipofilicidade que os correspondentes ácidos, facilitando a penetração em membranas celulares. Um exemplo de substituição é o fármaco anti-hipertensivo losartan. Tetrazóis 1,5-dissubstituídos são utilizados como isósteres da ligação cis-amida de peptídeos e são encontrados em antibióticos  $\beta$ -lactâmicos da classe das cefalosporinas. Essas substâncias também possuem atividade antituberculose e antiinflamatória, sendo os tetrazóis 2,5-dissubstituídos moduladores dos receptores glutamato e exibem atividade antiviral (Myznikov e cols., 2007).

Os tetrazóis, além das atividades previamente citadas como atividades antiinflamatória (Bepary e cols., 2008) e antifúngica (Culakova e cols., 2012; Upadhayaya e cols., 2004), ainda possuem atividade antitumoral (Romagnoli e cols., 2012) e antimalárica (Biot e cols., 2004). Entretanto, como já foi descrito anteriormente sua atividade leishmanicida até o presente momento não havia sido investigada.

Na primeira parte deste trabalho buscou-se investigar a atividade *in vitro* dos novos protótipos tetrazólicos sintetizados e o composto 5-[5-amino-1-(4'-metoxifenil)-1H-pirazol-4-il]-1H-tetrazol (MSN20) foi o mais promissor sobre promastigotas de *L. amazonensis*, com  $IC_{50}$  de 37,1  $\mu M$  (Tabela 4.1). Contra amastigotas intracelulares, forma encontrada no hospedeiro vertebrado e, portanto, de maior relevância, o composto MSN20 teve sua atividade aumentada com  $IC_{50}$  de 22,3  $\mu M$  (Tabela 4.1). O protótipo MSN20 apresentou  $LD_{50}$  *in vitro* igual a 210,6  $\mu M$  (Figura 4.4) e IS igual a 9,42, de forma que o protótipo afeta a célula hospedeira apenas em concentrações bem maiores que a necessária para matar o parasito.

O protótipo MSN20 também foi capaz de reduzir *in vitro* a produção de NO em cultura de macrófagos não infectados e estimulados (Figura 4.7). Como descrito na literatura, macrófagos ativados utilizam a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) para sintetizar óxido nítrico (NO) (Mori & Gotoh, 2000; Nathan e Xie, 1994) como

importante resposta microbicida do hospedeiro. É importante ressaltar que a produção de NO, assim como a produção de ERO e diferentes perfis de citocinas pelo macrófago ativado fazem parte do mecanismo microbicida frente à invasão de diferentes patógenos. Entretanto, estes intermediários altamente reativos, também possuem alta toxicidade para os tecidos do hospedeiro. De forma que, protótipos capazes de reduzir e/ou controlar os níveis de NO podem prevenir efeitos colaterais danosos aos tecidos do hospedeiro.

Após selecionar o protótipo mais promissor *in vitro*, avaliou-se a eficácia no controle do desenvolvimento da lesão no modelo murino de LC. A MSN20 reduziu o desenvolvimento das lesões quando administrado por via oral (Figura 4.8) sendo capaz de diminuir significativamente a carga parasitária do local da infecção (Figura 4.9). Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi exibido nos animais tratados, como alterações comportamentais ou perda de peso, e os principais marcadores sorológicos de toxicidade hepática e renal não foram significativamente alterados pelo tratamento (Figuras 4.10 e 4.11). Dessa forma, nossos resultados apontam a MSN20 como potencial candidato a fármaco para tratamento da leishmaniose.

Por outro lado, um passo fundamental no desenvolvimento de um novo fármaco é elucidar os seus mecanismos de ação. Devido ao fato de azóis com atividade antifúngica da classe dos imidazóis e triazóis possuírem alta atividade de inibição da biossíntese de esteróis em tripanossomatídeos (Goad, 1984) investigou-se se mecanismo semelhante estaria envolvido na ação leishmanicida da MSN20. A biossíntese de esteróis do parasito foi investigada por TLC, que revelou que o tratamento com MSN20 não apresentou qualquer alteração no perfil de esteróis (Figura 4.12).

Devido a recente descrição de um novo tetrazol com atividade antifúngica (7-clorotetrazolo 5,1-c benzo 1,2,4 triazina (CTBT)), atuando no metabolismo oxidativo induzindo aumento da formação de EROs (Culakova e cols., 2012), investigou-se a produção de EROs durante o tratamento com MSN20 (Figura 4.13). Entretanto, nossas análises não apontaram o envolvimento de EROs e da mitocôndria na ação do protótipo (Figuras 4.15 e 4.16).

Em seguida, avaliou-se se o tratamento com MSN20 induz ou não alterações nas membranas de promastigotas. O processo de morte celular é um passo importante que pode ser induzido por estímulos intra e extracelular e podem ser classificados em três tipos principais de acordo com suas características bioquímicas e morfológicas em apoptose, necrose e autofagia (Grivicich e cols., 2007). A morte necrótica apresenta

características morfológicas típicas como o aumento no volume celular (Kerr e cols., 1972), desorganização citoplasmática, perda da integridade da membrana plasmática e lise celular com conseqüente extravasamento do conteúdo citoplasmático (Grivicich e cols., 2007; Ziegler e cols., 2004). Já a morte apoptótica, de modo geral apresenta retração celular, condensação de cromatina, alterações mitocondriais e a manutenção da membrana plasmática que forma corpos apoptóticos que serão posteriormente fagocitados (Hengartner, 2000; Taylor e cols., 2008). A autofagia contribui primordialmente para a sobrevivência celular através da degradação de macromoléculas e reciclagem de organelas, atuando assim na manutenção da homeostasia (Brennand e cols., 2011; Duszenko e cols., 2011). Entretanto, algumas substâncias podem induzir uma exacerbação deste processo, culminando na morte celular em tripanosomatídeos (Bera e Cols., 2003; Fernandes e cols., 2011).

Como o tratamento com MSN20 por 24h não alterou a integridade da membrana plasmática (Figura 4.14) a possibilidade de morte necrótica foi descartada e outros parâmetros característicos do processo de morte apoptótica como a fragmentação de cromatina e alterações no ciclo celular foram investigados. O tratamento com MSN20 não induziu a fragmentação de cromatina (Figura 4.20) e não foi capaz de alterar o ciclo celular do parasito (Figuras 4.17, 4.18 e 4.19) de forma que estes resultados indicam que o protótipo não desencadeia um processo de *apoptose-like*.

Apesar da autofagia não ter sido investigada durante o tratamento com MSN20, não podemos descartar essa possibilidade, uma vez que a integridade de membrana plasmática também é mantida neste tipo de morte celular.

Esses resultados sugerem que embora os tetrazóis sejam uma classe química amplamente estudada, nosso composto de estudo apresenta modo de ação distinto dos já conhecidos de forma que são necessários estudos mais aprofundados para uma descrição do possível mecanismo de ação da MSN20.

## 6. CONCLUSÕES

- O tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com novos derivados tetrazólicos promoveu a inibição da proliferação celular, sendo o protótipo 5-[5-amino-1-(4'-metoxifenil)-1*H*-pirazol-4-il]-1*H*-tetrazol (MSN20) o mais promissor .
- O tratamento com o protótipo promissor MSN20, foi capaz de reduzir o número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e o índice de infecção de forma concentração-dependente.
- MSN20 foi seletivamente citotóxico para os parasitos intracelulares (IS= 9,42).
- MSN20 reduziu os níveis de óxido nítrico (NO) *in vitro*.
- A MSN20 demonstrou ser um protótipo promissor, com atividade em LC murina (via oral), sem causar toxicidade hepática e renal.
- Os estudos sobre o mecanismo de ação de MSN20 mostraram o não envolvimento: (A) da via de biossíntese de ergosterol; (B) do metabolismo oxidativo e mitocondrial; (C) da fragmentação do DNA; (D) da modulação do ciclo celular.
- Desta forma, apresentamos no presente trabalho um novo protótipo tetrazólico, a MSN20, ativo por via oral na leishmaniose cutânea murina, com o mecanismo de ação distinto dos demais azóis, que necessita de estudos adicionais para ser elucidado.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al Abdely HM, Graybill JR, Loebenberg D, Melby PC. Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniases. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999. 43 (12): 2910-2914.

Almeida RP, Barral-Netto M, De Jesus AMR, De Freitas LAR, Carvalho EM, Barral A. Biological behavior of *Leishmania amazonensis* isolated from humans with cutaneous, mucosal, or visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Am J of Trop Med and Hyg.* 1996. 54:178-84.

Alrajhi AA, Ibrahim EA, De Vol EB, Khairat M, Faris RM, Maguire JH. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Eng J of Med.* 2002. 346 (12):891-895.

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M, WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Plos One.* 2012. 7 (5): e35671. Epub 2012 May 31.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006. 22 (12), 552-557.

Amato VS, Tuon FF, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: Systematic review. *Am J Trop Med Hyg.* 2007. 77 (2): 266-274.

Ashford RW. The Leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000. 30: 1269-81.

Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SCF. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007. 101 (7), 735-737.

Barrat G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM. Cellular Transport and Lipid Interactions of Miltefosine. *Current Drug Metabolism*. 2009.10 (3): 247-255.

Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1997. 85 (3): 274-82.

Beach DH, Goad LJ, Holz GG. Effects of Ketoconazole on Sterol Biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *Biochem and Biophys Res Comm*. 1986. 136 (3): 851-856.

Bepary S, Das BK, Bachar SC, Kundu JK, Samsur Rouf ASS, Datta BK. Anti-inflammatory activity of indanyltetrazole derivatives. *Pak. J. Pharm Sci*. 2008. 21 (3), 295-298.

Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Mol Biochem Parasitol*. 2003.127 (1): 23-35.

Berman JD, Gallalee JF, Gallalee JV. Pharmacokinetics of pentavalent antimony (Pentostam) in hamsters. *Am J Trop Med Hyg*. 1988. Jul; 39 (1):41-5.

Berman JD, Goad LJ, Beach DH, Holz GG. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor-Cells. *Mol and Biochem Parasitol*. 1986. 20 (1):85-92.

Berman JD, Holz GG, Beach DH. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of *Leishmania mexicana* promastigotes in culture. *Mol and Biochem Parasitol*. 1984. 12 (1): 1-13.

Beyrer C, Villar JC, Suwanvanichkij V, Singh S, Baral SD, Mills EJ. Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet*. 2007. 370: 619-27.



Bhuiyan MA, Ishiguro M, Hossain M, Nakamura T, Ozaki M, Miura S, Nagatomo T. Binding sites of valsartan, candesartan and losartan with angiotensin II receptor 1 subtype by molecular modeling. *Life Sci.* 2009. 85 (3-4):136-40.

Biot C, Bauer H, Schirmer RH, Davioud-Charvet E. 5-substituted tetrazoles as bioisosteres of carboxylic acids. Bioisosterism and mechanistic studies on glutathione reductase inhibitors as antimalarials. *J Med Chem.* 2004. 47(24):5972-83.

Blum JA, Hatz CF. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Travelers. *J of Travel Med.* 2009. 16 (2):123-131.

Brennan A, Gualdrón-López M, Coppens I, Rigden DJ, Ginger ML, Michels PA. Autophagy in parasitic protists: unique features and drug targets. *Mol Biochem Parasitol.* 2011. 177 (2): 83-99.

Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM. Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1995. 155: 3102-11.

Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis: What do we know about its chemotherapy? *Braz J Pharm Sci.* 2000. 36: 69-96.

CDC. Centers for disease control and prevention. 2011. <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. 2011.

Centre for applied Entomology and Parasitology. 2005.

Chakraborty AK e Majumder HK. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988. (152) 2: 605-11.

Consigli J, Daniello C, Gallerano V, Papa M, Guidi A. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. *Int J of Dermatol.* 2006. 45(1):46-49.

Coura JR. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. 2005. Vol. 1. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan.

Croft SL e Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol. 2003. (19) 11: 502-8.

Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. Indian J Med Res. 2006. 123 (3): 399-410.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol. Rev. 2006. 19 (1):111-+

Croft SL, Yardley V. Chemotherapy of leishmaniasis. Curr Pharm. 2002. 8 (4): 319-42.

Culakova H, Dzugasova V, Gbelska Y, Subik J. CTBT (7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine) producing ROS affects growth and viability of filamentous fungi. FEMS Microbiol. Lett. 2012. 328 (2): 138-43.

Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimald G Jr. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. Parasitol Today. 2000. 16: 142-4.

David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Dermatol Ther. 2009. 22 (6), 491-502.

Den Boer M, Argaw D, Jannin J, Alvar J. Leishmaniasis impact and treatment access. Clin Microbiol Infect. 2011. Oct; 17 (10): 1471-7.

Dermine JF, Scianimanico S, Privé C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. Cell Microbiol. 2000. 2:115-126.

Desjardins M, Descoteaux A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. J of Exp Med. 1997. 185: 2061-2068.

Desjeux P. Focus: Leishmaniasis. Nat. Ver. Microbiol. 2004. 2 (9) 692-3.

Desjeux P & Alvar J. Leishmania/ HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol. 2003. (13) 97.

DNDi. Doenças negligenciadas: panorama. Acessado em 2012. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>.

DNDi. Iniciativa de drogas para as doenças negligenciadas. 2007. [HTTP://www.dndi.org.br/portugues/sobre\\_dndi.aspx](HTTP://www.dndi.org.br/portugues/sobre_dndi.aspx).

Duszenko M, Ginger ML, Brennan A, Gualdrón-López M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, de Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano OS, Stoka V, Turk B, Michels PA. Autophagy in protists. Autophagy. 2011. 7 (2): 127-58.

Dutta A, Bandyopadhyay S, Mandal C, Chatterjee M. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. J Med Microbiol. 2007. 56 (Pt 5), 629-636.

El-On J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. Isr Med Assoc J. 2009. 11 (10), 623-628.

Fernandes MC, Da Silva EM, Pinto AV, De Castro SL, Menna-Barreto RF. A novel triazolic naphthofuranquinone induces autophagy in reservosomes and impairment of mitosis in *Trypanosoma cruzi*. Parasitology. 2012. 139 (1): 26-36.

Firooz A, Khatami A, Dowlati Y. Itraconazole in the treatment of cutaneous leishmaniasis. Int J of Dermatol. 2006. 45(12):1446-1447.

Franco MA, Barbosa AC, Rath S e Dorea JG. Antimony oxidation states in antileishmanial drugs. Am J Trop Med Hyg. 1995. (52) 5:435-7.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007. 14 (7), 1237-1243.

Gasser RA, Magill Jr. AJ, Oster CN, Franke ED, Grogl M e Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1994. (18) 1: 83-90.

Giorgione JR, Turco SJ, Epand RM. Transbilayer inhibition of protein kinase C by the phosphoglycan from *Leishmania donovani*. *Proc of the Nat Acad of sci USA.* 1996. 93:11634-11639.

Goad LJ, Holz GG, Beach DH. Sterols of Leishmania Species - Implications for Biosynthesis. *Mol and Biochem Parasitol* 1984 10 (2):161-170.

Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010. 8 (4), 419-433.

Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982. 126 (1); 131-8.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Apoptosis: Programmed Cell Death. *Revista brasileira de cancerologia.* 2007. 53(3): 335-343.

Hanayama Y, Uchida HA, Nakamura Y, Makino H. Losartan/Hydrochlorothiazide Combination Therapy Surpasses High-dose Angiotensin Receptor Blocker in the Reduction of Morning Home Blood Pressure in Patients with Morning Hypertension. *Acta Med Okayama.* 2012. 66 (6): 449-59.

Harms G, Feldmeier H. The impact of HIV infection on tropical diseases. *Infect Dis Clin North Am.* 2005. Mar; 19 (1):121-35, ix.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000. 407 (6805): 770-776.

Hepburn NC, Nolan J, Fenn L, Herd RM, Neilson JMM, Sutherland GR, Fox KAA. Cardiac effects of sodium stibogluconate: myocardial, electrophysiological and biochemical studies. QJM. 1994. 87 (8): 465-72.

Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Bachmann P, Karbwang J, Fischer C, Voss A, Berman J. Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. N Engl J Med. 1999. 341 (24), 1795-1800.

Kautz-Neu K, Noordegraaf M, Dinges S, Bennett CL, John D, Clausen BE, von Stebut E. Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. J Exp Med. 2011. 208 (5): 885-91.

Kemper C, Atkinson JP. T-cell regulation: with complements from innate immunity. Nat Rev Immunol. 2007; 7 (1): 9-18.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972. 26 (4): 239-257.

Laurenti MD, Orn A, Sinhorini IL, Corbett CEP. The role of complement in the early phase of *Leishmania (leishmania) amazonensis* infection in BALB/c mice. Braz J of Med and Biol Res. 2004. 37:427-434.

Leon LL, Machado GMC, Paes LEC, Grimaldi Junior G. Antigenic differences of *Leishmania amazonensis* isolates causing diffuse cutaneous leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990. 84: 678-680.

Léonard A, Gerber GB. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. Mutat Res. 1996. 366 (1):1-8.

Liendo A, Visbal G, Piras MM, Piras R, Urbina JA. Sterol composition and biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes. Molecular and Biochemical Parasitology. 1999. 104 (1): 81-91.

Lindoso JAL & Lindoso AABP. Neglected tropical diseases in Brazil. Rev Inst Med Trop. São Paulo. 2009. 51: 247-53.

Lira R, Sundar S, Makharia 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 antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. J Infect Dis. 1999. 180 (2): 564-7.

Maia-Elkhoury ANS, Alves WA, Sousa-Gomes ML, Sena JM, Luna EA. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. Cad Saúde Pública. 2008. 24 (12): 2941-7.

Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. J Biomed Biotechnol. 2010. 617521.

McConville MJ, Turco SJ, Ferguson MAJ, Sacks DL. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. The EMBO Journal. 1992. 11: 3593-3600.

Mendez SRT, Hinchman M, Huang L, Green P, Cynamon MH e Welch JT. The antituberculosis drug pyrazinamide affects the course of cutaneous leishmaniasis in vivo and increases activation of macrophages and dendritic cells. Antimicrob Agents Chemother. 2009. (53)12: 5114-21.

Menna-Barreto RFS, Goncalves RLS, Costa EM, Silva RSF, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic Biol Med. 2009. 47 (5), 644-653.

Ministério da Saúde. Atlas de Leishmaniose Tegumentar americana. Diagnóstico Clínico e Diferencial. 2006a. 1 (1), 1-136.

Ministério da Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 8ª Ed. 2010, 1-444.

Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2<sup>a</sup> ed. Atualizada. 2007 1-180.

Ministério da Saúde. Manual e controle da leishmaniose visceral. 1<sup>a</sup>ed., 2006b.

Ministério da Saúde. Programa Nacional de Vigilância e Controle das Leishmanioses. 2008.

Moore KJ, Labrecque S, Matlashewski G. Alteration of *Leishmania donovani* infection levels by selective impairment of macrophage signal transduction. J Immunol. 1993. 150: 4457- 4465.

Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. Biochem Biophys Res Commun. 2000. 275 (3): 715-9.

Médicos sem fronteiras, 2001. Médicos sem fronteiras. Desequilíbrio Fatal. A crise de pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas. Campanha de acesso a medicamentos essenciais e grupo de trabalho de drogas para doenças negligenciadas. pp. 1-30. WWW:< URL: <http://msf.org.br>.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005. 366 (9496): 1561-77.

Myznikov LV, Hrabalek A, Koldobskii GI. Drugs in the tetrazole series. 2007. Chem of heterocyclic compounds. 43 (1).

Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. Cell. 1994. 23;78 (6): 915-8.

National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NAID. 2004.

Neal RA. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. Ann Trop Med Parasitol. 1968. (62) 1: 54-62.

Neuber H. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges. 2008. (6) 9: 754-65.

Neves DP. Parasitologia Humana. 2005.11<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu.

Olivier M, Brownsey RW, Reiner NE. Defective stimulus-response coupling in human monocytes infected with *Leishmania donovani* is associated with altered activation and translocation of protein kinase C. Proc Nat Acad Sci USA. 1992. 89: 7481-7485.

Peters N, Sacks D. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. Immunol Rev. 2006. 213:159-79.

Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Med J. 2006. 82 (972), 649-657.

Ramos H, Saint-Pierre-Chazalet M, Bolard J, Cohen BE. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother. 1994. 38 (5):1079-84.

Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PA. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents and Chemother. 2007. 51(4):1425-1430.

Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B e Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. Lancet Infect Dis. 2007. (7) 9: 581-96.

Rey L. Parasitologia. 2008.4<sup>a</sup> ed. Guanabara Koogan.

Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. Mol Bioch Parasitol.2003.126 (2): 129-142.

Romagnoli R, Baraldi PG, Salvador MK, Preti D, Tabrizi MA, Brancale A, Fu XH, Li J, Zhang SZ, Hamel E, Bortolozzi R, Basso G, Viola G. Synthesis and Evaluation of 1,5-Disubstituted Tetrazoles as Rigid Analogues of Combretastatin A-4 with Potent Antiproliferative and Antitumor Activity. J Med Chem. 2012. 55 (1):475-88.



Rotureau B. Are New World leishmaniasis becoming anthroponoses? Med Hypotheses. 2006. 67:1235-41.

Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. Mol Pharmacol. 2008. 74 (5), 1292-1307.

Russell DG & Talamas-Rohana P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. Immunol Today. 1989. 10:328-33.

Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp Parasitol. 1989. 69: 100- 103.

Sacks D & Sher A. Evasion of innate immunity by parasitic protozoa. Nat Immunol. 2002. 3:1041-47.

Sampaio RN, Marsden PD. Treatment of the mucosal form of leishmaniasis without response to glucantime, with liposomal amphotericin B. Rev Soc Bras Med Trop. 1997. 30 (2): 125-8.

Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR e Castro HC. Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. Parasitol Res. 2008. (103) 1: 1-10.

Sen N, Banerjee B, Das BB, Ganguly A, Sen T, Pramanik S, Mukhopadhyay S, Majumder HK. Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. Cell Death Differ. 2007. 14 (2), 358-367.

Sindermann H, Engel J. Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2006. 100 Suppl 1:S17-20.

Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Inf Chemother*. 2004. 10 (6), 307-315.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest*. 2008. 118 (4), 1301-1310.

Sundar S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001. 6 (11): 849-54.

Sundar S e Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008. (17) 5: 787-94.

Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PCK, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*. 2000. 31(4):1104-7.

Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey P M, Berman JD, Murray HW e Singh VP. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg*. 1998. (59)1: 139-43.

TDR (Programa especial de investigação e capacitação no domínio das doenças tropicais). 2010; [www.who.int/tdr/](http://www.who.int/tdr/).

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008. 9 (3): 231-241

Thakur, CP, Kumar M, Pandey, AK. Comparison of regimens of treatment of antimony-resistant kala-azar patients: a randomized study. *Am.J. Trop. Med. Hyg*. 1991. 45:435-441.

Thiakaki M, Kolli B, Chang KP, Soteriadou K. Down-regulation of gp63 level in *Leishmania amazonensis* promastigotes reduces their infectivity in BALB/c mice. *Microbes Infect.* 2006. 8: 1455-63.

Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Siqueira AM, Nicodemo AC, Neto VA. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol.* 2008. 47(2): 109-124.

Turco SJ, Späth GF, Beverley SM. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trend Parasitol.* 2001. 17 (5): 223-6.

Upadhyaya RS, Jain S, Sinha N, Kishore N, Chandra R, Arora SK. Synthesis of novel substituted tetrazoles having antifungal activity. *Eur J Med Chem.* 2004. 39 (7): 579-92.

van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 2004. 173 (11), 6521-6525.

Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Bol Soc Brasil Dermat.* 1912. 1, 36-38.

Von Stebut E, Belkaid Y, Jakob T, Sacks DL, Udey MC. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-*Leishmania* immunity. *J Exp Med.* 1998.; 188(8):1547-52.

Walters LL, Modi GB, Chaplin GL, Tesh RB. Ultrastructural development of *Leishmania chagasi* in its vector, *Lutzomia longipalpis*. *Am J Trop Med. Hyg.* 1989. 41:295-317.

White JML, Salisbury JR, Jones J, Higgins EM, Vega-Lopez F. Cutaneous leishmaniasis: Three children with *Leishmania major* successfully treated with itraconazole. *Pediatric Dermatology.* 2006. 23(1):78-80.

WHO. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. 2012.

WHO. Division of Control of Tropical Diseases.  
<http://apps.who.int/tdr/publications/tdr-image-library?idNumber=00061046>.

WHO. Meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniasis. WHO technical reports series 949. Geneva, March 2010.

WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first report on neglected tropical disease. Crompton, D.W.T ed., Geneva, 2010.

Wilson ME, Hardin KK, Donelson JE. Expression of the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani chagasi* in virulent and attenuated promastigotes. J Immunol. 1989. 143: 678-84.

Wright SD, Siverstein SC. Receptors for C3b and C3bi promote phagocytosis but not the release of toxic oxygen from human phagocytes. J Exp Med 1983. 158: 2016-23.

Wyllie S, Cunningham ML e Fairlamb AH. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J Biol Chem. 2004. (279) 38: 39925-32.

Yamey G, Torreele E. The world's most neglected diseases. Bmj. 2002. 325 (7357), 176-177.

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L. How protozoan parasites evade the immune response. Trends in Parasitol. 2002. 18:272-278.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. News Physiol Sci. 2004.19: 124-28.