

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Imunologia e DIP / Genética e Biotecnologia

Daniela Trivelato da Silveira de Paula

**ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DE IMIDAZOLIDINAS E
HEXAHIDROPIRIMIDINAS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*
ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Juiz de Fora

2012

Daniela Trivelato da Silveira de Paula

**ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DE IMIDAZOLIDINAS E
HEXAHIDROPIRIMIDINAS EM ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*
ASSOCIADAS À LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia e Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra.

Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva.

Juiz de Fora

2012

Dedico este trabalho à Deus, à minha filha Alice, pela paciência, ao meu marido Henrique, pelo apoio e incentivo à pesquisa e aos meus pais, Luiz Fernando e Teresinha, que me ensinaram a lutar e a superar momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força para enfrentar momentos difíceis e por esta conquista.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Teresinha, pela educação que tive e por sempre me ensinar a vencer as dificuldades e a lutar pelos meus objetivos.

À minha filha Alice, pela paciência e espero que um dia compreenda as minhas ausências, mas que saiba que é a pessoa mais importante na minha vida.

Ao meu marido Henrique, por me apoiar e contribuir para que esse momento se tornasse possível.

Ao meu irmão Daniel, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões.

À minha orientadora, prof^a. Elaine Soares Coimbra, pela confiança, amizade e aprendizado propiciado.

Ao meu co-orientador prof. Adilson David da Silva, que sempre esteve presente ao longo deste trabalho, pelo interesse e dedicação.

A todos os professores do Laboratório de Parasitologia pela convivência e incentivo no decorrer deste trabalho.

A todos os alunos do Núcleo de Pesquisas Químicas (NUPEQ), especialmente ao Gustavo que sintetizou os compostos testados neste trabalho.

À todos os professores e alunos do Laboratório de Imunologia, especialmente à Sandra e a Flávia, sempre prontas a ajudar.

Aos alunos e professores do Laboratório de Microbiologia pela parceria cotidiana.

À Cristina e Ivone pela convivência e pelo suporte no dia a dia do laboratório.

Às colegas do Laboratório de Parasitologia, Mariana, Ayla, Luciana, Roberta, Lidiane e Patrícia pelo companheirismo.

À Lidiane e Patrícia pela amizade que construímos.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas. São consideradas doenças tropicais negligenciadas e encontram-se presentes atualmente em 98 países, afetando 12 milhões de pessoas, com 2 milhões de novos casos por ano. O tratamento baseia-se principalmente na administração de antimoniais pentavalentes, que apresentam diversos problemas, incluindo alta toxicidade, efeitos adversos e o aparecimento de cepas resistentes. Diante deste fato é indiscutível a necessidade de novas drogas para a quimioterapia destas doenças. Neste sentido, o objetivo do trabalho consistiu na avaliação da atividade de compostos análogos de imidazolidinas e hexahidropirimidinas em diferentes espécies de *Leishmania* relacionadas à manifestações cutâneas. Foram testados 18 compostos, sendo nove análogos de imidazolidinas e nove de hexahidropirimidinas. Inicialmente os testes foram realizados em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* e em macrófagos peritoneais de camundongos. A viabilidade destas células foi mensurada pelo método colorimétrico do MTT. Posteriormente, compostos com baixa toxicidade para macrófagos e efetiva atividade antipromastigota foram selecionados para os testes em amastigotas, cuja metodologia foi baseada na coloração por giemsa e contagem dos parasitos intracelulares. Nenhum dos compostos testados apresentou atividade citotóxica significativa para macrófagos. Dentre os análogos de imidazolidinas, cinco apresentaram atividade efetiva em formas promastigotas de *Leishmania*, com CI_{50} variando de 6,18 a 34,93 μ M. Os compostos 2 e 3 foram os que apresentaram maior atividade antipromastigota e anti-amastigota em *Leishmania*, sendo o composto 2, que possui uma diamina, o mais ativo. Para os análogos de hexahidropirimidinas, promastigotas de *L. major* foram os únicos sensíveis com CI_{50} variando de 13,63 a 33,50 μ M. Somente o composto 14 se mostrou ativo em formas intracelulares do parasito. Verificou-se nos compostos testados uma relação estrutura-atividade, bem como diferenças de sensibilidades entre as espécies de *Leishmania* e entre as formas promastigotas e amastigotas. Os análogos de imidazolidinas apresentaram CI_{50} das formas promastigotas e amastigotas próximos, sugerindo que o mecanismo de ação não depende da imunomodulação da célula hospedeira. Em relação às hexahidropirimidinas, o composto 14 não aumentou os níveis da produção do NO, indicando que o mecanismo de ação não ocorre via modulação de NO. De modo geral, o estudo mostrou que os compostos analisados possuem significativo potencial leishmanicida, embora mais pesquisas sejam necessárias, no sentido de se identificar o mecanismo de ação dos mesmos.

Palavras-chave: *Leishmania*; atividade leishmanicida; imidazolidinas; hexahidropirimidinas; quimioterapia; óxido nítrico.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, presenting a broad spectrum of clinical manifestations. Nowadays it is present in 98 countries, affecting 12 million people, with 2 million new cases per year. The current treatment is based mainly on administration of pentavalent antimonials which have several problems, including high toxicity, adverse effects and the emergence of resistant strains. Given this fact, there is a clear need for development of new drugs for chemotherapy of these diseases. In this sense, the aims of this study were to assess the activity of imidazolidine and hexahydropyrimidine analogues compounds in different species of *Leishmania* which are related to cutaneous manifestations. Eighteen compounds were tested, nine imidazolidine analogues and nine hexahydropyrimidine analogues. Initially the tests were performed on promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. major* and murine peritoneal macrophages. The viability of these cells was measured by the MTT colorimetric method. Subsequently, compounds with low toxicity for macrophages and effective antipromastigote activity were selected for the tests in amastigote forms, which methodology was based on Giemsa staining and counting of intracellular parasites. None of compounds showed significant cytotoxic activity for macrophages. Among the imidazolidine analogues, five showed effective activity in promastigotes of *Leishmania*, with IC_{50} ranging from 6.18 to 34.93 μ M. The compounds 2 and 3 presented the highest activity for antipromastigote and anti-amastigote assays, and the compound 2, with a diamine, was the most active. For hexahydropyrimidine analogues, only promastigotes of *L. major* were sensitive of the compounds, with IC_{50} ranging from 13.63 to 33.50 μ M. Only the compound 14 showed activity on intracellular forms of the parasite. It was observed in the compounds tested a structure-activity relationship as well as differences in sensitivity between *Leishmania* species and promastigotes and amastigotes forms. The imidazolidine analogues showed a close IC_{50} for promastigote and amastigote forms, suggesting that their action mechanism does not depend on immunomodulation of the host cell. Regarding hexahydropyrimidine analogues, the compound 14 did not increase NO production, indicating that the action mechanism was unlikely to be due to NO modulation. In general, this study showed that the compounds studied have potential leishmanicidal activity, although more research are necessary, in order to identify the mechanism of action of these compounds.

Keywords: *Leishmania*; leishmanicidal activity; imidazolidine; hexahydropyrimidine; chemotherapy; nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da leishmaniose cutânea (a) e leishmaniose visceral (b) no “Velho Mundo” e no “Novo Mundo”.....	13
Figura 2: Taxonomia da <i>Leishmania</i>	14
Figura 3: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	16
Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa das formas de <i>Leishmania</i> . Em (a) promastigota de <i>L. braziliensis</i> ; (b) macrófago infectado com a forma amastigota de <i>L. braziliensis</i> (10:1) e (c) macrófago infectado com a forma amastigota de <i>L. major</i> (10:1). Aumento de 1000 X.....	17
Figura 5: Casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil de 1980 a 2005.....	21
Figura 6: Estrutura química das principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses.....	26
Figura 7: Alguns compostos heterocíclicos com propriedades antiparasitárias.....	32
Figura 8: Estrutura química da Imidazolidina (a), Hexahidropirimidina (b).....	33
Figura 9: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após tratamento com os precursores, análogos das imidazolidinas e Anfotericina B.....	46
Figura 10: Porcentagem da carga global de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com os compostos 2, 3, 4, 5 e 9.....	47
Figura 11: Número de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> por macrófago infectado no controle e tratado com os compostos 2, 3, 4, 5 e 9.....	50
Figura 12: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> no controle e tratado com os compostos 2, 3, 4, 5 e 9.....	51
Figura 13: Fotomicrografia ilustrativa da atividade leishmanicida após 72 horas de tratamento com os compostos. (a) controle <i>L. amazonensis</i> , (b) composto 2 ; (c) composto 3; (d) composto 4; (e) composto 5 e (f) composto 9. Aumento de 1000 X.....	52
Figura 14: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após tratamento com os análogos das hexahidropirimidinas.....	56
Figura 15: Porcentagem da carga global de amastigotas de <i>L. major</i> tratados com os compostos 10, 11, 12, 13 e 14.....	57
Figura 16: Número de amastigotas de <i>L. major</i> por macrófago infectado no controle e	

tratado com os compostos 10, 11, 12, 13 e 14.	58
Figura 17: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de <i>L. major</i> no controle e tratado com os compostos 10, 11, 12, 13 e 14.	60
Figura 18: Avaliação dos níveis de NO em macrófagos infectados por <i>L. major</i> e tratado com o composto 14 nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μ M.	61
Figura 19: Fotomicrografia ilustrativa da atividade leishmanicida após 72 horas de tratamento com os compostos. (a) macrófago infectado com <i>L. major</i> (controle) e (b) macrófago infectado com <i>L. major</i> tratado com o composto 14 na concentração de 100 μ M após 72 horas.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies de <i>Leishmania</i> relacionadas à leishmaniose cutânea que afetam o homem no Velho Mundo e no Novo Mundo e correlação com as manifestações clínicas da doença.....	23
Tabela 2: Estruturas químicas dos precursores e análogos das imidazolidinas.....	36
Tabela 3: Estrutura química dos análogos de hexahidropirimidinas.....	37
Tabela 4: Efeito dos análogos de imidazolidinas e seus precursores sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> e <i>L. braziliensis</i>	45
Tabela 5: CI_{50} dos compostos 2, 3, 4, 5 e 9 em formas intracelulares de <i>L</i>	49
Tabela 6: Efeito dos análogos de hexahidropirimidinas em promastigotas de <i>L</i>	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LV	Leishmaniose Visceral
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LC	Leishmaniose Cutânea
NO	Óxido Nítrico
ROS	Espécies reativas do oxigênio
CI ₅₀	Concentração molar que inibe 50% do crescimento celular
GTP	Guanosina trifosfato
IFN- γ	Interferon gama
SBF	Soro Fetal Bovino
PBS	Salina Tampão Fosfato
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5 difenil tetrazólico
DMSO	Dimetilsulfóxido
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva
BHI	Infusão de coração e cérebro (“Brain Heart Infusion”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Leishmanioses e <i>Leishmania</i>	12
1.2 Leishmaniose cutânea (LC)	19
1.3 Tratamento das leishmanioses	25
1.4 Imidazolidinas e hexahidropirimidinas	30
2 OBJETIVOS	34
2.1- Objetivo Geral	34
2.2- Objetivos Específicos	34
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Compostos Sintéticos	35
3.2 Cultivo dos parasitos	38
3.3 Manutenção da infecção de <i>L. amazonensis</i> , <i>L. major</i> e <i>L. braziliensis</i> em camundongos BALB/c	38
3.4 Avaliação da citotoxicidade em formas promastigotas de <i>Leishmania</i>	39
3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c	39
3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares	40
3.7 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	41
3.8 Análise Estatística	42
4 RESULTADOS	43
4.1- Compostos sintéticos análogos de imidazolidinas e seus precursores	43
4.2- Compostos sintéticos análogos de hexahidropirimidinas	54
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	71
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

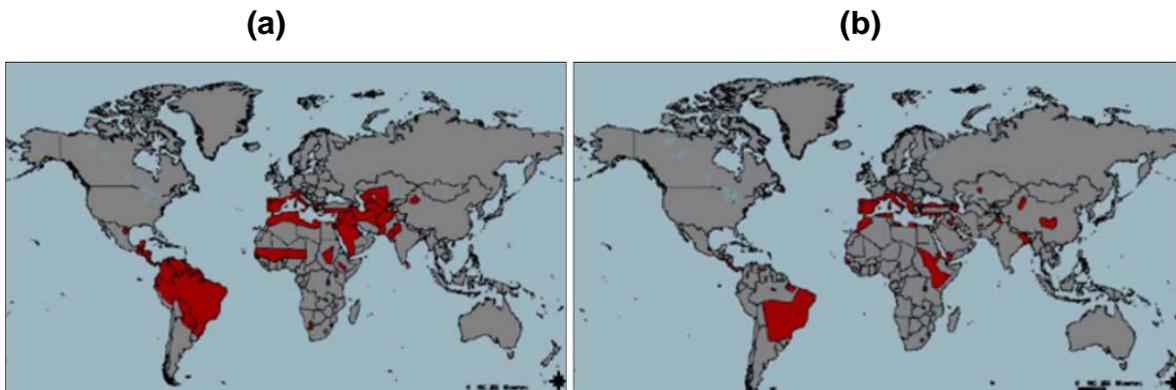
1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses e *Leishmania*

As leishmanioses são antropozoonoses que apresentam altos níveis de morbidade e mortalidade causadas pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*. Estas doenças estão incluídas entre aquelas denominadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) de “Doenças Tropicais Negligenciadas” (WHO, 2010; LINDOSO et al. 2009). Estas estão concentradas em países com menores índices de desenvolvimento humano, intimamente relacionadas com a pobreza, falta de investimento de novas drogas e vacinas e também pela pouca eficácia dos programas de controle. As leishmanioses afetam aproximadamente 12 milhões de pessoas no mundo e está presente em 98 países, principalmente em áreas tropicais e subtropicais (WHO, 2010). A incidência anual é de 2 milhões de novos casos e 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, revelando a importância desta doença negligenciada (SANTOS et al. 2008; WHO, 2010).

Existem cerca de 20 espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem, as quais a grande maioria apresenta dermatotropismo e, poucas, viscerotropismo (CRUZ et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2011). Assim, dependendo de complexas interações parasito-hospedeiro, as manifestações clínicas podem ser divididas em: leishmaniose cutânea (LC), e a leishmaniose visceral (LV) (MISHRA et al. 2009), com distribuição no Novo e Velho Mundo (Figura 1).

Figura 1: Distribuição da leishmaniose cutânea **(a)** e leishmaniose visceral **(b)** no “Velho Mundo” e no “Novo Mundo”.

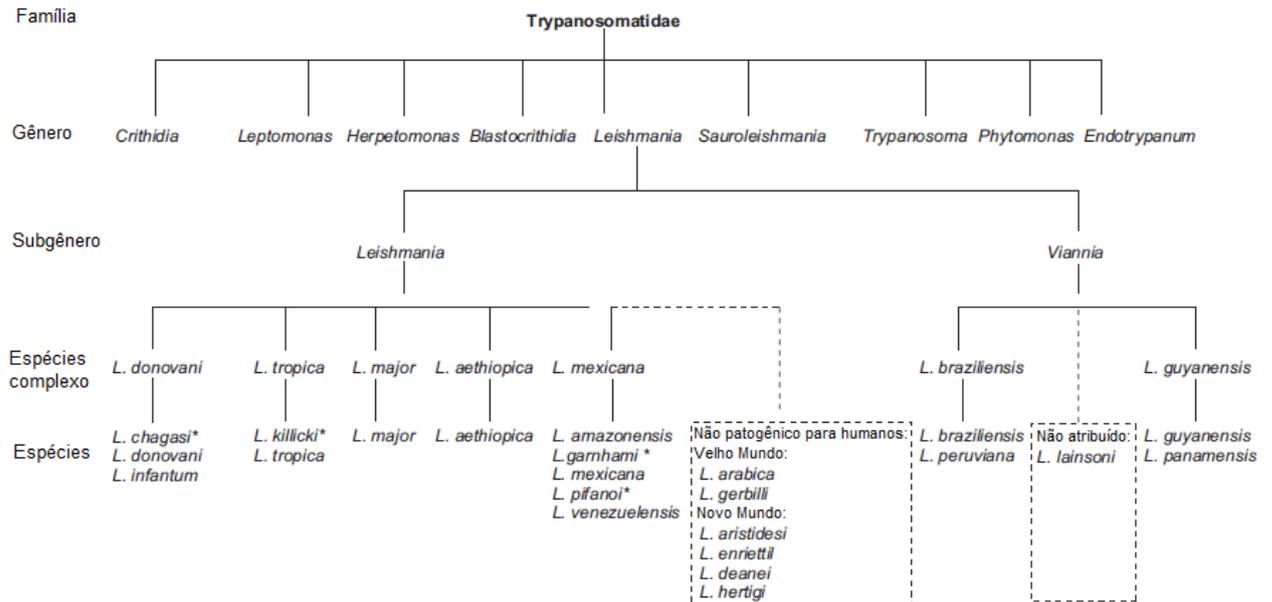


Fonte: SANTOS et al. 2008.

Segundo CROFT et al. 2006, as leishmanioses têm distribuição mundial com foco de infecção na América Central, América do Sul, sul da Europa, norte e leste da África, Oriente Médio e subcontinente da Índia. Em termos de distribuição, 90% de todos os casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão; 90% de todos os casos da LMC ocorrem na Bolívia, Brasil e Peru; e 90% de todos os casos da LC ocorrem no Afeganistão, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria.

As leishmanioses são causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, as quais pertencem à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, e subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* (Figura 2). A divisão dos subgêneros foi baseada no desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do inseto vetor: 1) subgênero *Viannia*, para espécies que incluem uma fase no intestino posterior, com distribuição geográfica limitada ao Novo Mundo e relacionada às formas tegumentares da doença (LAINSON & SHAW 1987); 2) subgênero *Leishmania*, para aquelas espécies que se desenvolvem no intestino anterior, encontrada também no Novo Mundo e abrangendo todas as espécies do Velho Mundo (SAF'JANOVA, 1982). Neste subgênero, as espécies do complexo *L. donovani* estão associadas à forma visceral.

Figura 2: Taxonomia da *Leishmania*.



Fonte: Adaptado WHO, 2010.

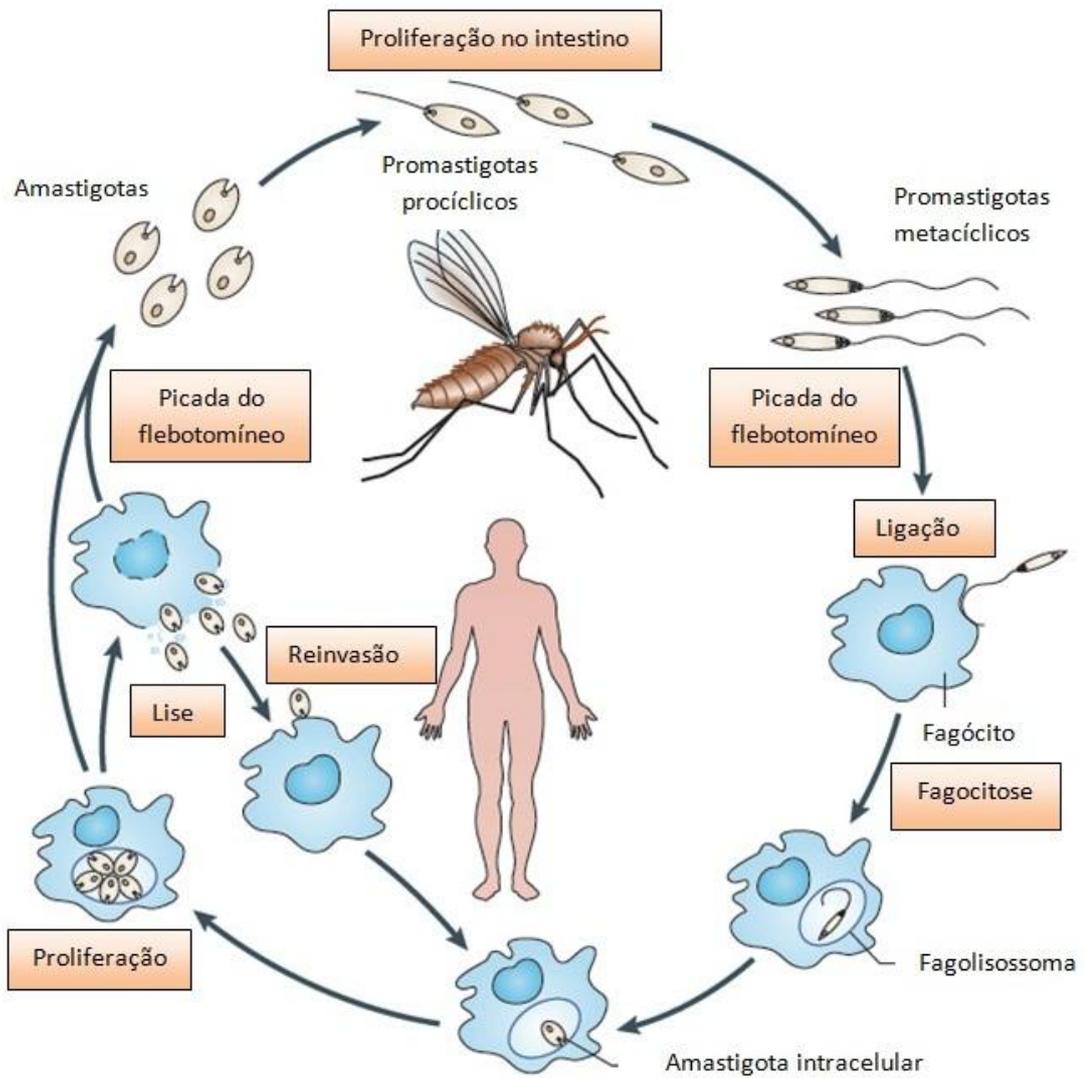
*Status de espécies está em discussão. *L. chagasi* no "Novo Mundo" é a mesma espécie que *L. infantum*.

Independente da espécie de *Leishmania* envolvida, a transmissão das leishmanioses ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea de um inseto vetor que mede de 2 a 3 mm, denominados flebotomíneos (Ordem *Díptera*; Família *Psychodidae*; Sub-Família *Phlebotominae*). Dois gêneros de flebotomíneos transmitem *Leishmania* para humanos: *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomous* no Velho Mundo (SHUKLA et al. 2010). As condições do inseto vetor são mais favoráveis em países do Terceiro Mundo devido às péssimas condições sanitárias e de moradia. Em muitas áreas endêmicas, os cães são considerados como principal reservatório da LV em humanos, enquanto que em outras regiões, os indivíduos são os principais reservatórios para futuras infecções em humanos. Cães parecem resistentes naturalmente para o parasito e podem permanecer assintomáticos apesar da infecção (SHUKLA et al. 2010). Entretanto, os principais hospedeiros vertebrados incluem humanos, ratos, cães, lobos e raposas (NEUBER, 2008).

O ciclo de vida do parasito *Leishmania* (Figura 3) envolve duas formas principais, promastigota e amastigota (Figura 4). No inseto, os parasitos de

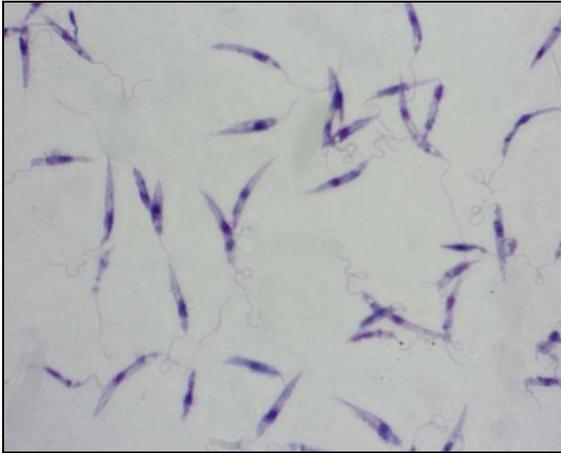
Leishmania estão na forma promastigota, no qual, são longos, flagelados e extracelular. As formas amastigotas são esféricas, intracelulares, sem flagelo aparente e encontra-se nos hospedeiros vertebrados (SANTOS et al. 2008). Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor inocula as formas promastigotas no hospedeiro mamífero, as quais são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas na derme. Após a captação e internalização no fagossomo, ocorre a fusão com lisossomos e os parasitos sobrevivem no fagolisossomo. Durante este processo, os promastigotas se transformam rapidamente em amastigotas em 12 a 24 horas e continuam a crescer e se multiplicar dentro do compartimento fagolisossomal, sendo posteriormente liberados para a circulação sistêmica. Subseqüentemente, dependendo da espécie de *Leishmania*, as amastigotas podem se restringir à derme ou visceralizar, infectando outros tecidos e causando a manifestação clínica correspondente à doença. Quando flebotomíneos picam um hospedeiro infectado, ingerem formas amastigotas. No intestino do inseto vetor, esses parasitos se diferenciam na forma promastigota flagelada. Esses passam por um processo chamado de metaciclogênese no qual, as formas procíclicas não infectivas e que se multiplicam adquirem capacidade de virulência e se transformam na forma metacíclica, infectiva e que não se divide. Esses promastigotas metacíclicos migram para a probócida do flebotomíneo e no próximo repasto sanguíneo continuam a transmissão (SHUKLA et al. 2010; ASSCHE et al. 2011). Entretanto, o estabelecimento da doença depende do sucesso do parasito em se diferenciar na forma amastigota (SANTOS et al. 2008).

Figura 3: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*.

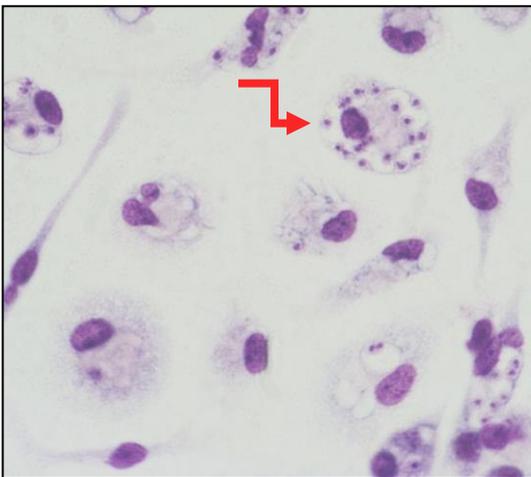


Fonte: Adaptado por KAYE et al. 2011.

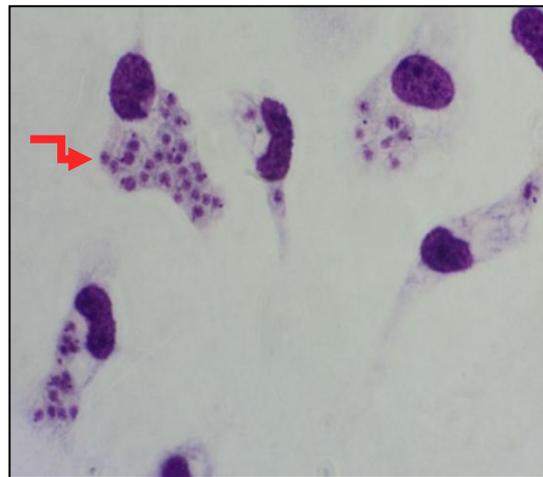
Figura 4: Fotomicrografia ilustrativa das formas de *Leishmania*. Em **(a)** promastigota de *L. braziliensis*; **(b)** macrófago infectado com a forma amastigota de *L. braziliensis* (10:1) e **(c)** macrófago infectado com a forma amastigota de *L. major* (10:1). Aumento de 1000 X.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Do autor.

Segundo ROSENZWEIG et al. (2008), numerosos estudos sobre diferenciação da *Leishmania* têm concentrado na comparação da expressão de gene e proteínas das formas promastigotas e amastigotas. Estes estudos têm mostrado que promastigotas e amastigotas são amplamente adaptados em seus respectivos

ambientes. Em amastigota, a respiração, catabolismo de substratos energéticos e síntese de macromoléculas são realizados em pH ácido, enquanto promastigotas realizam estas atividades em pH neutro. Vias metabólicas tais como glicólise são mais ativas em promastigotas, enquanto oxidação de ácidos graxos é mais ativo em amastigotas. A gliconeogênese é essencial para a virulência dos amastigotas e sua proliferação dentro dos macrófagos, mas promastigotas podem sobreviver sem esta via.

Estudos da diferenciação da *L. donovani* mostraram que este processo envolve alterações morfológicas com discreta expressão de gene e proteínas em paralelo. Estes estudos mostraram que a diferenciação é dividida em 4 estágios:

- 1) 0 – 4 h quando promastigotas recebem e processam o sinal de diferenciação;
- 2) 5 – 9 h quando os promastigotas cessam o movimento e agregam;
- 3) 10 – 24 h quando promastigotas alteram morfológicamente dentro das células em amastigotas;
- 4) 25 – 120 h quando se completa a maturação dos amastigotas.

Após o reconhecimento da *Leishmania*, macrófagos são ativados e se tornam células efectoras podendo fagocitar e destruir, ocorrendo vários processos celulares incluindo a produção de enzimas de degradação fagolisossomal (proteases, nucleases, fosfatases, lipases e esterases), geração do “burst” oxidativo e produção de óxido nítrico (NO). A produção de enzimas lisossomais induz um efeito tóxico e acidificação do ambiente. O “burst” oxidativo provocado pela enzima NADPH oxidase é o resultado do aumento no consumo de oxigênio que é um processo típico da fagocitose. Após ativação dos macrófagos, concentrações altas de várias citocinas como IFN- γ e TNF- α aumentam a atividade da NADPH oxidase e subseqüentemente a produção de ROS, tal como radical superóxido (O_2^-). A produção de O_2^- leva a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil (HO), hipoclorito (OCl^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). O aumento dos níveis de NO e dos metabólicos do NO na ativação dos macrófagos são o resultado da ativação do iNOS (óxido nítrico sintase induzível). L-arginina atua como doador de nitrogênio do NO, o qual converte espontaneamente para nitrito e nitrato. A persistência do parasito dentro do macrófago é determinada pelo balanço entre a capacidade da resposta imune para ativar suficientemente os macrófagos infectados com *Leishmania* e a capacidade do parasito de resistir os mecanismos citotóxicos da

ativação dos macrófagos. A produção dessas citocinas, reativos do oxigênio (ROS) e análogos do NO leva a destruição dos microorganismos fagocitados, mas as diversas espécies de *Leishmania* são um dos poucos protozoários que podem sobreviver e mesmo replicar neste ambiente (ASSCHE et al. 2011).

É interessante também ressaltar que infecções por *Leishmania* induzem o aumento da síntese de NO *in vivo* e a síntese de NO induzida por citocinas a partir da L-arginina, constituindo um importante mecanismo na expressão de resistência natural pela *Leishmania* (GENESTRA et al. 2003). O NO é um produto do metabolismo celular normal e é gerado pela enzima NO sintase (NOS). Existem três isoformas da NOS (neuronal ou nNOS/NOS1, iNOS/NOS2 e endotelial ou eNOS/NOS3) o qual a iNOS é responsável pela produção do NO no macrófago. iNOS é uma enzima solúvel que catalisa a oxidação da L-arginina para NO e citrulina (ASSCHE et al. 2011). O NO afeta uma ampla faixa de funções celulares tais como interações célula-célula, citotoxicidade, mecanismos homeostáticos e numerosos outros papéis fisiológicos (GENESTRA, 2005). A produção de uma grande variedade de citocinas imunomodulatórias como IL-12 e IL-1 pelos macrófagos podem ser inibidas pelo NO (WALLACE, 2005). A produção de NO, o iNOS gerado pelo metabólico arginina tem sido mostrado para limitar o crescimento da *Leishmania* dentro de macrófagos infectados e um papel importante na limitação *in vitro* da taxa de infecção (GENESTRA et al. 2006).

Apesar dos macrófagos constituírem as principais células hospedeiras para *Leishmania*, estudos recentes têm confirmado que esses parasitos podem infectar vários tipos de células, tanto *in vitro* como *in vivo*, incluindo células hematopoiéticas e fibroblastos (KAYE et al. 2011).

1.2 Leishmaniose cutânea (LC)

Compreende-se por LC as manifestações clínicas relacionadas à pele e mucosa. Estas incluem a forma cutânea localizada, disseminada, difusa e mucocutânea. A LC tem ampla distribuição mundial, sendo que no Continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Nas Américas a LC é também denominada como leishmaniose tegumentar americana (LTA). Esta doença é provavelmente antiga nas Américas, visto que foram

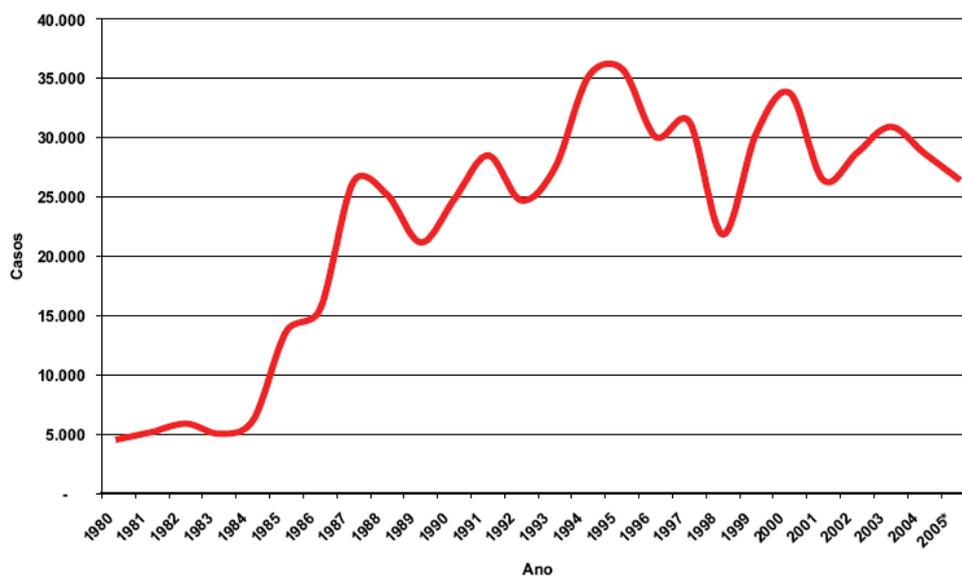
encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C, feitas pelos índios do Peru, demonstrando mutilações, conhecidas hoje como leishmaniose mucocutânea (BASANO & CAMARGO, 2004 apud LAISON & SHAW, 1988). No Brasil, a primeira referência de LTA encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, onde ele relata a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico. O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham em 1895, na Índia, em casos de leishmaniose visceral (BASANO & CAMARGO, 2004). Entretanto, em relação á LTA, existem divergências quanto à observação da moléstia: de acordo com o BASANO & CAMARGO, 2004 (apud LAISON & SHAW, 1988), este feito coube à Cerqueira em 1855, entretanto, no Manual do Ministério da Saúde, 2010, foi Moreira, em 1895, quem identificou pela primeira vez a existência do “botão endêmico dos países quentes”, chamando “Botão da Bahia” ou “Botão de Biskra”. A confirmação das formas de *Leishmania* em úlceras cutâneas e nasobucofaríngeas ocorreram no ano de 1909, quando Lindenberg encontrou o parasito em indivíduos que trabalhavam em áreas de desmatamentos na construção de rodovias no interior de São Paulo. Em 1911, Splendore diagnosticou a forma mucosa da doença e Gaspar Vianna deu ao parasito o nome de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlceras de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”. No ano de 1922, Aragão, pela primeira vez, demonstrou o papel do flebotomíneo na transmissão da leishmaniose tegumentar e em 1958 Forattini encontrou roedores silvestres parasitados em áreas florestais do Estado de São Paulo. Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Nas últimas décadas, as análises epidemiológicas da LTA têm sugerido mudanças no padrão de transmissão da doença inicialmente considerada zoonoses de animais silvestres, que acometia ocasionalmente pessoas em contato com as florestas. Posteriormente, a doença começou a ocorrer em zonas rurais, já praticamente desmatadas, e em regiões periurbanas. No Brasil, a LTA é uma doença com diversidade de agentes, de reservatórios e de vetores que apresenta diferentes padrões de transmissão e um conhecimento ainda limitado sobre alguns aspectos, o que a torna de difícil controle (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Segundo BASANO & CAMARGO (2004), a LTA é uma doença não-contagiosa, de evolução crônica, que acomete as estruturas da pele e cartilaginosa da nasofaringe, de forma localizada ou difusa, causada por várias espécies de protozoários.

No país, a LTA é uma das afecções dermatológicas que merece mais atenção pela ocorrência das deformidades, além do envolvimento psicológico. Possui ampla distribuição com registro de casos em todas as regiões brasileiras. A partir da década de 80, verifica-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Pode-se observar picos de transmissão a cada cinco anos, apresentando tendência de aumento do número de casos, a partir do ano de 1985, quando ocorreu a implantação das ações de vigilância e controle da LTA no país (Figura 5). No período de 1985 a 2005, verificou-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados com níveis mais elevados nos anos de 1994 e 1995.

Figura 5: Casos notificados de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil de 1980 a 2005.



Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010.

A LC inicia-se com uma área de vermelhidão e inchaço no local da picada, aumentando o tamanho, e após 3 a 4 semanas desenvolve uma úlcera plana, indolor e com margens elevadas. Essas úlceras são encontradas em áreas expostas como

mãos, face ou pernas e se não for tratadas as leishmanioses cutâneas do “Velho Mundo” curam após 6 a 12 meses com cicatrizes e desfiguração. Podem ocorrer envolvimento das aurículas, e as lesões podem variar de pequenas a grandes úlceras (NEUBER, 2008). As principais espécies responsáveis por este tipo de leishmaniose no “Velho Mundo” são *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* e no “Novo Mundo” *L. mexicana*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (BAILEY et al. 2007). Algumas manifestações podem estar relacionadas à LC, onde a forma cutânea localizada é a mais prevalente da doença. As lesões são esféricas com úlceras indolores bem delimitadas e a crosta central é algumas vezes hemorrágica. Dependendo da relação parasito-hospedeiro e outros fatores não definidos, alguns casos evoluem para outras formas da doença (GOTO et al. 2010). Na leishmaniose cutânea disseminada, ocorre a presença de múltiplas lesões (10-300) papulares e acneiformes, em 2 ou mais áreas não contíguas do corpo. A espécie envolvida é a *L. (V.) braziliensis* (GOTO et al. 2010). A forma cutâneo-difusa é caracterizada por lesões nodulares não ulceradas. É a manifestação mais rara e grave da doença cutânea e pode persistir indefinidamente. São causadas geralmente por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* no “Novo Mundo” e *L. (L.) aethiopica* no “Velho Mundo” (BAILEY et al. 2007; GOTO et al. 2010).

A leishmaniose cutânea-mucosa (LCM) caracterizada pela habilidade do parasito ter metástase para os tecidos mucosos por disseminação linfática ou hematogênica. Embora a LCM possa ser causada por outras espécies de *Leishmania* esta é mais comumente associada com *L. braziliensis* e, portanto, salvo a algumas exceções, limitada a América do Sul (REITHINGER et al. 2008). Tem sido sugerido, baseado na distribuição geográfica e epidemiológica de algumas espécies de *Leishmania*, que a LCM no Brasil surgiu na região sul do Rio Amazonas, onde *L. braziliensis* é a predominante (GUERRA et al. 2011). Além disto, a grande maioria dos pacientes que possui esta manifestação clínica apresenta histórico de lesão de pele anterior e esquema terapêutico inadequado (GUERRA et al. 2011). A cura espontânea da LCM é raramente observada e o tratamento é muito difícil (REITHINGER et al. 2008).

Tabela 1: Principais espécies de *Leishmania* relacionadas à leishmaniose cutânea que afetam o homem no Velho Mundo e no Novo Mundo e correlação com as manifestações clínicas da doença.

Principais manifestações da doença	Espécies
Velho Mundo Subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> e <i>L. aethiopica</i>
Leishmaniose Cutâneo Difusa	<i>L. aethiopica</i>
Novo Mundo Subgênero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. infantum</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> e <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniose Cutâneo Difusa	<i>L. mexicana</i> e <i>L. amazonensis</i>
Novo Mundo Subgênero <i>Viannia</i>	
Leishmaniose Cutânea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i> e <i>L. peruviana</i>
Leishmaniose Mucocutânea	<i>L. braziliensis</i> e <i>L. panamensis</i>

Fonte: Adaptado KAYE et al. 2011.

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. No entanto, no Brasil já foram identificadas 7 espécies, sendo 6 do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. Neste trabalho, foram utilizadas três espécies de *Leishmania* consideradas, principalmente, como dermatrópicas, sendo uma delas exclusiva de países do Velho Mundo:

L. (L.) amazonensis

Ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também nos estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná). Está presente em outros países como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa (BASANO & CAMARGO, 2004). Causa úlceras cutâneas

localizadas e, ocasionalmente, lesões anérgicas difusas em indivíduos com deficiência imunológica inata, levando ao quadro da leishmaniose cutânea-difusa (Ministério da Saúde 2006, 2010). Além disto, foram descritos casos de LV na Bahia com isolamento deste parasito em células da medula óssea (BARRAL et al., 1986). Seus reservatórios são roedores e marsupiais e a *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lu. olmeca* os principais vetores (GONTIJO e CAMARGO, 2003).

L. (V.) braziliensis

Foi a primeira espécie de *Leishmania* descrita como agente etiológico da LTA. É a mais importante, não só no Brasil, mas em toda a América Latina. Tem ampla distribuição, desde a América Central até o norte da Argentina (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Causa lesões cutâneas e mucosas metastáticas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). É transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos como *Lutzomyia whitmani*, *Lu. wellcomei* e *Lu. intermedia* (GONTIJO e CARVALHO, 2003). Infecções com *L. braziliensis* pode levar a desfiguração para os pacientes. Geralmente inicia-se com inflamação da mucosa e congestão nasal, seguido da ulceração da mucosa nasal e perfuração do septo. Em alguns casos os lábios, bochecha, palato mole, faringe ou laringe estão envolvidos (REITHINGER et al. 2008). Causa no homem a leishmaniose cutânea e mucocutânea (BASANO & CAMARGO, 2004).

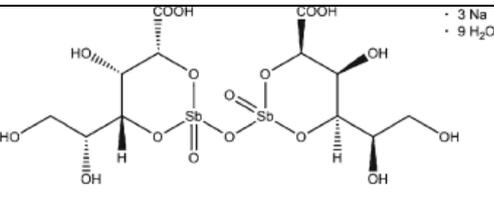
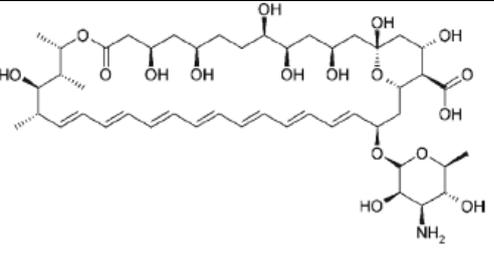
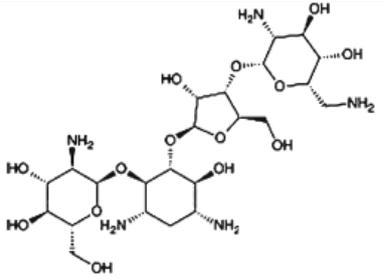
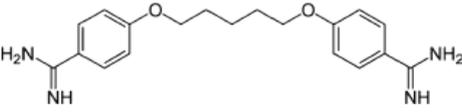
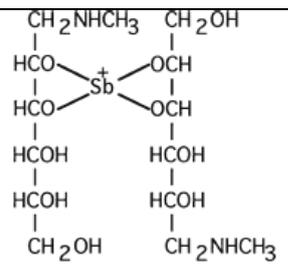
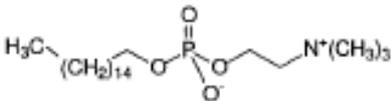
L. (L.) major

Considerada como uma das espécies mais prevalentes em países do “Velho Mundo”, que leva a uma lesão ulcerativa característica de formas cutâneas localizadas (GOTO et al. 2010; AMEEN, 2010). A maioria das lesões causadas por *L. major* cura espontaneamente entre 2 a 4 meses (MURRAY et al. 2005; REITHINGER et al. 2007). É interessante ressaltar que esta espécie foi utilizada como modelo em infecções murinas, a partir da qual foi estabelecida a dicotomia da resposta imunológica das leishmanioses em T *helper* 1 e T *helper* 2, indicando resistência ou suscetibilidade à infecção, respectivamente (ALEXANDER & BRYSON, 2005). Além disto, esta espécie de *Leishmania* foi a primeira a ter o seu genoma totalmente sequenciado (SILVA & SACKS, 1987).

1.3 Tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses, incluindo formas cutâneas, é baseado na utilização de drogas que apresentam graves problemas como alta toxicidade, custo elevado, efeitos adversos, além do aparecimento de resistência (SANTOS et al. 2008). As mesmas drogas são usadas para o tratamento das infecções causadas pelas diferentes espécies de *Leishmania*. Embora a OMS tenha fornecido uma recomendação para o tratamento das leishmanioses, existem abordagens terapêuticas variadas em diferentes países e regiões do mundo, o que sugere complexidade na quimioterapia da doença (GOTO et al. 2010). Segue abaixo (Figura 6) as estruturas químicas das principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses.

Figura 6: Estrutura química das principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses.

Nome		Estrutura
Comercial	Químico	
Pentostam	Stibogluconato de sódio	
Fungizon	Anfotericina B	
Humatin	Sulfato de Paramomicina	
Pentamidina	Isocianato de Pentamidina	
Glucantime	Antimoniato de Meglumina	
Miltefosina	Hexadecilfosfocolina	

Fonte: Adaptado CROFT et al. 2006, SANTOS et al. 2008.

Os antimoniais pentavalentes (Sb) são as drogas de primeira escolha usadas para o tratamento de todas as manifestações clínicas da doença. Esta droga é

disponível em duas diferentes formulações: antimoniato de meglumina (Glucantime) e stibogluconato de sódio (Pentostam). O mecanismo de ação não é conhecido, mas sabe-se que estas drogas inibem enzimas glicolíticas e oxidação de ácidos graxos em amastigotas de *Leishmania*, e há uma inibição dose-dependente da formação da rede de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (SINGH et al. 2004, FREZARD et al. 2009; GOTO et al. 2010). Os principais efeitos colaterais são artralgia e mialgia, anorexia, náuseas, vômitos, febre, fraqueza, tontura, insônia, nervosismo, choque pirogênico e edema, além de cardiotoxicidade ou falência renal, principalmente em pacientes idosos. O uso destas drogas na gravidez é contraindicado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A eficácia dos antimoniais variam de acordo com a região geográfica, espécie de *Leishmania* e apresentação clínica. No “Novo Mundo” a eficácia dos antimoniais para o tratamento da LC tem sido variável. Na Bolívia, falha no tratamento foi observada em 7% dos pacientes, no Brasil em 16% e 39% na Colômbia. No “Velho Mundo”, a ineficiência é de aproximadamente 13% e, na Índia, já apresenta cepas resistentes (GOTO et al. 2010). Durante a última década, resistência aos antimoniais e falha terapêutica provocou epidemia em Bihar na Índia, e atualmente aproximadamente 60% de novos casos de LV nesta área não respondem aos antimoniais. Possuem a vantagem de ter baixo custo, entretanto suas desvantagens incluem administração intramuscular, tratamento prolongado e vários efeitos adversos. Inicialmente, os antimoniais eram administrados na dose de 10 mg/kg por 6 a 10 dias com uma taxa de cura de 90%, entretanto a primeira falha no tratamento ocorreu na Índia duas décadas atrás. A partir disso, doses mais altas e esquemas prolongados (20 mg/kg por 30 dias) foram gradualmente introduzidos e em paralelo aumentou a taxa de resistência aos antimoniais (MALTEZOU, 2010).

Anfotericina B foi descoberta em 1956 como antibiótico e antifúngico, e tem sido usada, como segunda escolha, para tratamento das leishmanioses. Seu mecanismo de ação se baseia em aumentar a permeabilidade da membrana celular, promovendo um influxo de íons para o interior do parasito, tanto promastigotas quanto amastigotas de *Leishmania*, levando à morte celular. Além disso, a anfotericina B atua no ergosterol presente na membrana da *Leishmania* (GOTO et al. 2010). As principais desvantagens do uso da Anfotericina B convencional são as administrações prolongadas e os frequentes efeitos adversos tais como febre e calafrios relatados durante a infusão, nefrotoxicidade e hipocalcemia, no qual necessita ser administrado em hospital (MALTEZOU, 2010). Quatro formulações de

drogas estão disponíveis: anfotericina B deoxicolato, anfotericina B lipossomal, anfotericina B dispersa em colesterol e complexo lipídico de anfotericina B. Todas as formulações apresentam eficácia similar, entretanto diferenças têm sido observadas em relação aos efeitos colaterais dessas formulações, com efeito colateral mais intenso associado com a anfotericina B deoxicolato, o qual pode induzir dano renal (GOTO et al. 2010). Formulações lipídicas de anfotericina B desta droga melhorou muito o perfil de segurança dessa droga. Formulações lipídicas são tomadas seletivamente pelo sistema retículo endotelial e exibe um aumento na atividade antileishmanial. Atualmente formulação lipossomal de anfotericina B é o primeiro tratamento de escolha em países endêmicos do sul da Europa bem como em outros países desenvolvidos, porque sua rápida e até 100% de cura em esquemas de 3 a 5 dias, melhoram a conveniência para os pacientes e a redução dos custos no cuidado à saúde. Entretanto em países pobres mesmo cursos de curta duração de formulação lipossomal são inacessíveis e a seleção de drogas para o tratamento leishmanial torna-se mais uma questão de custo do que eficácia e toxicidade. O uso de nanopartículas e microesferas para a anfotericina B convencional também aumenta sua eficácia contra VL experimental (MALTEZOU, 2010). Anfotericina B lipossomal é considerada menos tóxica do que a forma deoxicolato porque visa especificamente o macrófago. Efeitos colaterais relacionados à infusão como dispnéia e rubor podem ser tratados com hidrocortisona e pode ser evitado com ritmo lento (DAVID & CRAFT, 2009). No Brasil, a formulação lipossomal de anfotericina B é fornecida como tratamento de primeira linha para crianças (até 12 anos) e pacientes com idade superior a 50 anos no estado de São Paulo, entretanto isto não é via de regra nos outros estados brasileiros (TEMPONE et al. 2011).

A pentamidina tem sido usada com sucesso para o tratamento de LC ou LCM em algumas regiões do “Novo Mundo”, por apresentar a mesma eficácia dos antimoniais (GOTO et al. 2010). Os principais efeitos adversos são dor no local da injeção, gosto metálico na boca, dor de cabeça, dispnéia, hipotensão e hipoglicemia (DAVID & CRAFT, 2009). A pentamidina interfere na síntese de DNA da *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana da mitocôndria, matando o parasito (GOTO et al. 2010).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) foi inicialmente desenvolvida contra o câncer e a primeira droga efetiva para tratamento oral da LV (CROFT et al. 2006). As principais preocupações em relação ao uso da miltefosina incluem seu potencial

efeito teratogênico e sua meia-vida longa, o que pode facilitar o aparecimento de resistência. Seu mecanismo de ação ainda não é conhecido, mas parece que se liga à membrana plasmática e é internalizado na célula do parasito. Alguns estudos têm relatado que a miltefosina induz a morte celular em *L. donovani* por apoptose (PARIS et al. 2004). A miltefosina induz efeitos antiinflamatórios e imunológicos sobre macrófagos. Recentemente, estudos têm relatado que a miltefosina aumenta receptores de IFN- γ e a resposta do IFN- γ em macrófagos infectados com *L. donovani*, além de induzir resposta Th1 dependente de IL-12 e inverter resposta Th2 para Th1 (MALTEZOU, 2010). Possui poucos efeitos colaterais como náusea, vômitos e elevação da creatinina (DAVID & CRAFT, 2009). Pesquisas realizadas na América Central e do Sul apontam variações de sensibilidade de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo frente a este composto (SOTO et al. 2004; YARDLEY et al. 2005; MACHADO et al. 2010, TEMPONE et al. 2011).

A paramomicina é um aminoglicosídeo usado para o tratamento de doenças bacterianas, e tem mostrado atividade antiparasitária (SINGH et al. 2004). Além disso, a paramomicina tem sido usada para aplicação local e parenteral no tratamento de leishmaniose tegumentar no “Velho Mundo e ”Novo Mundo” (GOTO et al. 2010). Os efeitos adversos mais frequentes são elevação das transaminases hepáticas, ototoxicidade e dor no local da injeção. A paramomicina inibe a síntese protéica e modifica a fluidicidade e permeabilidade da membrana. Estudos *in vitro* mostraram que 72 horas após exposição da paramomicina, amastigotas e promastigotas de *L. donovani*, reduziram o potencial da mitocôndria, indicando que a mitocôndria é o alvo desta droga (MALTEZOU, 2010). Paramomicina injetável tem sido usada no tratamento de LV. Em combinação com stibogluconato, a paramomicina tem sido usada para várias síndromes de doenças cutâneo-difusas (SINGH et al. 2004).

Outras drogas têm sido usadas para o tratamento das leishmanioses, dentre elas, os azóis como fluconazol, cetoconazol e itraconazol, inicialmente usados em infecções por fungos, têm sido para o tratamento de LC. A azitromicina apresenta atividade contra *L. major in vitro* e *in vivo*, mas seu mecanismo de ação ainda não é conhecido. O alopurinol sozinho, ou em associação com antimoniais têm sido usados no tratamento de leishmanioses no “Novo Mundo” e “Velho Mundo” e seus resultados foram contraditórios. A dapsona tem sido usada no tratamento de leishmanioses com taxa de cura de 82% no “Velho Mundo”. A rifampicina sozinha ou

em combinação com outras drogas tem sido usadas para o tratamento de leishmanioses, mas seus resultados são divergentes (GOTO et al. 2010).

Entretanto, as drogas convencionais estão longe de satisfazer a demanda atual das populações endêmicas devido ao custo, toxicidade e resistência, resultando na urgente necessidade para identificar e desenvolver novas alternativas terapêuticas. A identificação de novos agentes requer o conhecimento da biologia celular e bioquímica do parasito. Os avanços genômicos e proteômicos com ferramentas da bioinformática geram novas informações de interesse biológico. Os protozoários são também de interesse do ponto de vista biológico já que possuem estruturas citoplasmáticas especiais e organelas. Estudos têm revelado que uma única via metabólica existe nessas organelas, abrindo novas possibilidades para a identificação de novos alvos de drogas e novas drogas (FIDALGO et al. 2011).

1.4 Imidazolidinas e hexahidropirimidinas

Os compostos heterocíclicos (Figura 7), incluindo imidazolidinas e hexahidropirimidinas são encontrados na natureza e despertaram o interesse dos químicos na tentativa de melhor explorar sua atividade biológica (RAETHER et al. 2003). Uma diversidade de efeitos biológicos pode ser encontrada em compostos heterocíclicos, os quais incluem atividade antiparasitária (metronidazol), antifúngica (cetoconazol), cardiovascular (clonidina e nafazolina) e anticancerígena (misonidazol) (SHARMA et al. 2001).

Nitrofurazona, um derivado nitrofurano, foi o primeiro composto heterocíclico usado na medicina por suas propriedades antibacterianas. Durante as duas guerras mundiais, foi usado como aplicação tópica para o tratamento de queimaduras e feridas. A descoberta desse efeito estimulou interesse nos compostos nitroheterocíclicos como agentes quimioterápicos (RAETHER et al. 2003).

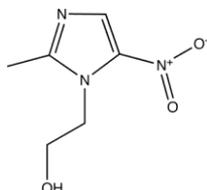
O primeiro nitro-composto natural, isolado em 1953 e sintetizado em 1965, contendo um anel imidazol e estudado farmacologicamente foi a droga antibacteriana azomicina, um 2-nitro-1H-imidazol. O metronidazol também está entre esses compostos. Para o 4- e 5- nitroimidazóis, o período de intenso desenvolvimento foi entre 1970 e 1975, resultando em 2-substituído 1-metil-5-nitroimidazol tais como flunidazol, nitroimidazol e ronidazol. Mais tarde, dentre o 2-

nitroimidazóis os compostos de maior interesse no mercado ou em fase de avaliação clínica foram as drogas antiprotozoárias como benzimidazol e misonidazol, o qual foi o primeiro nitroimidazol submetido a triagem clínica como uma célula radiosensibilizadora hipóxica na terapia do câncer em 1980. Desde a introdução dos 5-nitroimidazóis e carbamatos benzimidazóis como agentes terapêuticos, poucos compostos têm surgido. Todos os agentes nitroheterocíclicos são ativos em uma variedade de protozoários anaeróbios, além de bactérias microaerófilas e anaeróbicas, sendo utilizados para o tratamento de amebíases, trichomoníases, giardíasis e infecções bacterianas anaeróbicas.

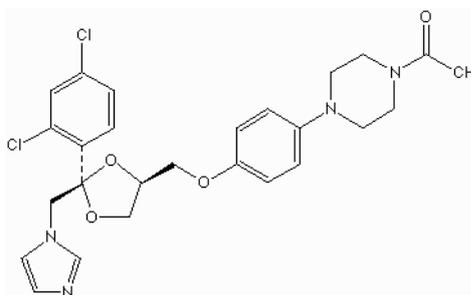
Em relação à atividade em *Leishmania*, agentes antifúngicos azóis (Figura 7) também têm sido usados como agentes antileishmaniais desde 1980, cujo mecanismo de ação tem sido atribuído à inibição da síntese do ergosterol por bloqueio da 14 α -demetilase (SHAKYA et al. 2011). Azóis N-substituídos como cetoconazol, miconazol, fluconazol e itraconazol são drogas bem toleradas que são potencialmente ativas para *Leishmania*, mas seu uso no tratamento em leishmaniose cutânea e visceral tem produzido resultados conflitantes (SHAKYA et al. 2011).

Segundo SOUSA et al. (2011), o fluconazol, o qual é um triazol, tem sido usado para o tratamento da LC causadas por diferentes espécies de *Leishmania* na dosagem de 200 mg por dia com resultados variáveis. O fluconazol impede o crescimento da *Leishmania* na cultura inibindo a citocromo P-450 mediado pela 14- α -demetilação do lanesterol, bloqueando a síntese do ergosterol e causando acúmulo do 14- α -4metil esteróis (SOUSA et al. 2011). Além disto, fluconazol também tem sido usado clinicamente com sucesso em combinação com alopurinol no tratamento da LV (SHAKYA et al. 2010).

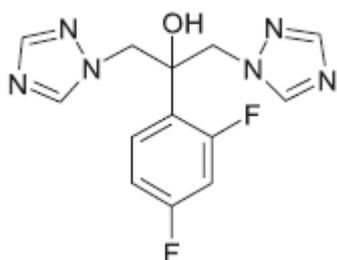
Figura 7: Alguns compostos heterocíclicos com propriedades antiparasitárias.



Metronidazol



Cetoconazol



Fluconazol

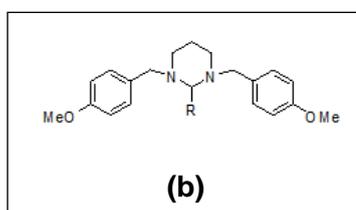
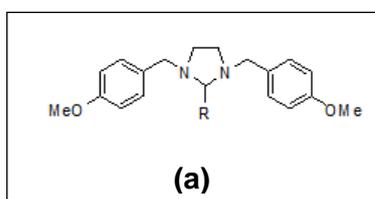
O nitazoxanido é um composto antiparasitário de amplo espectro pertencente à classe dos nitroheterocíclicos chamados de tiazóis, o qual é rapidamente metabolizado em tizoxanido em humanos (NAVARRETE-VAZQUEZ et al. 2011). NAVARRETE-VAZQUEZ et. al. (2011), avaliou a atividade antiprotozoária “in vitro” de 2 benzólogos do nitazoxanido e do tizoxanido, incluindo a atividade em promastigotas de *L. mexicana*. Dentre os dois compostos testados, um foi 10 vezes mais ativo do que a pentamidina.

As imidazolidinas (Figura 8a) (derivados do tetrahydroimidazol) são aminas cíclicas de interesse farmacológico e apresentam atividade biológica com vários grupos substituintes. Por exemplo, N,N'-dihidroxifenilimidazolidinas e N,N'-bis-aminoalquilimidazolidinas possuem atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais, o N,N'-dibenzil-2-arylimidazolidinas possuem atividades bactericida e amebicida (CATERINA et al. 2008). Alguns derivados das imidazolidinas têm sido testados para avaliar sua ação biológica *in vitro* e a relação estrutura/atividade em *Trypanosoma cruzi* (CATERINA et al. 2008). SHARMA e colaboradores já haviam testado em 2001 vários compostos derivados de tetrahydroimidazóis avaliando a

atividade antiinflamatória, analgésica e antibacteriana destes compostos.

Assim, como as imidazolidinas, também as hexahidropirimidinas (Figura 8b) são aminas cíclicas, possuindo um anel de 6 membros diferentemente da imidazolidina que possui um anel de 5 membros. As hexahidropirimidinas têm demonstrado atividades antifúngicas, antibacterianas e antivirais (DE CARVALHO et al. 2010).

Figura 8: Estrutura química da Imidazolidina (a), Hexahidropirimidina (b).



2 OBJETIVOS

2.1- Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica de análogos de imidazolidinas e seus precursores e hexahidropirimidinas em diferentes espécies de *Leishmania* e em macrófagos peritoneais. Além disto, analisar se o efeito leishmanicida de hexahidropirimidinas envolve mecanismo imunomodulatório.

2.2- Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos análogos de imidazolidinas e seus precursores em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos análogos de hexahidropirimidinas em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major*;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos em células de mamíferos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c;
- Avaliar a relação estrutura/atividade dos precursores e análogos de imidazolidinas e hexahidropirimidinas;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos precursores e análogos de imidazolidinas e hexahidropirimidinas que apresentarem baixa citotoxicidade em macrófagos e atividade antipromastigota significativa, em amastigotas intracelulares de *Leishmania* em diferentes concentrações dos compostos;
- Avaliar os níveis de NO em macrófagos infectados com *L. major* e tratados com análogos de hexahidropirimidinas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos Sintéticos

Foram testados compostos sintéticos análogos de imidazolidinas e hexahidropirimidinas. Todas as moléculas foram sintetizadas no Núcleo de Pesquisas Químicas (NUPEQ) pelo Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Nas tabelas 2 e 3 descritas abaixo estão representadas as estruturas químicas dos compostos derivados das imidazolidinas e seus precursores e também dos análogos de hexahidropirimidinas testados neste trabalho.

Tabela 2: Estruturas químicas dos precursores e análogos das imidazolidinas.

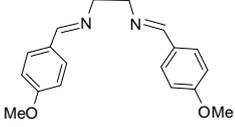
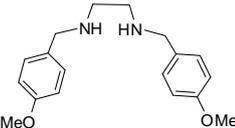
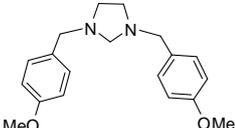
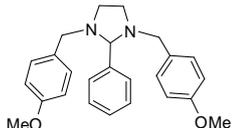
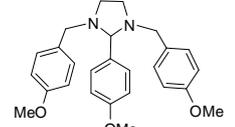
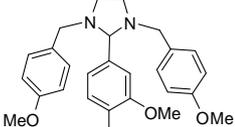
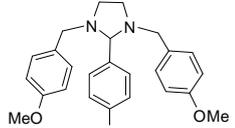
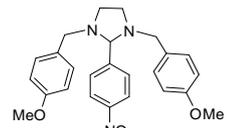
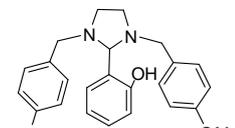
Composto	Estrutura Química	Nome do Composto
1		1,2- <i>N,N'</i> -Bis(4-metoxi-benzilideno)etilenodiamina
2		1,2- <i>N,N'</i> -Bis(4-metoxi-benzil)etilenodiamina
3		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-(4-metoxifenil)-imidazolidina
4		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-(4-hidroxi-5-metoxi-fenil)-imidazolidina
5		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-(4,4-dimetilamino-fenil)-imidazolidina
6		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-fenil-imidazolidina
7		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-(2-hidroxi-fenil)-imidazolidina
8		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-2-(4-nitro-fenil)-imidazolidina
9		1,3-Bis(4-metoxibenzil)-imidazolidina

Tabela 3: Estrutura química dos análogos de hexahidropirimidinas.

Composto	Estrutura Química	Nome do Composto
10		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)hexahidropirimidina
11		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(fenil)hexahidropirimidina
12		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>p'</i> -metoxi-fenil)hexahidropirimidina
13		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>p'</i> -hidroxi-fenil)hexahidropirimidina
14		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>o'</i> -nitro-fenil)hexahidropirimidina
15		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>p'</i> -dimetilamino-fenil)hexahidropirimidina
16		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>p'</i> -nitro-fenil)hexahidropirimidina
17		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>o'</i> -hidroxi-fenil)hexahidropirimidina
18		1,3- <i>N,N'</i> -Bis(<i>p</i> -metoxi-benzil)-2-(<i>m'</i> , <i>m'</i> , <i>p'</i> -trimetoxi-fenil)hexahidropirimidina

3.2 Cultivo dos parasitos

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8) foram cultivadas em meio Warren (Infusão de coração e cérebro - BHI, acrescentado de hemina e ácido fólico). Formas promastigotas de *L. major* (MRHO/SU/59/P) e *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903) foram cultivadas em Meio BHI (Infusão de coração e cérebro, suplementado com L-glutamina). Todas as culturas foram suplementadas com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os parasitos foram cultivados a 24 °C. SFB foi adquirido da Cultilab (Campinas, São Paulo, Brasil); BHI foi adquirido da Himédia (Mumbai, Índia), L-glutamina foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), hemina e ácido fólico foi adquiridos pela Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Os parasitos foram constantemente isolados a partir de lesão de camundongos e os promastigotas eram mantidos *in vitro*, com repiques realizados 2 vezes por semana.

3.3 Manutenção da infecção de *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis* em camundongos BALB/c

Para manter a infectividade das cepas foram utilizados camundongos machos BALB/c com 6 semanas de idade. Para *L. amazonensis* e *L. major* foi inoculado no coxim plantar esquerdo 2×10^6 células/ml em 50 µl de PBS por animal (FIDALGO et al. 2004), após pequenas modificações. Para *L. braziliensis*, foi inoculado 1×10^7 células/ml em 50µ de PBS na derme da orelha esquerda do camundongo (MOURA et al. 2005), após algumas modificações. Para todas as espécies de *Leishmania* a infecção dos camundongos foi realizada com os parasitos na fase estacionária da curva de crescimento. A punção foi realizada nas lesões após aproximadamente 6 semanas de infecção com a retirada das formas amastigotas, que em seguida foram colocadas nos respectivos meios de cultura suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e mantidos a 24 °C. Após 24 horas em cultura, as formas promastigotas apareciam e foram mantidas através de repiques 2 vezes por semana.

3.4 Avaliação da citotoxicidade em formas promastigotas de *Leishmania*

A atividade antipromastigota foi avaliada através do teste colorimétrico do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólico ou MTT (Sigma Chemical Co- St. Louis, MO, USA), onde o sal tetrazolium de cor amarela e solúvel em água é convertido em formazan, insolúvel e de cor lilás pela atividade das desidrogenases mitocondriais das células vivas, se tornando posteriormente solúvel com a adição de isopropanol (MOSMMAN, 1983). Os testes foram realizados em placas de 96 poços. As formas promastigotas na fase logarítmica da curva de crescimento foram suspensas na concentração de 2×10^5 células/poço após contagem em câmara de Neubauer. Os compostos foram adicionados em concentrações seriadas (87,0; 49,0; 28,0; 15,4; 8,6; 4,8; 2,7 e $1,5\mu\text{M}$) após diluição em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co St. Louis, MO, USA). Os testes foram realizados em duplicatas, no qual em alguns poços não houve adição de drogas (controle). Após 72 horas de incubação em estufa a 24°C , foi adicionado $10\ \mu\text{l}$ de MTT à $5\ \text{mg/mL}$ em cada poço e as placas foram novamente incubadas durante quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de $100\ \mu\text{l}$ de isopropanol/ácido clorídrico (HCl) (solução de isopropanol/HCl a 0,7%) e lida em espectrofotômetro à $570\ \text{nm}$ (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição das promastigotas em relação ao controle e a partir desse teste de viabilidade foi determinado o CI_{50} de cada molécula, que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento celular. O CI_{50} foi calculado com o auxílio do programa *GraFit 5* (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K). A anfotericina B (Cristália- São Paulo, Brasil) foi utilizada como fármaco de referência.

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c

Para verificar a citotoxicidade dos compostos em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c estimulados com 2 ml de tioglicolato 3%. Após 72 horas, foi feito o lavado peritoneal dos camundongos em meio 199 (Sigma). As células obtidas foram centrifugadas por 10 minutos a 10 rpm e o sedimento formado foi ressuspensionado em RPMI 1640 (Sigma). Em seguida, as células

foram contadas na câmara de Neubauer, plaqueadas na concentração de 2×10^6 células por poço na placa de 96 poços a 37°C , 5% de CO_2 . Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril para a retirada de macrófagos não aderidos. Posteriormente, foram adicionados meio RPMI-1640 contendo 10% SBF e os compostos a serem testados, em diferentes concentrações (100,0; 50,0; 25,0; 12,5 e 6,25 μM). A placa foi colocada novamente na estufa com 5% de CO_2 a 37°C . Após 72 horas, foi adicionado 10 μL de MTT (MOSSMAN, 1983) à 5 mg/mL em cada poço e depois de duas horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 μL de isopropanol/HCl (solução de isopropanol/HCl a 0,4%). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Os testes foram realizados em duplicatas e em alguns poços não houve adição de compostos (controle). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição dos macrófagos em relação ao controle.

3.6 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares

Diante dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade em macrófagos peritoneais e em promastigotas, alguns compostos foram selecionados para a realização de testes anti-amastigota em *Leishmania*.

Os testes biológicos anti-amastigota foram realizados com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* para os análogos de imidazolidinas e *L. major* para os análogos das hexahidropirimidinas. Após obtenção dos macrófagos como descrito no item anterior, os mesmos foram cultivados sob lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro, em placa de 24 poços. Em cada poço da placa foi colocado 300 μl da suspensão de macrófagos na concentração de 2×10^6 células e deixadas na estufa a 37°C a 5% de CO_2 por 24 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS estéril para a retirada das células não aderidas. Em seguida adicionou-se 10×10^6 promastigotas (proporção 5:1) para *L. amazonensis* e 20×10^6 promastigotas (proporção 10:1) para *L. major* em fase estacionária/poço em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF deixando interagir por 3 horas a 33°C a 5% CO_2 . Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirar os parasitos que não foram fagocitados e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações de 100,0; 50,0; 25,0 e 5,0 μM para os análogos de imidazolidinas e de 100,0; 50,0; 25,0;

12,5 e 6,25 μM para os análogos de hexahidropirimidinas. Em 48 horas foi coletado o sobrenadante para a realização da dosagem de NO. Após 72 horas de tratamento, em estufa de CO_2 à 33°C , as células foram fixadas com álcool absoluto, desidratadas em bateria acetona/xilol (primeiro na acetona pura, depois 90% acetona e 10% xilol, 50% acetona / 50% xilol, 90% xilol e 10% acetona e por último xilol puro) e coradas com Giemsa. Cada teste foi realizado em duplicata.

O efeito antiparasitário dos análogos para as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major* foi avaliado a partir da contagem dessas formas em 100 macrófagos parasitados e a quantidade de células não infectadas durante a contagem. A partir dos dados obtidos foram feitas as seguintes avaliações:

- Avaliação da carga global de amastigotas: foi calculada a partir do número total de amastigotas em relação ao número total de células (infectadas e não infectadas). A partir deste dado, foi estabelecido o número de parasitos intracelulares correspondente a 100 células totais e comparado o controle (sem tratamento) com grupo tratado.
- Avaliação do número de amastigotas por células infectadas: foi calculado a partir do número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados no controle e comparado com o grupo tratado.
- Avaliação do número de macrófagos infectados: foi calculado a partir do número de células infectadas em relação ao total de células (infectadas e não infectadas) no controle e comparado com o grupo tratado.

3.7 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. major*

O NO foi dosado, de maneira indireta, através da concentração de nitrito (NO_2^-), subproduto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess (GREEN et al. 1982). Alíquotas de 50 μl do sobrenadante das culturas foram retiradas após 48 horas de tratamento com os análogos das hexahidropirimidinas e incubados com 50 μl de reagente de Griess (25 μl de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 25 μl de N-1-diiodocloreto de naftiletlenodiamina (Sigma) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma)), sob temperatura ambiente, por 5 minutos. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm (Multiskan EX- Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia) e a produção de nitrito foi quantificada

através da comparação com curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO_2 .

Os controles para este experimento foram: (1) controle negativo de produção de NO sem estímulo, constituído de macrófagos; (2) controle positivo de produção de NO com estímulo, constituído de macrófagos + lipopolissacarídeo de bactéria *Escherichia coli* (Sigma) (LPS - 10 $\mu\text{g/ml}$); (3) controle de macrófagos infectados com *Leishmania* sem estímulo e (4) controle de macrófagos infectados com *Leishmania* com estímulo.

3.8 Análise Estatística

Nos ensaios antipromastigota de *Leishmania* os valores dos CI_{50} para cada composto foram determinados graficamente a partir de uma curva de regressão não linear, estabelecendo o nível em alfa em 5% ($p=0,05$) e o intervalo de confiança em 95% utilizando o programa *GraFit* versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K).

Nos ensaios antiamastigota e dos níveis de óxido nítrico a análise estatística foi realizada por análise de variância (one-way-ANOVA) usando GraphPad, no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foi analisado pelo pós-teste de Dunnett. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,0001$ (***), $p < 0,001$ (**) e $p < 0,01$ (*). Para ensaios antiamastigotas, os valores dos CI_{50} foram calculados utilizando o programa *GraFit* versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K) e o Probit no qual foi utilizado o método de Litchfiet e Wilcoxon.

4 RESULTADOS

4.1- Compostos sintéticos análogos de imidazolidinas e seus precursores

A atividade leishmanicida dos análogos de imidazolidinas e de seus precursores foi testada em formas promastigotas de três espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major* relacionadas principalmente à manifestações tegumentar da doença (BAILEY et al. 2007). A atividade foi avaliada após 72 horas de tratamento, através do método colorimétrico do MTT. Os resultados fazem parte do artigo publicado no *The Scientific World Journal* (De Carvalho et al. 2010), em anexo (Anexo A).

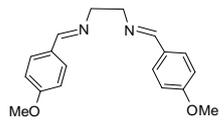
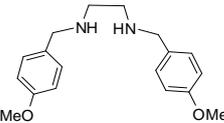
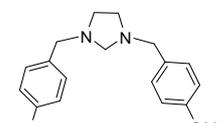
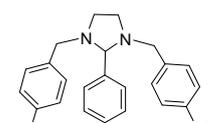
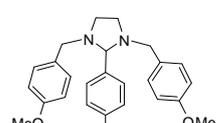
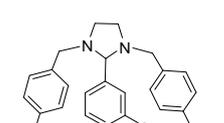
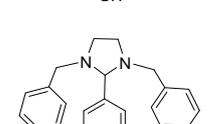
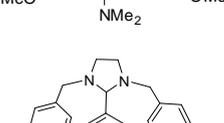
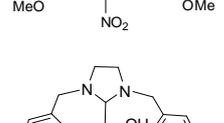
Dentre os dois precursores testados (**1-2**) e sete análogos testados (**3-9**), cinco se mostraram efetivos em formas promastigotas de *L. amazonensis*, com CI_{50} variando entre 6,18 μ M a 34,93 μ M, enquanto que quatro compostos não foram ativos até a máxima concentração testada de 87,00 μ M (Tabela 4). O precursor **1**, que apresenta diiminas na sua estrutura, não apresentou atividade antipromastigota em nenhuma das espécies de *Leishmania*. O composto **1** que foi submetido a reação de redução da diimina para a formação da diamina levou ao precursor **2**, o qual apresentou importante atividade, sendo inclusive o composto mais ativo da série ($CI_{50} = 6,18 \mu$ M). A formação da imidazolidina a partir do composto **2** diminui a atividade antipromastigota dos compostos. Observou-se também que a introdução de um terceiro anel reduziu ainda mais a atividade antipromastigota da imidazolidina, ou seja, os compostos **4**, **5**, **6**, **7**, **8** e **9**, que possuindo três anéis ligados à imidazolidina, não foram ativos ou apresentaram baixa atividade antipromastigota.

Para formas promastigotas de *L. major*, seis compostos dentre os nove testados se mostraram ativos, com CI_{50} variando entre 5,90 e 19,86 μ M (Tabela 4). O precursor **2** foi o que apresentou maior atividade antipromastigota em *L. major* com CI_{50} de 5,90 μ M, como ocorreu também para *L. amazonensis* pela formação da diamina. A introdução de um terceiro anel aromático diminui a atividade dos compostos quando comparado com o composto **3** com CI_{50} de 7,76 μ M. Mas ao introduzir um terceiro grupo metóxi na posição “*para*”, observa-se um aumento na atividade como ocorreu com o composto **5** que apresentou um CI_{50} (7,09 μ M) com

valor próximo do composto **3**. A introdução de uma hidroxila ou de um grupo nitro na posição “*meta*” elimina a atividade antipromastigota, como pode ser observado nos compostos **6** e **8**. A presença de grupos amino no anel aromático diminui a atividade (composto **7**).

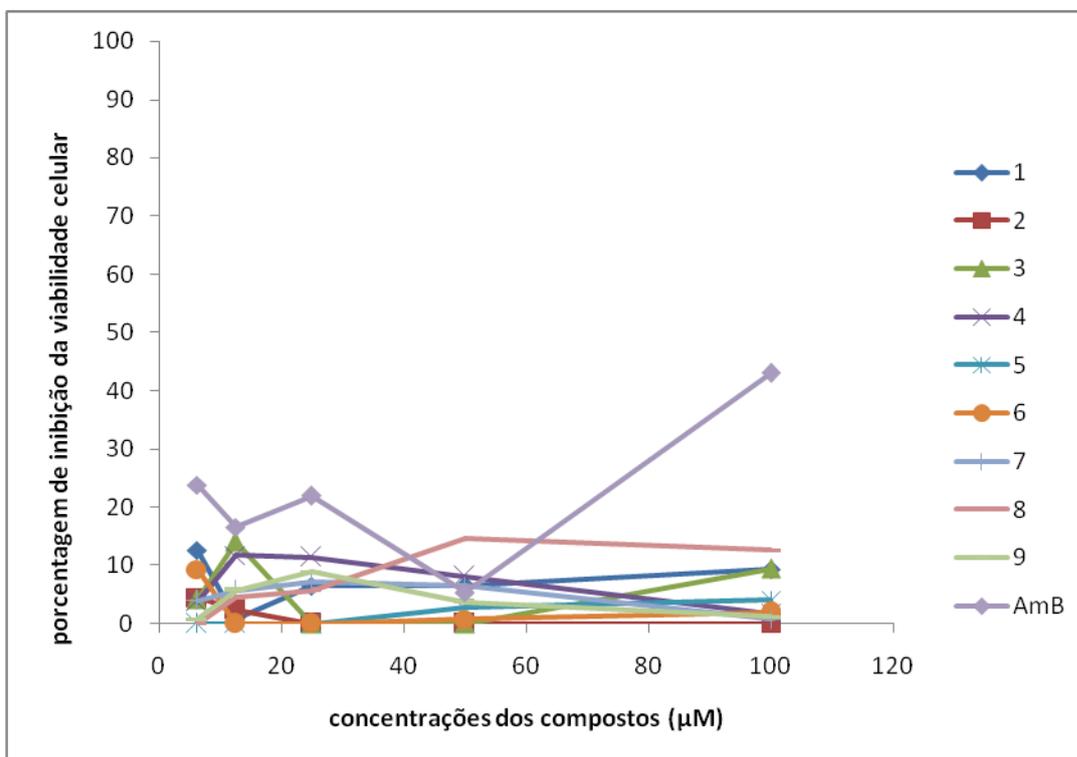
Nas formas promastigotas de *L. braziliensis*, apenas três compostos apresentaram atividade antipromastigota com CI_{50} variando de 6,18 μ M a 42,84 μ M. Confirmando o desempenho do precursor **2**, o mesmo foi o mais ativo da série, com CI_{50} de 6,18 μ M. O composto **3** no qual não possui radical ligado a imidazolidina apresentou CI_{50} de 23,73 μ M. O composto **4** que possui um terceiro anel aromático não apresentou atividade antipromastigota para *L. braziliensis*. A introdução de um terceiro grupo metóxi na posição *para* diminuiu a atividade antipromastigota como pode ser observado no composto **5** com CI_{50} de 42,84 μ M. A introdução de outros radicais como grupo hidroxila, nitro e N-metil diminuem ainda mais a atividade antipromastigota como pode ser verificado na Tabela 4.

Tabela 4: Efeito dos análogos de imidazolidinas e seus precursores sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* e *L. braziliensis*.

Composto	Estrutura	CI ₅₀ (µM)		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
1		> 87,00	> 87,00	> 87,00
2		6,18 ± 0,53	6,18±0,45	5,90 ± 0,84
3		14,91 ± 0,35	23,73±1,62	7,76± 0,86
4		34,93 ± 3,96	> 87,00	10,44±1,00
5		21,61 ± 1,29	42,84±1,44	7,09 ± 0,35
6		> 87,00	> 87,00	> 87,00
7		> 87,00	> 87,00	19,86±2,13
8		> 87,00	> 87,00	> 87,00
9		30,77 ± 5,25	> 87,00	16,64 ± 1,53
Anfotericina B		0,14±0,01	0,4±0,06	0,31±0,07

Em relação à citotoxicidade em macrófagos, as células foram tratadas em diferentes concentrações dos compostos durante 72 horas, sendo a viabilidade celular analisada pelo método do MTT. Como pode ser observado na figura 9, os precursores e análogos das imidazolidinas apresentaram baixa toxicidade às células de mamíferos, com inibição da viabilidade celular inferior a 15%, mesmo na mais alta concentração testada (100 μM). Assim, os compostos **1-9** não foram considerados tóxicos para os macrófagos peritoneais de camundongos. Pode-se observar também que todos os compostos testados mostraram inibição da viabilidade celular dos macrófagos inferior ao da anfotericina B que foi utilizada como droga de referência e na concentração de 100 μM apresentou toxicidade para macrófagos maior que 40%.

Figura 9: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após tratamento com os precursores, análogos das imidazolidinas e Anfotericina B.



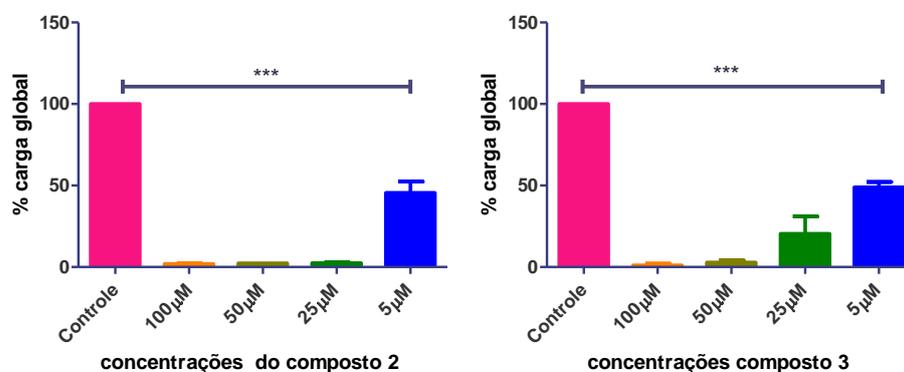
Para os ensaios de atividade nas formas intracelulares de *Leishmania*, foi escolhida a espécie de *L. amazonensis*, pelo fato deste teste estar bem padronizado em nosso laboratório e a manutenção da cepa em camundongos ter sido garantida

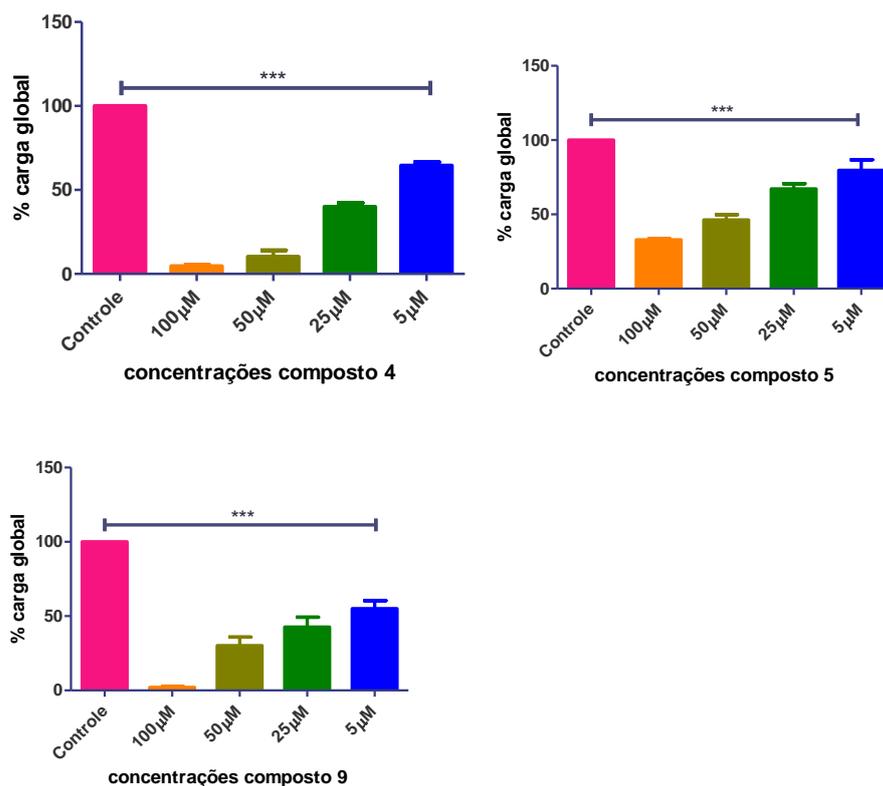
com sucesso. Os macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram eficientemente infectados com amastigotas de *L. amazonensis*, pois no controle (sem adição dos compostos) aproximadamente 76% das células estavam infectadas e havia, em média, oito parasitos por célula infectada.

Em relação à escolha dos compostos, optou-se por testar o precursor **2** e os análogos **3**, **4**, **5** e **9**, por terem apresentado atividade antipromastigota de *L. amazonensis* e baixa toxicidade para macrófagos. Para verificar o efeito dos compostos sobre as formas intracelulares, foram analisados os seguintes parâmetros: carga global de amastigotas, número de amastigotas/macrófagos e número de macrófagos infectados (Figuras 10 a 12). É possível verificar que todos esses compostos apresentaram boa atividade em amastigotas de *L. amazonensis*, levando à redução da carga global, do número de amastigotas por macrófago infectado e da porcentagem de células infectadas. Além disso, de maneira geral, a atividade foi dose-dependente.

Analisando a figura 10, pode-se verificar que em todos os compostos houve uma redução significativa da carga global de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, de maneira dose-dependente. Quando comparado ao controle (659,5 amastigotas), o composto **2** foi o mais ativo, apresentando carga global de parasitos intracelulares de 12,6 amastigotas (100 μ M), 15,5 (50 μ M), 16,4 (25 μ M) e 298,6 (5 μ M), o que corresponde a 1,91%; 2,36%; 2,49% e 45,27 da carga global de parasitos.

Figura 10: Porcentagem da carga global de amastigotas de *L. amazonensis* tratados com os compostos **2**, **3**, **4**, **5** e **9**.





Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com os análogos das imidazolidinas. A avaliação da carga global de amastigotas foi calculada a partir do número total de amastigotas em relação ao número total de células (infectadas e não infectadas). A partir deste dado, foi estabelecido o número de parasitos intracelulares correspondente a 100 células totais e comparado o controle (sem tratamento) com grupo tratado. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significativa.

Uma vez estabelecido o efeito dos compostos sobre amastigotas de *L. amazonensis*, foi realizado o cálculo do CI_{50} (Tabela 5). Dentre os compostos, o mais ativo foi o composto **2**, que apresentou CI_{50} de 6,69 µM, sendo que os demais compostos apresentaram CI_{50} de 11,08 µM; 33,60 µM; 63,88 µM e 35,13 µM, para os compostos **3**, **4**, **5** e **9**, respectivamente.

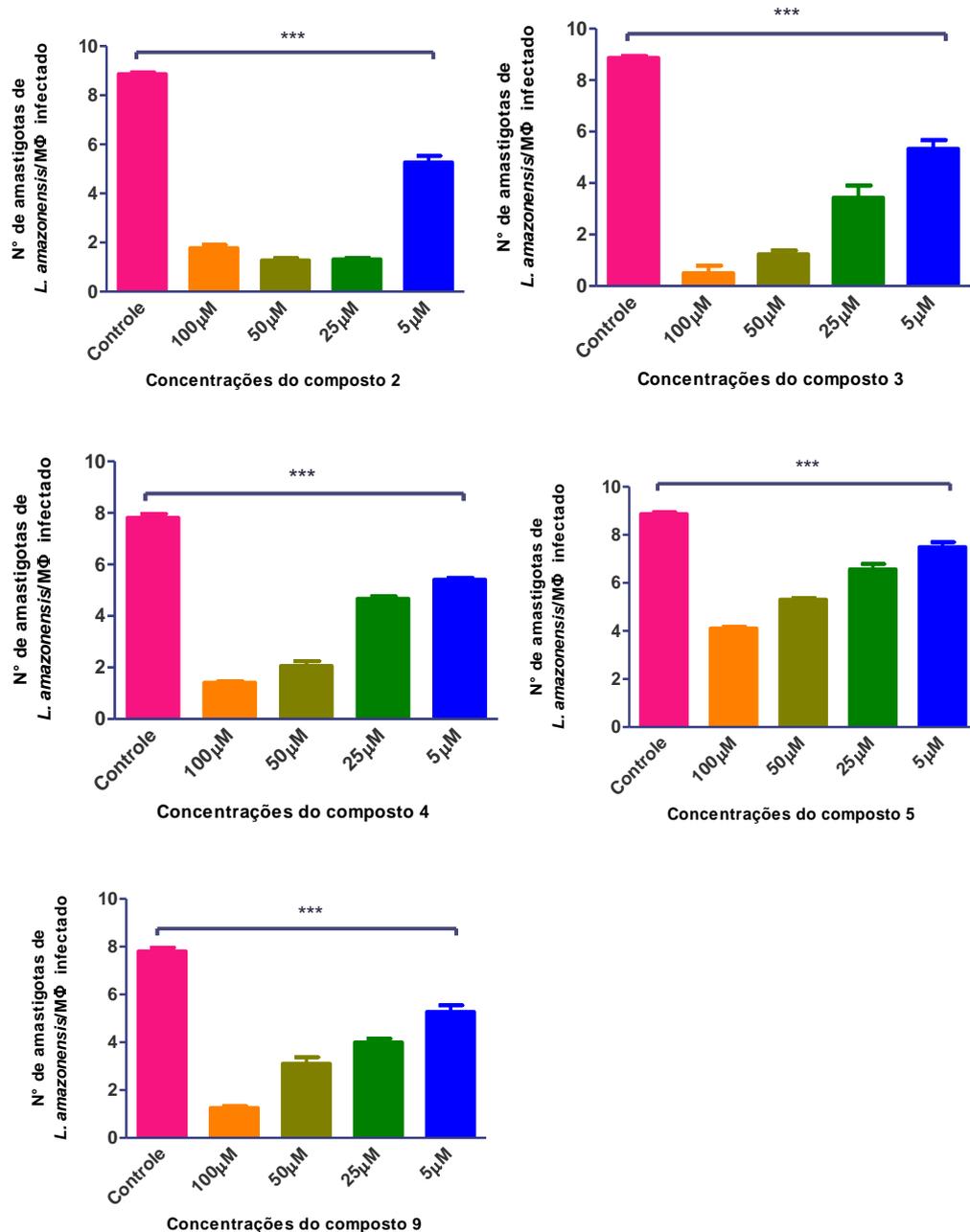
Tabela 5: CI_{50} dos compostos **2**, **3**, **4**, **5** e **9** em formas intracelulares de *L. amazonensis*.

Compostos	CI_{50} (μM)*
2	6,69 (4,60-9,73)
3	11,08 (8,63-14,22)
4	33,60 (26,61-42,44)
5	63,88 (49,80-81,96)
9	35,13 (28,03-44,04)

* CI_{50} dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com intervalo de confiança calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon.

Visto que os compostos reduziam a carga global de amastigotas intracelulares, foi investigado se o tratamento exercia efeito sobre o número de amastigotas/macrófagos. Como observado na figura 11, o tratamento com 72 horas dos compostos levou a uma redução estatisticamente significativa do número de amastigotas/macrófagos, tendo de 7,50 à 0,50 amastigotas/célula hospedeira, o qual isto corresponde a 15,50% a 94%, respectivamente, quando comparado ao controle (8,87 amastigotas/macrófagos). Os compostos **2** e **3** foram os que tiveram maior atividade na redução destas formas intracelulares, valendo a pena destacar que o composto **2** reduziu em mais de 85% até nas três primeiras concentrações testadas de 100 μM ; 50 μM e 25 μM . Já na concentração de 5 μM , o composto **2** inibiu em 40% no número de amastigotas. O composto **3** reduziu o número de amastigotas em 94%, 86% e 61% nas concentrações de 100 μM ; 50 μM e 25 μM , respectivamente. O composto **4** e **5** inibiram os amastigotas em 81% e 72%, e em 83% e 58%; respectivamente nas concentrações de 100 μM e 50 μM . O composto **5** foi o menos ativo reduzindo apenas 53% o número de amastigotas na concentração de 100 μM .

Figura 11: Número de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófago infectado no controle e tratado com os compostos 2, 3, 4, 5 e 9.

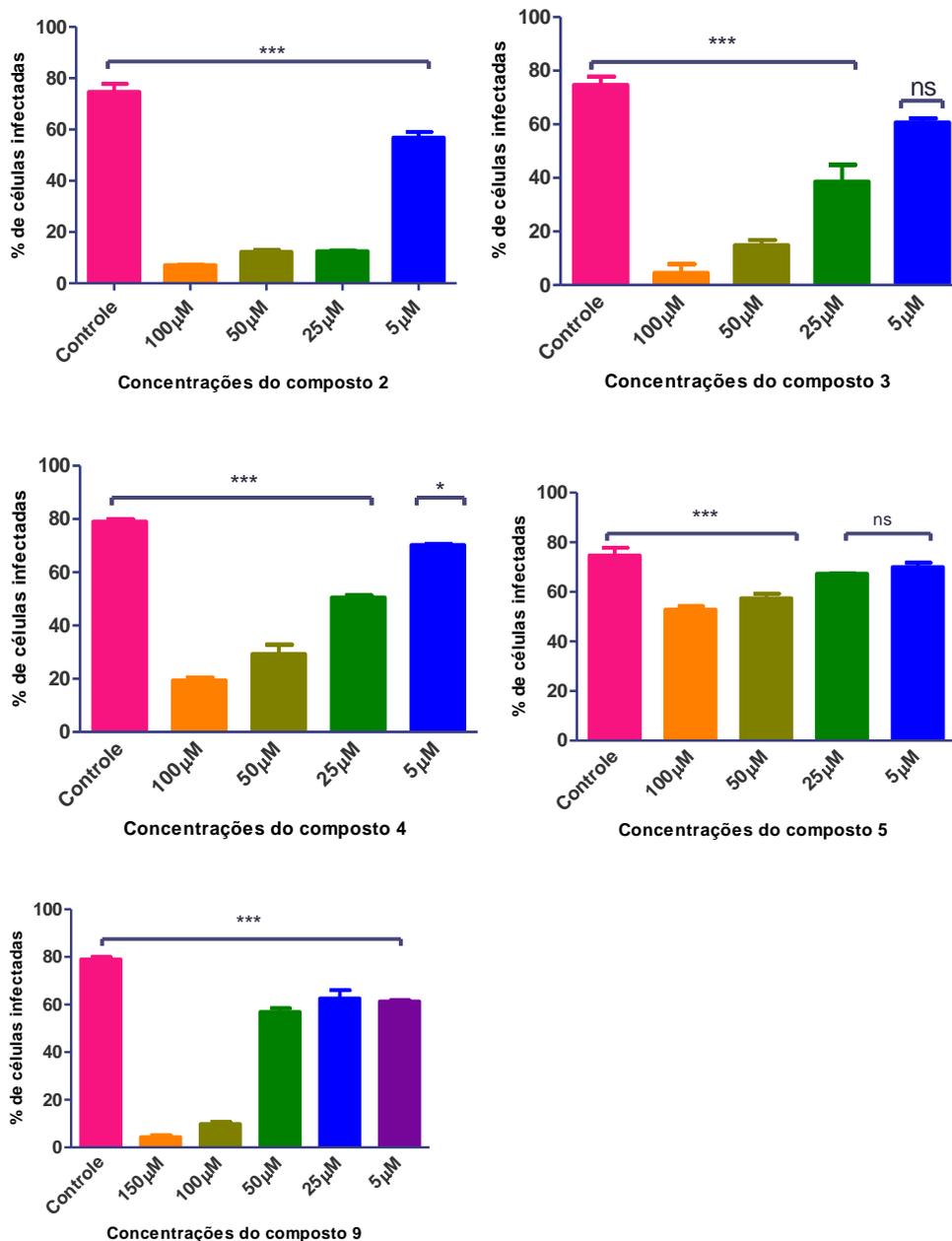


Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com os análogos das imidazolidinas. A avaliação do número de amastigotas por células infectadas foi feita a partir do número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados no controle, comparando-se com o grupo tratado. A partir deste dado, foi estabelecido o valor correspondente a 100 células totais. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significante.

Foi verificado também se o tratamento influenciava no número de macrófagos infectados e como pode ser observado, quando se compara ao controle, todos os

compostos também reduzem o número de macrófagos infectados, variando de 2,70% a 70,0%, o que significa uma inibição da porcentagem de macrófagos infectados de 30% a 97,3%, respectivamente (Figura 12). Neste caso, o composto **3** foi o que mais se destacou entre os compostos, inibindo 97,3%; 85,0%; 61,4% e 39,3%, nas concentrações de 100 μ M, 50 μ M, 25 μ M e 5 μ M, respectivamente.

Figura 12: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* no controle e tratado com os compostos **2, 3, 4, 5 e 9**.



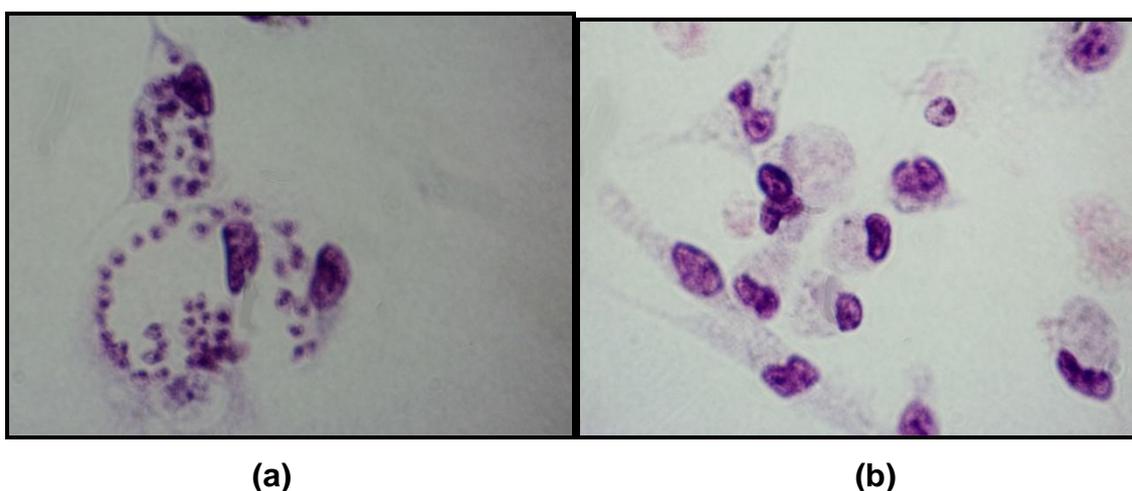
Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* e tratados com os análogos das imidazolidinas. A avaliação do número de macrófagos infectados foi feita a partir do número de células infectadas em relação ao total de células (infectadas e

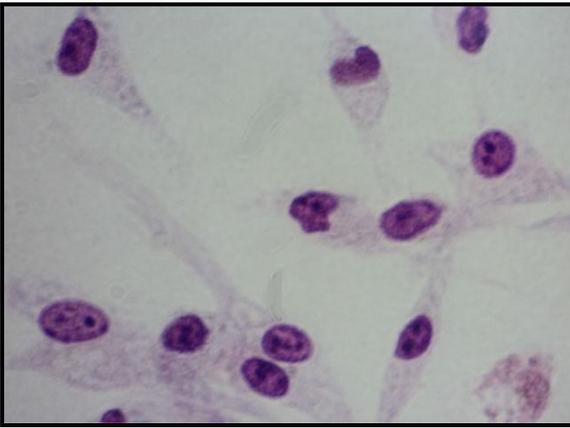
não infectadas) no controle, comparando-se com o grupo tratado. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significativa.

A anfotericina B foi usada como droga-controle nas concentrações de 5,0; 1,0 e 0,5 μM e apresentou uma porcentagem de inibição dos amastigotas de 63,69; 44,25 e 27,11% e carga global de 8,96%, 17,16% e 32,54%, respectivamente, o que corresponde a uma redução de 91,04%, 82,84% e 67,45% da carga global de parasitos.

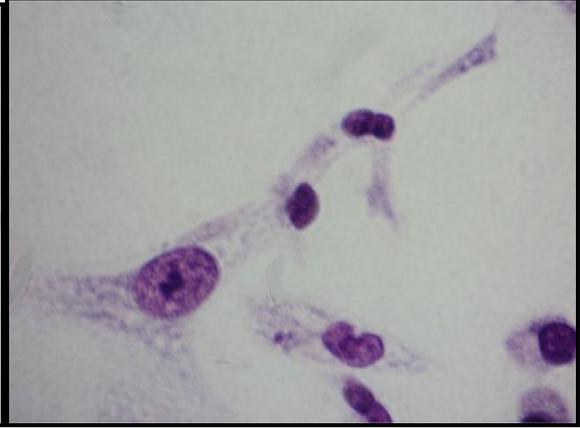
A figura 13 ilustra a atividade anti-amastigota dos compostos **2**, **3**, **4**, **5** e **9** na concentração de 100 μM . Pode ser observado que todos os compostos testados reduziram o número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* quando comparados ao controle (Figura 13f), sendo que o composto **5** (Figura 13-d) foi o que obteve menor atividade quando comparado com o controle.

Figura 13: Fotomicrografia ilustrativa da atividade leishmanicida após 72 horas de tratamento com os compostos. **(a)** controle *L. amazonensis*, **(b)** composto **2**; **(c)** composto **3**; **(d)** composto **4**; **(e)** composto **5** e **(f)** composto **9**. Aumento de 1000 X.

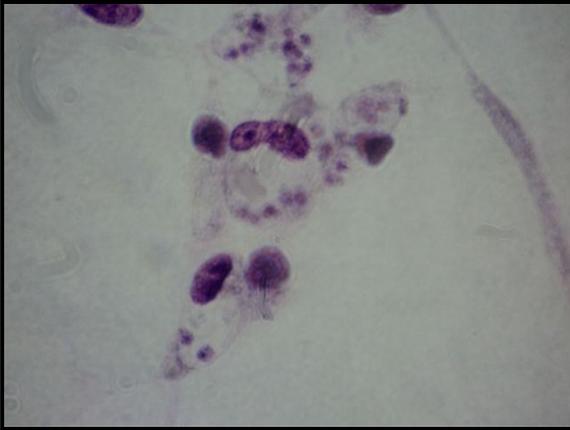




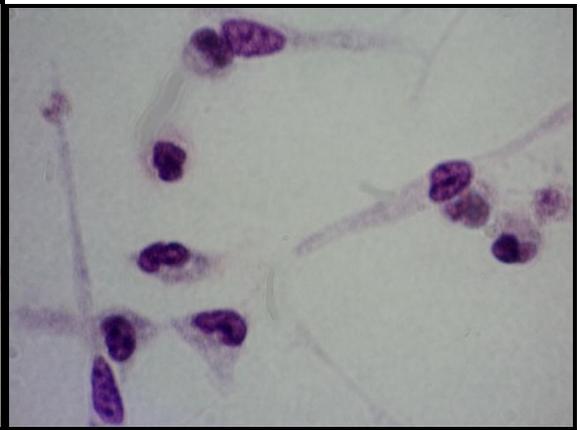
(c)



(d)



(e)



(f)

4.2- Compostos sintéticos análogos de hexahidropirimidinas

A atividade leishmanicida dos análogos das hexahidropirimidinas foi testada também em formas promastigotas de três espécies de *Leishmania*: *L. amazonensis*, *L. major*, *L. braziliensis*, todas relacionadas principalmente às manifestações tegumentar (BAILEY et al. 2007). Os resultados foram submetidos para publicação no Medicinal Chemistry (Anexo B).

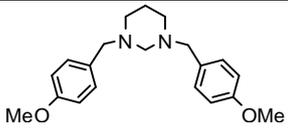
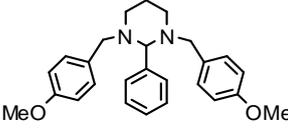
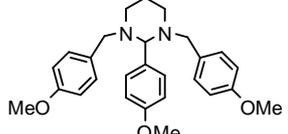
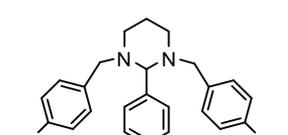
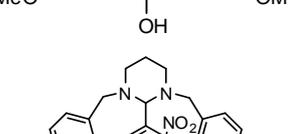
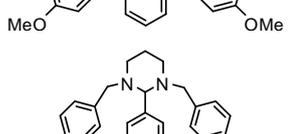
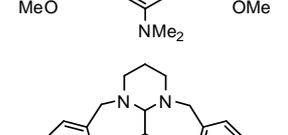
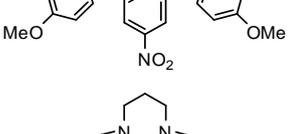
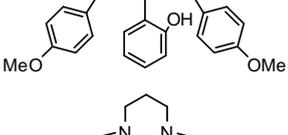
Na tabela 6 estão representados os resultados da atividade antipromastigota das quatro espécies de *Leishmania* citadas anteriormente.

Dentre as espécies testadas, promastigotas de *L. major* mostrou-se mais sensível, sendo que dos nove compostos testados, cinco apresentaram atividade leishmanicida com CI_{50} variando entre 13,63 μ M e 33,50 μ M (Tabela 6). Nenhuma outra espécie de *Leishmania* mostrou sensibilidade significativa (concentração máxima testada de 87 μ M) com os análogos de hexahidropirimidinas.

O composto **10**, que apresenta 2 anéis benzil na sua estrutura apresentou maior atividade antipromastigota para *L. major* com CI_{50} de 13,63 μ M. A introdução de um terceiro grupo benzil diminuiu a atividade dos outros compostos (**11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17** e **18**). A presença de grupo amino metilado ou um grupo nitro na posição “para” elimina a atividade antipromastigota dos compostos, como observado nos compostos **15** e **16**. Observou-se também que a introdução do grupo hidroxila na posição “para” aumentou a atividade antipromastigota do composto **13**.

É interessante observar que os compostos análogos das hexahidropirimidinas com anéis de 6 membros apresentaram menor atividade antipromastigota quando comparada às imidazolidinas com anéis de 5 membros (DE CARVALHO et al. 2010).

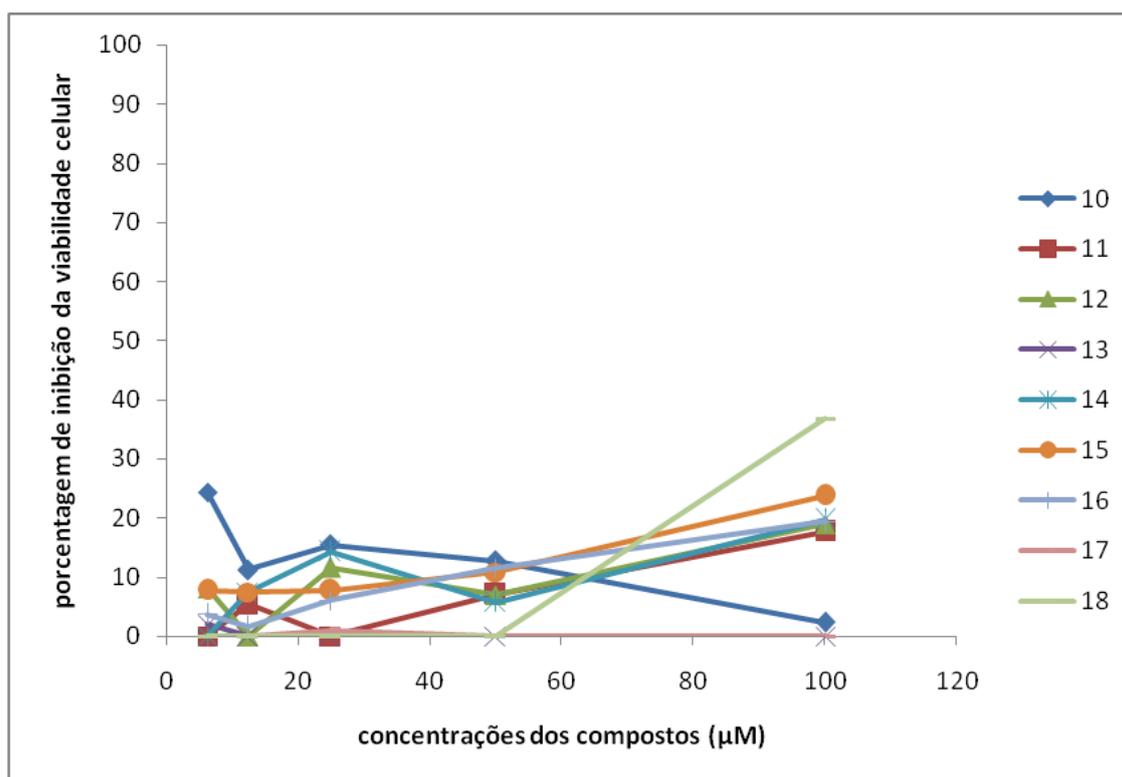
Tabela 6: Efeito dos análogos de hexahidropirimidinas em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*.

Composto	Estrutura	CI ₅₀ (µM)		
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. major</i>
10		> 87,00	> 87,00	13,63±0,37
11		> 87,00	> 87,00	31,67±0,74
12		> 87,00	> 87,00	33,50 ±0,67
13		> 87,00	> 87,00	19,09±0,44
14		> 87,00	> 87,00	21,02±1,80
15		> 87,00	> 87,00	> 87,00
16		> 87,00	> 87,00	> 87,00
17		> 87,00	> 87,00	> 87,00
18		> 87,00	> 87,00	NT*
Anfotericina B		0,14±0,01	0,4±0,06	0,31±0,07

* NT= Não testada

Para avaliar a citotoxicidade em macrófagos, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 72 horas, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Como pode ser observado na figura 14, os análogos das hexahidropirimidinas apresentam toxicidade variada para macrófagos peritoneais de camundongos. Dentre os análogos, o composto **18** foi o mais tóxico, inibindo aproximadamente 37% da viabilidade celular na mais alta concentração testada (100 μM). Todos os demais compostos reduziram a viabilidade celular abaixo de 25% na mais alta concentração testada (100 μM).

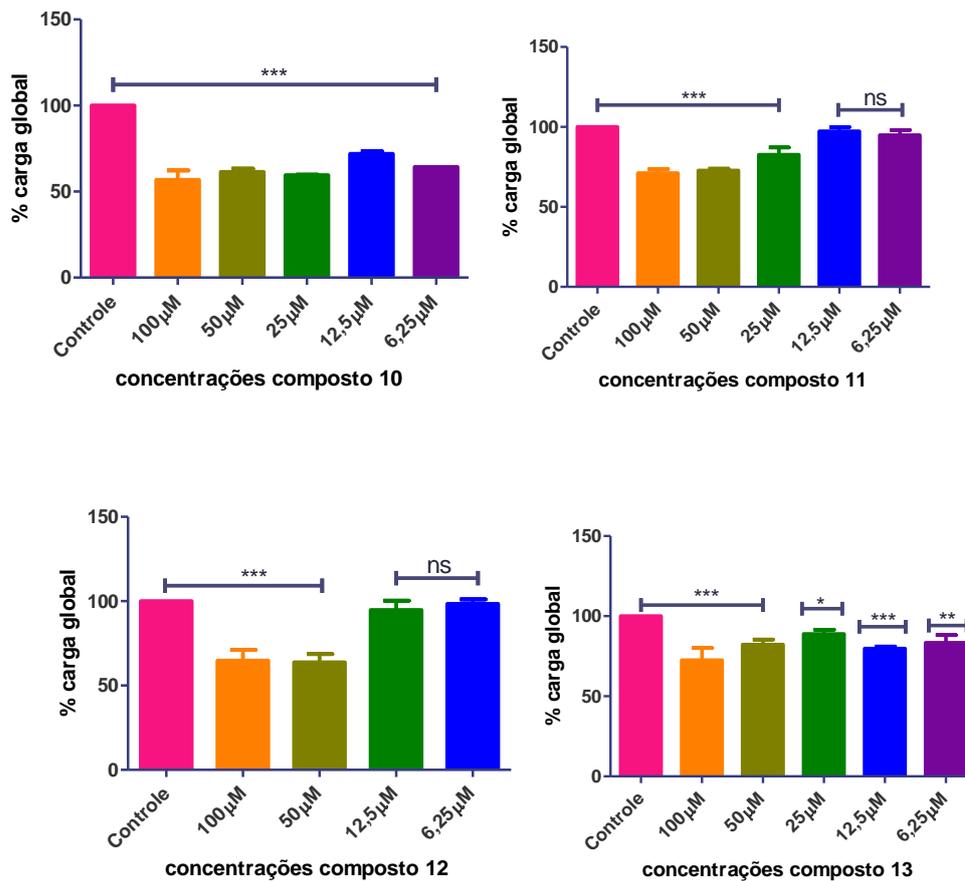
Figura 14: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c após tratamento com os análogos das hexahidropirimidinas.

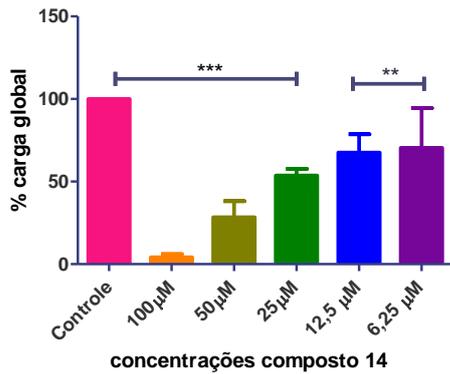


Dentre os análogos testados quanto à atividade antipromastigota de *Leishmania*, os compostos **10**, **11**, **12**, **13** e **14** foram efetivos (Tabela 6). Entretanto, *L. major* foi a única espécie que se mostrou sensível e, portanto esta foi a escolhida para os testes anti-amastigota.

Em relação à carga global (Figura 15), pode-se verificar que não houve redução efetiva da carga global de amastigotas intracelulares de *L. major*, exceto o tratamento com o composto **14**. Neste caso, pode ser verificado que este reduziu a carga global de parasitos intracelulares de *L. major* de maneira dose-dependente, variando de 95,85% (100 μ M) a 29,50% (6,25 μ M). Este composto apresentou CI_{50} de 46,15 μ M e a anfotericina B, utilizada como droga de referência, apresentou CI_{50} de 0,27 μ M. Os compostos **10**, **11**, **12** e **13** não apresentaram atividade efetiva em amastigotas intracelulares de *L. major*.

Figura 15: Porcentagem da carga global de amastigotas de *L. major* tratados com os compostos **10**, **11**, **12**, **13** e **14**.

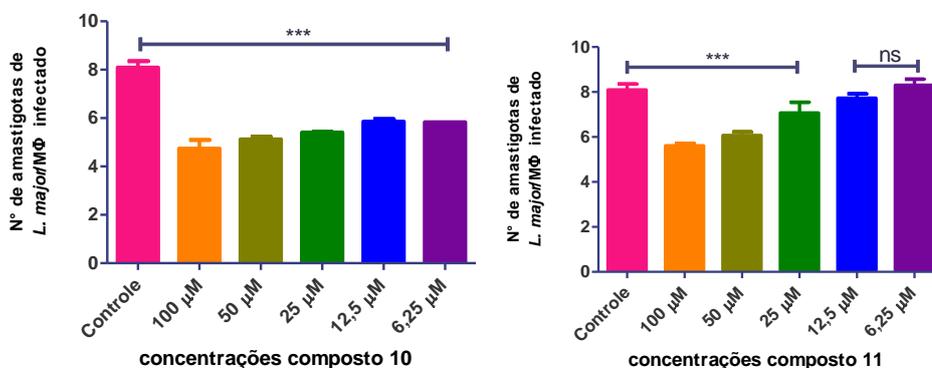


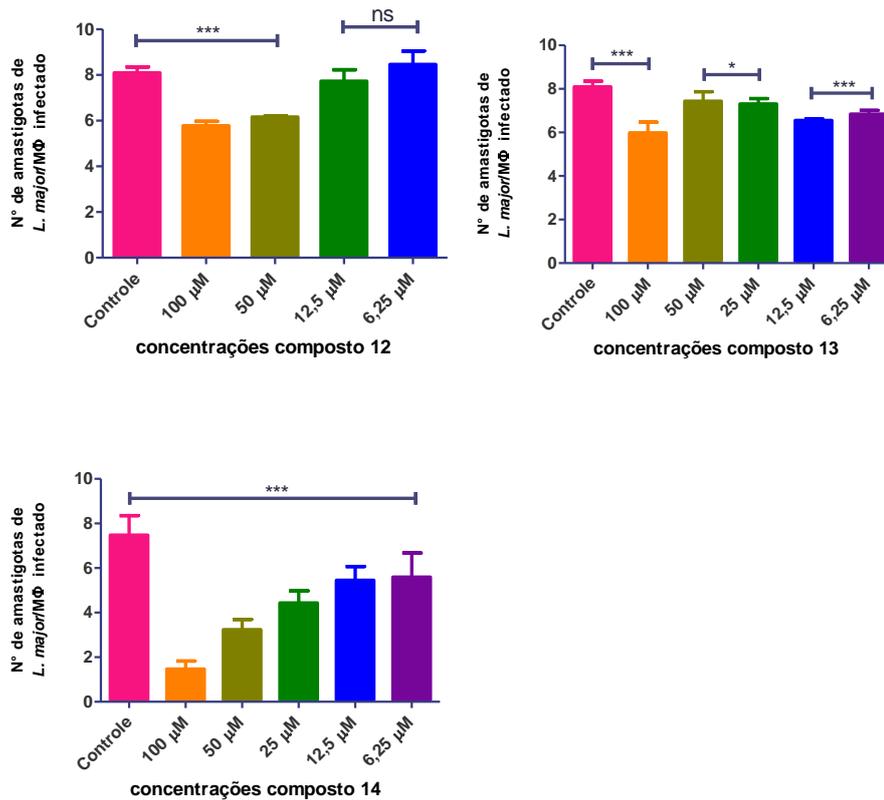


Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. major* e tratados com os análogos das hexahidropirimidinas. A avaliação da carga global de amastigotas foi calculada a partir do número total de amastigotas em relação ao número total de células (infectadas e não infectadas). A partir deste dado, foi estabelecido o número de parasitos intracelulares correspondente a 100 células totais e comparado o controle (sem tratamento) com grupo tratado. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significativa.

Analisando o efeito do tratamento dos compostos sobre o número de amastigotas/macrófagos (Figura 16), verifica-se também que o composto **14** foi o mais ativo, reduzindo em mais de 80% o número de amastigotas intracelulares na concentração de 100 µM.

Figura 16: Número de amastigotas de *L. major* por macrófago infectado no controle e tratado com os compostos **10**, **11**, **12**, **13** e **14**.

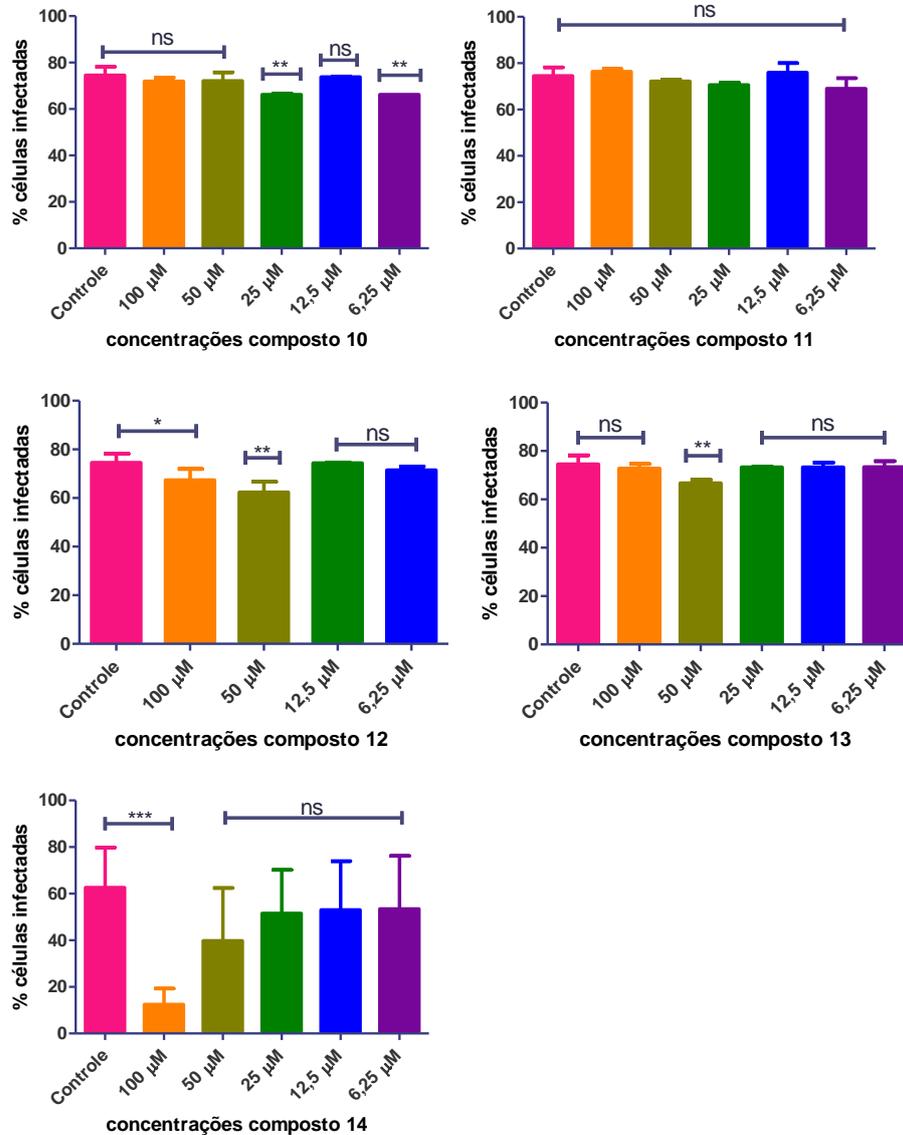




Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. major* e tratados com os análogos das hexahidropirimidinas. A avaliação do número de amastigotas por células infectadas foi feita a partir do número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados no controle, comparando-se com o grupo tratado. A partir deste dado, foi estabelecido o valor correspondente a 100 células totais. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significativa.

Foi verificado também se o tratamento influenciava no número de macrófagos infectados e como pode ser observado na figura 17, quando se compara ao controle, o composto **14** reduziu, de maneira estatisticamente significativa, o número de macrófagos infectados apenas na concentração de 100 µM (78,83%, 32,17%, 12,14%, 9,5% e 8,86% nas concentrações de 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM e 5 µM, respectivamente).

Figura 17: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de *L. major* no controle e tratado com os compostos **10**, **11**, **12**, **13** e **14**.

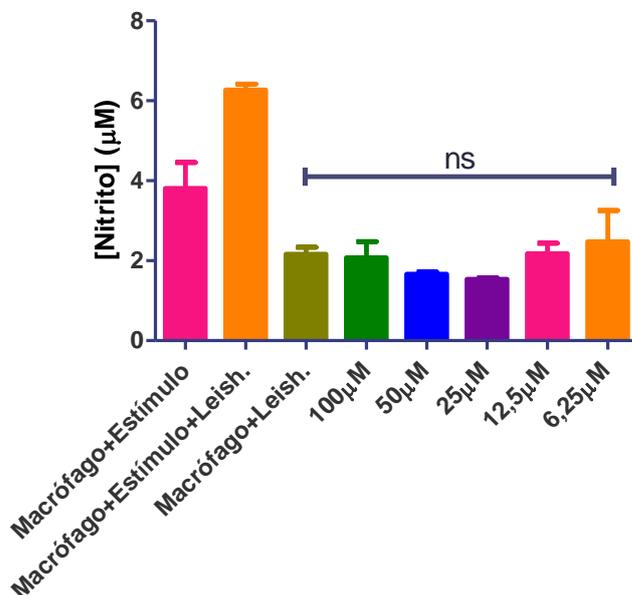


Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas de *L. major* e tratados com os análogos das hexahidropirimidinas. A avaliação do número de macrófagos infectados foi feita a partir do número de células infectadas em relação ao total de células (infectadas e não infectadas) no controle, comparando-se com o grupo tratado. Análise estatística: Teste One-Way Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significativa.

A anfotericina B foi utilizada como droga de referência com CI_{50} de $0,27 \mu M$ em amastigotas intracelulares de *L. major*.

A produção de NO pelos macrófagos ativados possui um papel importante como agente da sinalização celular e sua função como molécula efetora antileishmanial (GENESTRA et al. 2003). Assim, foram avaliados os níveis de NO em macrófagos infectados e tratados com o composto **14** no intuito de compreender a atividade leishmanicida do composto nas formas intracelulares de *L. major*. A figura 18 representa os níveis de nitrito em todas as concentrações testadas, e demonstra que em nenhuma concentração, o composto **14** aumentou de maneira significativa os níveis de produção deste composto (a produção de nitrito variou de 1,540 a 1,700 μM), quando comparados em relação ao controle (macrófago infectado com *L. major*, com produção de nitrito igual a 2,164 μM). Foram usados também vários controles positivos de produção de nitrito: macrófagos estimulados com LPS (3.810 μM) e macrófagos infectados e estimulados com LPS (6.272 μM).

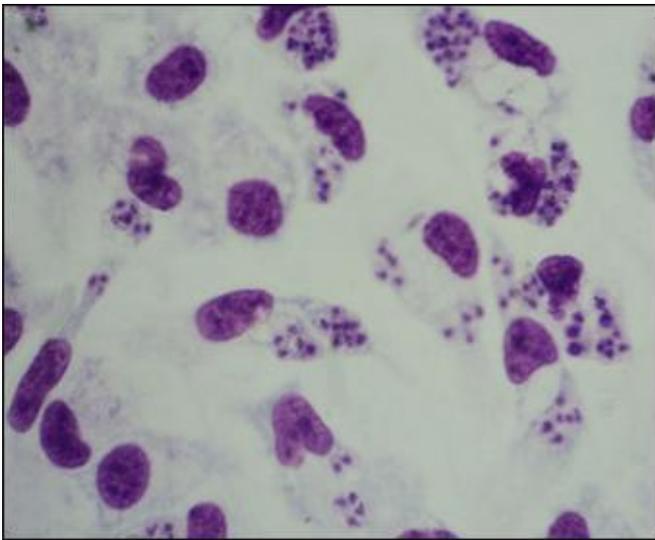
Figura 18: Avaliação dos níveis de NO em macrófagos infectados por *L. major* e tratado com o composto **14** nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 μM .



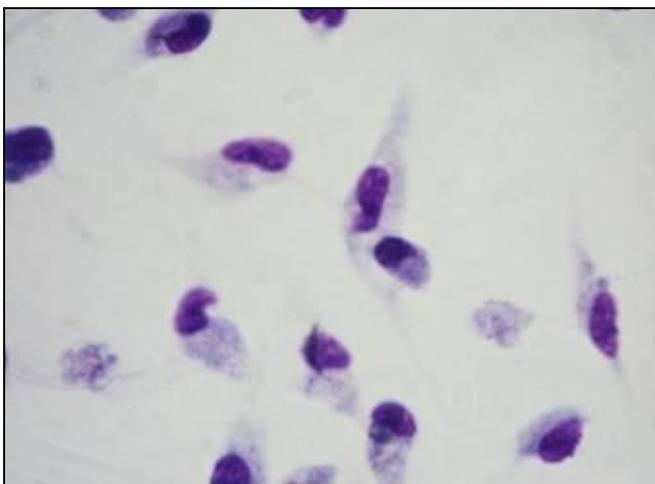
Alíquotas de 50 μl do sobrenadante das culturas foram retiradas após 48 horas de tratamento com os compostos e o NO foi dosado através da concentração de nitrito e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A produção de nitrito foi quantificada através da comparação com curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO_2 . Controles positivos: Macrófago + Estímulo; Macrófago + Estímulo+ *Leishmania*. O estímulo foi LPS. Análise estatística: Teste One-Way, Análise de Variância (Teste Dunnett), onde $p < 0,0001$ (***) é estatisticamente significante.

Através da figura ilustrativa 19, pode-se observar uma redução significativa do número de amastigotas quando macrófagos infectados com *L. major* foram tratados com o composto **14** na concentração de 100 μM em comparação com o controle após 72 horas de incubação.

Figura 19: Fotomicrografia ilustrativa da atividade leishmanicida após 72 horas de tratamento com os compostos. **(a)** macrófago infectado com *L. major* (controle) e **(b)** macrófago infectado com *L. major* tratado com o composto **14** na concentração de 100 μM após 72 horas.



(a)



(b)

Fonte: Do autor

5 DISCUSSÃO

A quimioterapia utilizada tanto para LC quanto para LV se baseia em antimoniais pentavalentes tais como o Glucantime e o Pentostam, no qual apresentam diversas desvantagens dentre as quais se destacam a toxicidade elevada, o alto custo, dificuldade na administração e o elevado período de tratamento (SANTOS et al. 2008). Diante desse fato, torna-se necessário a pesquisa de novas drogas menos tóxicas, com baixo custo e de fácil administração.

Neste trabalho, foram testados 18 compostos, sendo que 9 são análogos de imidazolidinas e 9 análogos de hexahidropirimidinas. Os análogos de imidazolidinas e hexahidropirimidinas são compostos heterocíclicos, que tem mostrado diversas propriedades biológicas (SHARMA et al. 2001). Ambos apresentam atividades antibacterianas, antivirais, antifúngicas e antiprotozoária (SHARMA et al. 2001, CATERINA et al. 2008). Em relação a este último, CATERINA et al. (2008) apresentam alguns derivados de imidazolidinas com atividade em *Trypanosoma cruzi* e a relação estrutura-atividade dos compostos e SHARMA et al. (2001) mostram as propriedades biológicas dos derivados do tetrahidroimidazol. TEMPONE et al. (2011) relatou que os azóis e o alopurinol são drogas orais com baixa atividade quando usadas sozinhas, mas em combinação com outras drogas, tem sido relatado casos de tratamento efetivo em pacientes imunossuprimidos.

Neste trabalho, os compostos foram testados em três espécies de *Leishmania*, as quais incluem *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*; responsáveis por diversas manifestações clínicas cutâneas (REBELLO et al. 2010).

Inicialmente foi realizada uma triagem em formas promastigotas, que é a encontrada no inseto vetor e a inibição do crescimento parasitário após tratamento com os compostos foi mensurada pelo método colorimétrico do MTT. O teste colorimétrico do MTT é um ensaio de viabilidade preciso, rápido, reprodutível e de baixo custo (TEMPONE et al. 2011). Uma alternativa para o ensaio colorimétrico do MTT é o indicador de oxidação-redução Alamar Blue, que tem sido desenvolvido para avaliar a atividade antileishmanial de drogas (TEMPONE et al. 2011).

A triagem em promastigotas é importante devido às dificuldades existentes na realização dos testes nas formas intracelulares *in vitro* e isto é corroborado por vários autores (MUYLDER et al. 2011, TEMPONE et al. 2011). A escolha em usar

formas promastigotas é baseada em vários fatores, os quais incluem a facilidade de manutenção em cultura e manipulação. Entretanto, como as formas promastigotas são as formas do parasito encontradas no inseto vetor, não são, portanto, o alvo direto das drogas, assim, foi realizado posteriormente o ensaio em amastigotas intracelulares, a qual é a forma encontrada nos hospedeiros vertebrados e, portanto, responsável pelas manifestações clínicas. O ensaio dos compostos em amastigota intracelular é indispensável e tem sido designado como modelo-ouro e alvo mais relevante para ensaios em *Leishmania*, mas requer intensa manipulação experimental durante vários dias (VERMEERSCH et al. 2009, TEMPONE et al. 2011). Além disso, infecção dos macrófagos com promastigotas metacíclicos está sujeito a um alto grau de variabilidade na infectividade dependendo das características do crescimento do isolado e do nível da metaciclogênese *in vitro* (VERMEERSCH et al. 2009).

Em relação à atividade antipromastigota de *Leishmania*, pode ser verificado que as diferentes espécies de *Leishmania* apresentaram sensibilidades variadas, sendo que os compostos análogos de imidazolidinas apresentaram atividade mais significativa em *L. major* do que em *L. amazonensis* e *L. braziliensis* (Tabela 4). Já os análogos de hexahidropirimidinas foram mais ativos para *L. major*. Diferenças de sensibilidade das espécies de *Leishmania* é corroborada por vários autores como YARDLEY et al. (2006), AMATO et al. (2007), AMATO et al. (2008) e GOTO et al. (2010). Estes últimos descreveram as diferenças de sensibilidade entre as espécies de *Leishmania* em relação dos antimoniais pentavalentes, drogas utilizadas como de primeira escolha no tratamento das leishmanioses. GOTO et al. (2010) observaram respostas diferentes entre as espécies de *Leishmania* do “Velho Mundo” e “Novo Mundo”. As espécies do “Velho Mundo”, como *L. tropica*, *L. major* são suscetíveis tanto para o tratamento local como sistêmico, enquanto as espécies do “Novo Mundo” são somente suscetíveis ao tratamento sistêmico. Isto se deve a grande variedade de espécies de *Leishmania* que causam leishmaniose tegumentar na América e no Caribe com diferentes apresentações clínicas.

Além disso, cepas diferentes da mesma espécie de *Leishmania* podem apresentar diferença na sensibilidade às drogas (YARDLEY et al. 2006) . Por exemplo, no Peru, pacientes infectados com *L. guayanensis* respondem melhor à terapia antimonial do que pacientes infectados com *L. braziliensis*. Já no Brasil, falha na terapia antimonial é maior em pacientes infectados com *L. guayanensis* (73,7%)

do que em pacientes infectados com *L. braziliensis* (49,2%). Estas diferenças podem ser explicadas pelas diferenças entre as cepas de *Leishmania*, mesmo sendo da mesma espécie. Variações quanto à eficácia das drogas para o tratamento das leishmanioses é uma consequência das diferenças de sensibilidade das espécies de *Leishmania*, bem como do estado imune de cada paciente ou das propriedades farmacocinéticas da droga. Dentre os problemas quanto ao desenvolvimento de uma única droga para todas as formas de leishmanioses podemos também destacar os diferentes locais da patogênese da LC e LV e a variação intrínseca da sensibilidade à droga para as diferentes espécies que podem infectar o homem (CROFT et al. 2006). Dentro de um mesmo país, cepas de *Leishmania* variam em termos de sensibilidade na terapia antimonial (TEMPONE et al. 2011).

Os antimoniais pentavalentes (Stibogluconato de sódio e Antimoniato de meglumina) têm sido considerados para o tratamento de leishmanioses mucosas como drogas de primeira escolha em vários países. Entretanto, baixas doses de antimoniais não podem ser padronizadas devido à ocorrência de variabilidade regional nas respostas. Resistência aos antimoniais é relatada em 14% dos casos. Quando a terapia é correta, falhas no tratamento não são consideradas como diretamente relacionada ao mecanismo de ação da droga. Em muitos casos resultam do uso de doses subterapêuticas e/ou tratamentos por períodos mais curtos do que o recomendado. Tais fatos sugerem a existência de subespécies de parasitos com vários graus de sensibilidade às drogas (AMATO et al. 2007).

Várias células de mamíferos têm sido usadas como célula hospedeira em ensaios de amastigotas intracelulares, incluindo macrófagos peritoneais de camundongos, macrófagos derivados de medula óssea, macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico e macrófagos THP-1 derivados de monócitos de tumor (TEMPONE et al. 2011). Nos testes em amastigotas intracelulares realizados neste trabalho, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos, e segundo TEMPONE et al. 2011 (apud SEIFERT et al. 2010) dados tem indicado que macrófagos peritoneais de camundongos são um modelo mais preciso, fornecendo resultados mais reprodutíveis, além da elevada taxa de infecção no qual é essencial para uma análise mais rigorosa da atividade leishmanicida.

Em relação à atividade em amastigotas intracelulares, dentre todos os compostos analisados, os análogos de imidazolidinas foram os que apresentaram maior atividade leishmanicida, sendo que o composto **2**, o qual possui como radical

uma diamina, foi o mais ativo, com CI_{50} de 6,69 (Tabela 5) . Compostos contendo amina têm demonstrado significativa atividade em diferentes espécies de *Leishmania* (REIS CORRALES et al. 2010; COIMBRA et al. 2008, 2010). Poliaminas são essenciais para o crescimento e proliferação de vários organismos, incluindo *Leishmania* e a atividade destes compostos pode estar relacionada com interferências no caminho metabólico das mesmas nestes protozoários (COIMBRA et al. 2008).

Verificaram-se também diferenças de sensibilidade entre as formas promastigotas e amastigotas, como se pode observar em relação aos compostos análogos de hexahidropirimidinas, em que o composto **14**, no qual foi o único composto que apresentou atividade em amastigota intracelular em *L. major* (CI_{50} de 46,15 μ M), mesmo sem ser o composto com maior atividade antipromastigota (Tabela 6). Já o composto **10**, que foi o mais ativo no teste antipromastigota de *L. major* com CI_{50} de 13,63 μ M, não apresentou atividade significativa em amastigotas intracelulares da mesma espécie. MUYDLER et al. (2011) mostrou também as diferenças de sensibilidade nos testes entre as formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, no qual foram testadas 909 drogas. Apesar da maioria dos compostos que tiveram atividade em amastigotas também apresentar atividade em promastigotas, o contrário não foi observado.

Segundo DENTOM et al. (2004), compostos antimoniais trivalentes são tóxicos tanto para as formas promastigotas e amastigotas, enquanto que os antimoniais pentavalentes, usados na terapia clínica, são tóxicos somente para as formas amastigotas de *Leishmania*. Segundo CARRIÓ et al. (2000) essas diferenças de comportamento tem sido atribuídas pela concentração ativa da droga dentro do fagolisossoma do macrófago contendo o parasito, metabolização da droga para a forma com maior atividade leishmanicida dentro do macrófago e pela susceptibilidade intrínseca diferente no estágio do parasito. Entretanto, tem sido demonstrado que promastigotas e amastigotas tem um nível de susceptibilidade similar quando estão em ambientes idênticos (CARRIÓ et al. 2000, apud BERMAN et al. 1989). A composição do meio pode modificar a suscetibilidade da droga em promastigotas (CARRIÓ et al. 2000). Parâmetros tais como densidade celular, taxa de crescimento e perfil de crescimento-resposta com possíveis alterações induzidas pela droga no meio de cultura podem influenciar os resultados obtidos na suscetibilidade dos testes baseados no crescimento dos promastigotas (CARRIÓ et

al. 2000, apud MOREIRA et al. 1995). Segundo CARRIÓ et al. (2000), a composição do meio de cultura pode influenciar a taxa de crescimento da cepa, bem como o efeito do crescimento em relação às drogas nas culturas. Além disso, a elevada taxa de multiplicação dos promastigotas pode resultar na alta metabolização da droga e a conseqüente redução da biodisponibilidade, ou também pode ser possível que alguns metabólitos no meio de cultura, como conseqüência da elevada taxa de multiplicação, modifique o efeito da droga em promastigotas (CARRIÓ et al. 2000).

Durante a transição através do ambiente extracelular e intracelular, *Leishmania* é exposta á alterações nas condições de vida como variações na disponibilidade e tipos de nutrientes, pH, temperatura, bem como na disponibilidade de oxigênio (BESTEIRO et al. 2007). A estratégia adotada pelos parasitos para sobreviver a essas alterações é o desenvolvimento de formas altamente adaptadas e especializadas. Essas formas de desenvolvimento são distinguidas pelo requerimento nutricional, taxa de crescimento e capacidade para se dividir, regulação de suas moléculas de superfície e também sua morfologia. Promastigotas metacíclicos são diferentes das formas procíclicas, pois são pré-adaptados para sobrevivência no hospedeiro mamífero, expressam moléculas de superfície específicas e se tornam resistentes ao complemento (BESTEIRO et al. 2007).

Muitos esforços têm sido feito para entender a biologia molecular e bioquímica de *Leishmania* (REBELLO et al. 2009). Neste sentido, várias moléculas do parasito têm sido caracterizadas, como as proteinases, o qual são enzimas importantes para o ciclo de vida do parasito, são abundantemente expressas por protozoários e tem sido associada com diversos processos patológicos. Cisteína proteinases pertencem a um dos quatro principais grupos de enzimas proteolíticas produzidas por uma variedade de organismos, incluindo *Leishmania* (REBELLO et al. 2009) . A partir da interação inicial entre o hospedeiro e o patógeno, ocorre uma dependência de moléculas associadas à superfície celular de ambos os organismos, caracterização de proteínas ligadas à superfície e glicoproteínas (JAIN et al. 2010). Os parasitos utilizam os macrófagos do hospedeiro para propagar a infecção, e a ligação entre ao parasito e a célula hospedeira é mediada por moléculas complementares no parasito e na superfície do hospedeiro. Dentre as moléculas do parasito envolvidas na ligação com o hospedeiro, as mais estudadas são a LPG e gp63 localizadas na superfície. As moléculas do hospedeiro mamífero envolvidas na ligação com o parasito incluem Fc, CR3, receptor manose-fucose, receptor Toll-like, CD11b e CD35

(JAIN et al. 2010). Entretanto, moléculas seletivamente com aumento da regulação em promastigotas metacíclicos poderiam estar associadas com alterações prévias ou durante a interação parasito-hospedeiro. Várias abordagens evidenciam uma proibitin expressa na superfície dos promastigotas. Presença de anticorpos anti-proibitin durante interação macrófago-*Leishmania in vitro* produz menos infecção (JAIN et al. 2010). Segundo Singh et al. 2008, moléculas de superfície e adesinas tem um papel importante no ciclo de vida dos parasitos de *Leishmania* e os ajudam a sobreviver no inseto vetor e no hospedeiro mamífero. Algumas adesinas e moléculas de superfície das espécies de *Leishmania* têm sido descritas como o lipofosfoglicano (LPG) e leishmanolisina (GP63, MSP e PSP). LPG e GP63 são predominantes no glicoconjugado da superfície celular dos promastigotas e em menor abundância em amastigotas intracelulares. LPG está envolvida na ligação de lectinas presentes no intestino médio do flebotomíneo, prevenindo a lise mediada pelo complemento em promastigotas, servindo como um ligante para a endocitose mediada por receptor do parasito pelo macrófago e inibindo a fusão fagossomo-endossomo. GP63 é uma metaloproteínase envolvida na infecção dos macrófagos por promastigotas e ajudam na sua sobrevivência intrafagolisossomal (SINGH et al. 2008). Para lidar com o ambiente ácido e escasso de nutrientes dentro dos macrófagos, os amastigotas alteram seus níveis de expressão de genes e modificam a atividade bioquímica e morfológica (DEY et al. 2010). As mudanças que ocorrem no metabolismo dos promastigotas e amastigotas levam para a expressão de um espectro de genes que poderiam ser alvos para controlar a patogênese da *Leishmania*. Enquanto promastigotas utilizam glicose como fonte primária de energia, amastigotas intracelulares dependem primariamente de aminoácidos e ácidos graxos como fonte de carbono. Além disso, a atividade mitocondrial aumentada possui um papel importante na sobrevivência dos amastigotas na célula hospedeira e a respiração ativa é importante na sobrevivência tanto das formas promastigotas como amastigotas de *Leishmania* (DEY et al. 2010).

Foi interessante verificar que em relação aos precursores e análogos de imidazolidinas não houve diferenças significativas de sensibilidade em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* visto que os CI_{50} dos compostos **2**, **3**, **4** e **9** nestas formas são muito próximos (tabela 4 e 5, respectivamente). Provavelmente, o mecanismo de ação desses compostos não depende diretamente da imunomodulação da célula hospedeira, sugerindo que os mesmos agem

diretamente no parasito (RIBEIRO, 2011).

Em relação à citotoxicidade em células de mamíferos, a grande maioria dos compostos apresentou baixa toxicidade em macrófagos peritoneais na concentração de 100 μM . O composto **18** foi o mais tóxico, inibindo 37% da viabilidade celular na concentração máxima testada de 100 μM (Figura 14). Entretanto, pode-se observar que todos os análogos de imidazolodinas e hexahidropirimidinas são menos tóxicos para células de mamíferos do que a anfotericina B que foi a droga de referência utilizada.

Os macrófagos, além de atuarem como célula hospedeira, também constituem a principal via imunológica para eliminação da *Leishmania*. Macrófagos ativados liberam uma variedade de moléculas citotóxicas, as quais incluem o NO, que tem se mostrado efetivo contra *Leishmania* (KRAM et al. 2008; MUKBEL et al. 2007). Em macrófagos, a produção de NO é catalisada pela óxido nítrico sintase, o qual é produzido pela ativação *in vitro* pelo IFN- γ ou TNF- α na presença do LPS (lipopolissacarídeo), ou pela combinação de ambas as citocinas (BALESTIERI et al. 2002). A produção de óxido nítrico (NO) possui um papel importante na sinalização celular e na sua função como molécula antileishmanial efetora. O NO é produzido a partir do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase na presença de cofatores como NADPH, FAD, FMN, Ca^{2+} /calmodulina e tetrahydrobioterina. A NO sintase constitui uma família de três isoformas, 2 constitutivas (nNOS/cNOS) e uma induzível (iNOS), as quais são expressas em diferentes células e tecidos e têm diferentes funções fisiológicas (GENESTRA et al. 2003). Entretanto, baixos níveis de NO têm sido correlacionado com a proliferação celular. Parasitos têm elaborado várias estratégias para escapar do sistema de defesa e obter vantagens dos fatores bioquímicos do hospedeiro. Infecção murina por *L. major* tem sido o modelo de estudo para estabelecer resistência ou susceptibilidade à infecção (GENESTRA et al. 2006; BOGDAN, 2008). Em macrófagos, a resposta Th1 (principalmente IFN- γ) induz a síntese de NO e a morte do parasito, enquanto citocinas Th2 (principalmente IL-4 e IL-10) inibe a síntese de NO e favorece o crescimento do parasito (GENESTRA et al. 2006). Estudos realizados por GENESTRA et al. (2006) mostraram que embora os macrófagos desencadeiam seu mecanismo de defesa para neutralizar o parasito, seus resultados apresentaram evidência em *L. amazonensis* que existe a via do NO e há uma correlação da produção de NO, faixa de infecção e sinalização envolvendo ambas vias do NO.

Assim, na tentativa de determinar um possível mecanismo de ação imunomodulatório do composto **14**, realizou-se a dosagem do NO (Figura 18). Entretanto, verificamos que o composto **14**, no qual ocorreu uma redução significativa do número de amastigotas intracelulares, não houve indução na produção de NO em relação ao controle, indicando que o mecanismo de ação desse composto não é via produção de NO. Outros mecanismos microbicidas podem estar envolvidos na morte dos parasitos tais como produção de espécies reativas do oxigênio, alterações ultraestruturais em organelas (mitocôndria e cinetoplastos), morte por apoptose ou por autofagia (RODRIGUES et al. 2008). Contudo, é necessária a realização de outros ensaios para determinar o possível mecanismo de ação desse composto. Recentemente, vários autores demonstraram que a ação leishmanicida de algumas drogas como os antimoniais, miltefosina, sitamaquina e paromomicina envolve participação do NO como um dos mecanismos envolvidos na morte do protozoário (GUPTA et al. 2011, KULSHRESTHA et al. 2011).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram testados 18 compostos heterocíclicos em *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis*, todas relacionadas às manifestações cutânea da doença. Dentre os compostos, nove eram análogos de imidazolidinas, incluindo dois precursores e nove de hexahidropirimidinas. Foi verificado que:

- 1- Confirmando as propriedades biológicas de compostos heterocíclicos, a grande maioria apresentou atividade em formas promastigotas de *Leishmania*, sendo que as imidazolidinas foram as mais ativas;
- 2- Em relação às imidazolidinas, o precursor (composto **2**), que possui um radical diamino, foi mais ativo que seus derivados; além disto teve atividade em formas promastigotas nas três espécies de *Leishmania* testadas (com CI_{50} inferior a 10 μM) e CI_{50} mais baixo (6,69 μM) em formas amastigotas de *L. amazonensis*;
- 3- Todos os compostos testados apresentaram baixa toxicidade para macrófagos peritoneais de camundongos; sendo que a anfotericina B reduziu em mais de 40% a viabilidade celular na concentração de 100 μM ;
- 4- Dentre os compostos selecionados para avaliação da atividade anti-amastigota, todos os análogos de imidazolidinas (**2**, **3**, **4**, **5** e **9**) tiveram ação, de maneira dose-dependente, nas formas intracelulares do parasito, reduzindo a carga global, o número de amastigotas por macrófagos infectados e o número de macrófagos infectados;
- 5- Entre as hexahidropirimidinas, apenas o composto **14** foi ativo nas formas intracelulares, reduzindo a carga global e o número de amastigotas por macrófagos infectados;
- 6- Foi possível observar diferenças de sensibilidades entre as espécies de *Leishmania* e entre as formas promastigotas e amastigotas.
- 7- Os resultados dos análogos de imidazolidinas sugerem que os compostos devem atuar diretamente sobre o parasito.
- 8- Em relação às hexahidropirimidinas, o composto **14** não aumentou os níveis da produção do NO, indicando que o mecanismo de ação não ocorre via produção de NO.

Estes resultados confirmam a atividade antiparasitária dos análogos de

imidazolidinas e hexahidropirimidinas em diferentes espécies de *Leishmania* e abrem perspectivas para delineamento de novos compostos biologicamente ativos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, J; BRYSON, K. 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v.99, p. 17-23.
- AMATO, V.S.; TUON, F.F.; BACHA, H.A.; NETO, V.A.; NICODEMO, A.C. 2008. Mucosal leishmaniasis Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica** 105: 1-9.
- AMATO, V.S.; TUON, F.F.; SIQUEIRA, A.M.; NICODEMO, A.C.; NETO, V.A. 2007. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 77 (2): pp. 266-274.
- AMEEN, M. 2010. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Cinical and Experimental Dermatology**, 35, 699-705.
- ASSCHE, T.M.; DESCHACHT, M.; LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Racial Biology & Medicine**, 51: 337-351.
- BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, 25 (2), 203-211.
- BALESTIERI, F.M.P.; QUEIROZ, A.R.P.; SCAVONE, C.; COSTA, V.M.A.; BARRAL-NETO, M.; ABRAHAMSOHN, I.A. 2002. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, 4, 23-29.
- BARRAL, A.; BADARÓ, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI, G. Jr., MOMEM, H.; CARVALHO, E.M. 1986. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 35: 732-734.
- BASSANO S.A. & CAMARGO L.M.A. 2004. American cutaneous leishmaniasis: history, epidemiology and prospects for control. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, Vol. 7, nº 3: 328-337.
- BERMAN, J.D.; EDWARDS, N.; KING, M.; GROGL, M. 1989. Biochemistry of pentostam resistant *Leishmania*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 40, 159-164.
- BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R.A.M.; COOMBS, G.H.; MOTTRAM, J.C. 2007. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal of Parasitology** 37 (10): 1063-1075.
- BOGDAN, C. 2008. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: Leishmaniasis as an example. **Cellular Microbiology** 10, 1221-1234.

CARRIÓ, J.; DE COLMENARES, M.; RIERA, C.; GA'LLEGO, M.; ARBOIX, M.; PORTU'S, M. 2000. *Leishmania infantum*: Stage-Specific Activity of Pentavalent Antimony Related with the Assay Conditions. **Experimental Parasitology**, **95**, 209-214.

CATERINA, M.C.; PERILLO, I.A.; BOIANI, L.; PEZAROGLO, H.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; SALERNO, A. 2008. Imidazolidines as new anti-Trypanosoma cruzi agents: Biological evaluation and structure–activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Volume 16**, Issue 5, 2226-2234.

COIMBRA, E.S.; ALMEIDA, C.G.; JÚNIOR, W.V.; DOS REIS, R.C.; DE ALMEIDA, A.C.; FOREZI, L.S.; DE ALMEIDA M.V.; LE HYARIC, M. 2008. Antileishmanial activity of aldonamides and N-acyl-diamine derivatives. **Scientific World Journal**, Jul **31;8**:752-6.

COIMBRA, E.S.; DE ALMEIDA, M.V.; JÚNIOR, C.O.; TAVEIRA, A.F.; DA COSTA, C.F.; DE ALMEIDA, A.C.; REIS, E.F.; DA SILVA, A.D. 2010. Synthesis and antileishmanial activity of lipidic amino alcohols. **Chemical Biology & Drug Design**, Feb, **75(2)**:233-5.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. 2006. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, Mar;**123(3)**: 399-410.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews Jan; 19 (1)**: 111-26.

CRUZ, A. K.; DE TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; UTHAIPIBULL, C. 2009. Current treatment and drug discovery against *Leishmania spp.* and *Plasmodium spp.*: a review. **Current Drug Targets**. v. **10**, p. 178-92.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy 22 (6)**, 491-502.

DE CARVALHO, G.S.G.; MACHADO, P.A.; DE PAULA, D.T.S.; COIMBRA, E.S.; SILVA, A.D. 2010. Synthesis, Cytotoxicity, and Antileishmanial Activity of N,N'-Disubstituted Ethylenediamine and Imidazolidine Derivatives Review **The Scientific World JOURNAL**, **10**, 1723-1730.

DENTON, H.; Mc.GREGOR, J.C.; COOMBS, G.H. 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. **Biochemical Journal 381**, 405-412.

DEY, R.; MENESES, C.; SALOTRA, P.; KAMHAWI, S.; NAKHASI, H.L.; DUNCAN, R. 2010. Characterization of a *Leishmania* Stage Specific Mitochondrial Membrane Protein that Enhances the Activity of Cytochrome C Oxidase and Its Role in Virulence. **Molecular Microbiology 77(2)**: 399-414.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. 2011. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutic Research**, **28 (11)**: 2758-2770.

FIDALGO, L.M.; ÁLVAREZ, A.M.M.; GEIGEL, L.F.; PINEIRO, R.P.; NAVARRO, M.S.; CABRERA, H.R. 2004. Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99(3)**:329-30.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. 2009. Pentavalent antimonials: New perspectives for Old drugs. **Molecules**, v: **14** p. 2317-2336.

GENESTRA, M.; GUEDES-SILVA, D.; SOUZA, W.J.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SOARES-BEZERRA, R.J.; MONTEIRO, F.P.; LEON, L.L. 2006. Nitric oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Archive Medical Research**, **37(3)**:328-333.

GENESTRA, M.; SOUZA, W. J. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L. LEON, L. L. 2003. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp. **Medical Microbiology Immunology**, v. **192**: p. 217-223.

GONTIJO, B.; CAMARGO, M.L.R. 2003. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. vol. **36** no.1 Uberaba Jan./Feb.

GOTO, H., LINDOSO, J.A. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti Infective Therapy** **8 (4)**, 419-433.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138.

GUERRA, J.A.O.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.A.R.C.; GAMA, P.; MOURA, A. AMATO, V.; BARBOSA, M.G.V.; FERREIRA, L.C.L. 2011. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases** **5 (3)**, e980.

GUPTA, R.; KUSHAWAHA, P.K.; SAMANT, M.; JAISWAL, A.K.; BAHARIA, R.K.; DUBE, A. 2011. Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** Nov 25. Epub ahead of print.

JAIN, J.; GHOSHAL, A.; MANDAL, C.; SHAHA, C. 2010. *Leishmania* cell surface prohibitin: role in host-parasite interaction. **Cellular Microbiology** **12 (4)**, 432-452.

KAYE, P.; SCOTT, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews/Microbiology Volume 9**: 604-615.

KRAM, D.; THÄLE, C.; KOLLODZIEJ, H. KIDERLEN, A.F. 2008. Intracellular parasite Kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-

leishmanial activity and macrophage activation. **Journal of Immunological Methods** **333**, 79-88.

KULSHRESTHA, A., SINGH, R.; KUMAR, D.; NEGI, N.S.; SALOTRA, P. 2011. Antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* are susceptible to paromomycin and sitamaquine. **Antimicrobial Agents Chemotherapy Jun;55(6)**: 2916-21.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1987. The leishmaniasis in biology and medicine. **Evolution, classification and geographical distribution, 1**: 1-20. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. Florida: Adademic.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1988. New world leishmaniasis – The Neotropical *Leishmania* species. In Topley & Wilson. **Microbiology and Microbial Infections, 9^a ed. London: Ed. Feg Cox.**

LINDOSO, J.A.; LINDOSO, A.A. 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. **São Paulo Institute of Tropical Medicine 51 (5)**: 247-253

MACHADO, P.R.; AMPUERO, J.; GUIMARÃES, L.H.; VILLASBOAS, L.; ROCHA, A.T.; SCHRIEFER, A.; SOUSA, R.S.; TALHARI, A.; PENNA, G.; CARVALHO, E.M. 2010. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **Plos Neglected Tropical Diseases 4(12)**: e912.

MALTEZOU, H.C. 2010. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology, volume 10**, article ID 617521, 8 pages.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. Diagnóstico Clínico e Diferencial. Atlas de Leishmaniose Tegumentar americana, **1 (1)**, 1-119.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana **2^a. Edição Atual, 1 (1)**, 1-140.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana **2^a. Edição**, 1-180.

MISHRA, B.B.; KALE, R.R.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. 2009. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia 80 (2)**, 81-90.

MISHRA, B.B.; SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; TRIPATHI, V.J.; TIWARI, V.K. 2009. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Mini Review in Medicinal Chemistry 9 (1)**, 107-123.

MOREIRA, E.S.A.; ARAÚJO SOARES, R.M.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L. 1995. Glucantime susceptibility of *Leishmania* promastigotes under variable growth conditions. **Parasitology Research 81**, 291-295.

MOSSMAN. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.

MOURA, T.R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARÊNCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; OLIVEIRA, C.I. 2005. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, p. 5827-5834.

MUKBEL, R.M.; JR, C.P.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D.E. 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene Apr**; **76 (4)**: 669-675.

MURRAY, H. W. et al. 2005. Advances in leishmaniasis. **Seminar**, v. **366**, p. 1561-77.

MUYLDER, G.; ANG, K.K.H.; CHEN, S.; ARKIN, M.R.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. 2011. A Screen against *Leishmania* Intracellular amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLOS Neglected Tropical Diseases 5 (7)**: e1253.

NAVARRETE-VAZQUEZ, G.; CHÁVEZ-SILVA, F.; ARGOTTE-RAMOS, R.; RODRÍGUEZ-GUTIÉRREZ, M.C.; CHAN-BACAB, M.J.; CEDILLO-RIVERA, R.; MOO-PUC, R.; HERNANDEZ-NUNEZ, E. 2011. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: A Comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **21**: 3168-3171.

NEUBER H. 2008. Leishmaniasis. **Journal of the German Society of Dermatology 6 (9)**, 754-765.

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. 2011. Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World. **Acta Tropica**, **118 (2)**: 87-96.

PARIS, C.; LOISEAU, P.; BORIES, C.; BRÉARD, J. 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. **48(3)**; p. 852-859.

RAETHER, W.; HANEL, H. 2003. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, **90**: S19-S39.

REBELLO, K.M.; BRITTO, C.; PEREIRA, B.A.S.; PITA-PEREIRA, D.; MORAES, M.O.; FERREIRA, A.B.R.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; OTTO, T.D.; CÔRTEZ, L.M.C.; DA-SILVA, G.G.; ALVES, C.R. 2010. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: Influence of successive in vitro cultivation on the expression of promastigote proteinases. **Experimental Parasitology 126**, 570-576.

REBELLO, K.M.; CÔRTEZ, L.M.C.; PEREIRA, B.A.S.; PASCARELLI, B.M.O.; CÔRTE-REAL, S.; FINKELSTEIN, L.C.; PINHO, R.T.; D'AVILA-LEVY, C.M.; ALVES,

C.R. 2009. Cysteine proteinases from promastigotes of *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasitology Research** **106**: 95-104.

REIS CORRALES, R.N.; PINHEIRO, L.S.; COIMBRA, E.S.; DA SILVA, A.D.; LE HYARIC, M. 2010. Synthesis and antileishmanial activity of lipophilic aromatic aminoalcohols. **Scientific World Journal**. Jun **14**;10:1067-72.

REITHINGER, R. Leishmaniasis Burden of Disease: Ways Forward for Getting from Speculation to Reality. 2008. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. **2**, no.10, p. 1-4.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Disease** **7** (9), 581-596.

RIBEIRO, G.A. 2011. **Avaliação das alterações celulares induzidas pela naftopterocarpanoquinona LQB-118 em *Leishmania amazonensis***. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

RODRIGUES, J.C.F.; SOUZA, W. 2008. Ultrastructural Alterations in Organelles of Parasitic Protozoa Induced by Different Classes of Metabolic Inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, **14**, 925-938.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; OPPERDOES, F.; STERN, S.; OLAFSON, R.W.; ZILBERSTEIN, D. 2008. Retooling *Leishmania* metabolism: from and fly gut to human macrophage. **The journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**, Vol. **22**: 590-602.

SAF'JANOVA, V.M. 1982. Classification the genus *Leishmania* Ross 1903. In: The Leishmaniasis. **Protozoology, part 7. Academy of Sciences.USSR. All Union Society of protozoologists: Leningrad. Chapter 11**, p 95-100.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.; MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G.; VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A.; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. 2008. Leishmaniasis treatment -- a challenge that remains: a review. **Parasitology Research** **103**: 1-10.

SEIFERT, K.; ESCOBAR, P., CROFT, S.L. 2010. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. **65**, p. 508-511.

SHAKYA, N.; SANE, S.A.; GUPTA, S. 2011. Antileishmanial efficacy of fluconazole and miltefosine in combination with an immunomodulator – picroliv. **Parasitology Research** **108**: 793-800.

SHAKYA, N.; SANE, S.A.; VISHWAKARMA, P.; BAJPAI, P.; GUPTA, S. 2011. Improved treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar) by using combination of Ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator – Picroliv. **Acta Tropica** **119**, 188-193.

SHARMA, V.; KHAN, M.S.Y. 2001. Synthesis of novel tetrahydroimidazole derivatives and studies for their biological properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **36**: 651-658.

SHUKLA, A.K.; SINGH, B.K.; PATRA, S.; DUBEY, V.K. 2010. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Applied Biochemistry and Biotechnology** **160 (8)**, 2208-2218.

SILVA, R. da; SACKS, D. L. 1987. Metacyclogenesis Is a Major Determinant of *Leishmania* Promastigote Virulence and Attenuation. **Infection and immunity**, **v.55**, **no.11**, p. 2802-2806, nov.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection Chemotherapy** **10 (6)**, 307-315.

SINGH, V.; SHING, D.D. 2008. *Leishmania major*: Genome analysis for identification of putative adhesion-like and other surface proteins. **Experimental Parasitology** **118**, 139-145.

SOTO, J.; ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEJA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J.D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H. 2004. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases** **38**: 1266-72.

SOUSA, A.Q.; FRUTUOSO, M.S.; Moraes, E.A.; PEARSON, R.D.; POMPEU, M.M. 2011. High-Dose Oral Fluconazole Therapy Effective for Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Vianna) braziliensis*. **Clinical Infectious Diseases** **53 (7)**: 693-695.

TEMPONE, A.G.; OLIVEIRA, C.M.; BERLINCK, R.G.S. 2011. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, **77 (6)**: 572-585.

VERMEERSCH, M.; LUZ, R.I.; TOTE, K.; TIMMERMANS, J.; COS, P.; MAES, L. 2009. In Vitro Susceptibilities of *Leishmania donovani* Promastigote and amastigote Stages to Antileishmanial Reference Drugs: Practical Relevance of Stage-Specific Differences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 3855-3859.

WALLACE, J.L. 2005. Nitric oxide as a regulator of inflammatory process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **volume100 (Suppl. I)**: 5-9.

WHO, 2011. **Leishmaniasis**: Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>; acessado em 16 de maio de 2011.

WHO. 2010. Technical Report Series, 949. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf; acessado em 16 de dezembro de 2011.

YARDLEY, V.; ORTUNO, N.; LIANOS-CUENTAS, A.; CHAPPUIS, F.; DONCKER, S.; RAMIREZ, L.; CROFT, S.; AREVALO, J.; ADAUI, V. BERMUDEZ, H.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. 2006. American Tegumentary Leishmaniasis: Is Antimonial Treatment Outcome Related to Parasite Drug Susceptibility? **The Journal of Infections Diseases**, **194**: 1168-1175.