

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Patrícia de Almeida Machado

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ANÁLOGOS DE ALCALÓIDES
MARINHOS E BIOISÓSTEROS DO RESVERATROL EM *Leishmania
amazonensis***

Juiz de Fora
2013

Patrícia de Almeida Machado

**Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e
bioisósteros do resveratrol em *Leishmania amazonensis***

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 Infecto-Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra
Co-orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora
2013

Machado, Patrícia de Almeida.

Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol em *Leishmania amazonensis* / Patrícia de Almeida Machado. -- 2013.

88 p.

Orientadora: Elaine Soares Coimbra

Coorientador: Adilson David Da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2013.

1. Leishmania. 2. Quimioterapia das leishmanioses. 3. Alcalóides marinhos. 4. Bioisósteros do resveratrol. 5. Complexos de ouro. I. Coimbra, Elaine Soares, orient. II. Da Silva, Adilson David, coorient. III. Título.

PATRÍCIA DE ALMEIDA MACHADO

Atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol em *Leishmania amazonensis*

Dissertação de Mestrado submetida à banca examinadora do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Ênfase em Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra
Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Rodrigo Pedro Pinto Soares
Fundação Oswaldo Cruz - BH

Prof^a. Dr^a. Priscila de Faria Pinto
Universidade Federal de Juiz de Fora

*Dedico este trabalho aos meus
pais, meus exemplos de vida e de
integridade moral.*

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, CNPq e UFJF pelo financiamento deste projeto.

À Prof^a. Elaine Soares Coimbra, pela oportunidade, amizade, paciência e orientação no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Adilson David da Silva pela co-orientação.

Ao Gustavo, Vinícius, Prof. Alexandre Cuim, Flaviane e Prof^a. Rossimiriam por terem cedido os compostos utilizados neste trabalho.

Às professoras do Departamento de Parasitologia, Clarice, Kézia e Florence pela convivência e pelos ensinamentos.

À Cristina, por ter me ajudado sempre de precisei e pelos primeiros ensinamentos no laboratório. À Ivone pela ajuda, conversas e momentos de descontração.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia, Lidiane, Ayla, Mariana, Samantha, Samara, Mariana, Dani, Luciana, Roberta, José Márcio, Valdenir, Fernanda, Deise, Mayara, Juliana, Elisa e Polyana pela convivência. Em especial agradeço à Dani pela amizade e companheirismo, e à todas as meninas da iniciação científica (Projeto *Leishmania*) pela ajuda durante esses dois anos.

À todo o pessoal do Laboratório de Imunologia, em especial à Flávia pela amizade e ajuda.

À Deus por ter iluminado meus caminhos, pois sem Ele eu não chegaria até aqui.

Aos meus pais José Roberto e Rita, por todo o carinho dedicado, pela ajuda para que eu pudesse cumprir mais essa etapa, pelo apoio e incentivo a seguir sempre em frente e pelas orações.

Ao Luiz Gustavo, por estar sempre ao meu lado, nos momentos de alegria e de tristeza, e por me ajudar e apoiar.

Às minhas avós Zica e Adélia pelas orações e ao meu avô Carlos e avó Tota, que se foram durante o período do mestrado, mas que mesmo distantes tenho certeza de que olharam por mim.

Agradeço também a todos os meus familiares e amigos que torceram e rezaram por mim.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol em *L. amazonensis*. Foram testados 12 análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas e 7 bioisósteros do resveratrol, sendo 4 complexados a ouro, em formas promastigotas de *L. amazonensis* e em macrófagos peritoneais. Em ambos os casos, a viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT. Os compostos que apresentaram significativa atividade antipromastigota e foram seletivos para o parasito, em comparação com a célula hospedeira, foram testados em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, cujo efeito dos compostos foi avaliado pela contagem das formas intracelulares. Além disso, foi coletado o sobrenadante para a dosagem de óxido nítrico (NO), através do método de Griess. A maioria dos compostos testados apresentou efeito antipromastigota, destacando os compostos **4** e **5** do grupo dos análogos de alcalóides marinhos, com CI_{50} de 1,07 e 1,09 μM , respectivamente. Em relação à série dos bioisósteros do resveratrol, destacam-se aqueles complexados a ouro, sendo o composto **17** o mais ativo (CI_{50} de 5,18 μM). Todos os compostos que foram testados em amastigotas apresentaram atividade, destacando-se, o composto **10** ($CI_{50} = 0,27 \mu M$), dentre os análogos de alcalóides marinhos, e o composto **19**, da série dos bioisósteros do resveratrol complexados a ouro ($CI_{50} = 5,77 \mu M$). A maioria dos análogos de alcalóides marinhos mostrou significativa toxicidade em macrófagos peritoneais, enquanto somente dois bioisósteros do resveratrol complexados a ouro foram tóxicos para a célula hospedeira. No entanto, todos os compostos testados em amastigotas apresentaram significativa seletividade pelo parasito em seu estágio intracelular. Com relação à especificidade das moléculas, os análogos marinhos foram específicos para amastigotas, sugerindo que o alvo desses compostos é exclusivo desse estágio, já a maioria dos bioisósteros do resveratrol complexados a ouro mostraram efeito semelhante em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, sugerindo alvos comuns desses compostos nos dois estágios do parasito. Nenhum dos compostos testados induziu significativa produção de NO por macrófagos infectados com *L. amazonensis*, sugerindo que essa molécula não está diretamente relacionada ao efeito antiparasitário. Em resumo, o trabalho mostrou que os compostos testados possuem significativo potencial leishmanicida e abrem perspectivas para estudos em modelos *in vivo*, bem como estudo do mecanismo de ação.

Palavras-chave: *Leishmania*, quimioterapia das leishmanioses, atividade leishmanicida, alcalóides marinhos, bioisósteros do resveratrol, complexos de ouro.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the leishmanicidal activity of marine alkaloid analogues and bioisosteres of resveratrol in *L. amazonensis*. We tested 12 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues and 7 bioisosteres of resveratrol, 4 complexed to gold, in promastigotes of *L. amazonensis* and in peritoneal macrophages. In both cases, the viability of the cells was checked using the MTT colorimetric method. Compounds with significant antipromastigote activity and selectivity by the parasite, when compared to the host cell, were tested on intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, which effect of the compounds was determined by counting the number of intracellular parasites. Supernatant was also collected for measure of the nitric oxide (NO), by the Griess method. Most compounds showed antipromastigote effect, especially compounds **4** and **5** of the marine alkaloid analogues, with IC₅₀ of 1.07 and 1.09 μM, respectively. Regarding the bioisosteres of resveratrol, the gold complex **17** was the most active (IC₅₀ of 5.18 μM). All compounds tested in amastigotes exhibited activity, including the compound **10** (IC₅₀ = 0.27 μM), among marine alkaloid analogues, and the compound **19**, among gold complexes with bioisosteres of resveratrol (IC₅₀ = 5.77 μM). Most marine alkaloid analogues showed significant toxicity in peritoneal macrophages, while only two bioisosteres of resveratrol complexed to gold were toxic to host cell. However, all compounds tested in amastigotes showed significant selectivity for intracellular parasite. Regarding the specificity of the molecules, marine analogues were specific to amastigote forms, suggesting that the target of these compounds is unique to this stage, while most of bioisosteres of resveratrol complexed to gold showed similar effect on promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis*, suggesting common targets of these compounds in both stages of the parasite. None of compounds induced significant NO production by *L. amazonensis*-infected macrophages, suggesting that this molecule is not directly related with the antiparasitic effect. In summary, the study showed that the compounds have significant potential leishmanicidal and encourages *in vivo* studies, as well as the action mechanism.

Keywords: *Leishmania*; chemotherapy of leishmaniasis; leishmanicidal activity; marine alkaloids; bioisosteres of resveratrol; gold complexes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxonomia da família Trypanosomatidae	15
Figura 2: (A) Promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i> . (B) Amastigotas de <i>Leishmania major</i> no interior de macrófagos	15
Figura 3: Ciclo de vida do parasito <i>Leishmania</i>	18
Figura 4: Casos de leishmaniose cutânea (LC) no Brasil entre 1980 e 2009	21
Figura 5: Estrutura química das principais drogas usadas para o tratamento das leishmanioses.....	24
Figura 6: Estrutura química da Viscosalina (A) e do Theonelladin C (B), exemplos de alcalóides marinhos bioativos	31
Figura 7: Estrutura química do resveratrol	33
Figura 8: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com os análogos de alcalóides marinhos 3-alquilpiridinas	46
Figura 9: Efeito dos compostos 7 , 10 , 11 e 12 sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 72 horas de tratamento.....	49
Figura 10: Fotomicrografia ilustrativa do efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquilpiridinas sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , após 72 horas de tratamento com 10 μ M de cada composto	51
Figura 11: Comparação da atividade leishmanicida dos compostos 7 , 10 , 11 e 12 entre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	52
Figura 12: Avaliação dos níveis de NO produzido por macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com os compostos 7 , 10 , 11 e 12 , na concentração de 10 μ M	53
Figura 13: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com os bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos.....	56
Figura 14: Efeito dos compostos 16 , 17 , 18 e 19 sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 72 horas de tratamento.....	59
Figura 15: Fotomicrografia ilustrativa do efeito dos bioisósteros do resveratrol complexados com ouro sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> , após 72 horas de tratamento	60
Figura 16: Comparação da atividade leishmanicida dos compostos 16 , 17 , 18 e 19 entre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	61
Figura 17: Avaliação dos níveis de NO produzido por macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com os compostos 16 , 17 , 18 e 19	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estrutura química e nome químico dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas	35
Continuação Tabela 1: Estrutura química e nome químico dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas	36
Tabela 2: Estrutura química e nome químico dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos.....	37
Tabela 3: Efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	45
Tabela 4: Efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas sobre macrófagos peritoneais e índice de seletividade (InSe) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	47
Tabela 5: Efeito dos compostos 7, 10, 11 e 12 sobre amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade (InSe) em amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	48
Tabela 6: Índice de especificidade (InEs) dos compostos 7, 10, 11 e 12	52
Tabela 7: Efeito dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	55
Tabela 8: Efeito bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos sobre macrófagos peritoneais e índice de seletividade (InSe) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	57
Tabela 9: Efeito dos bioisósteros do resveratrol complexados com ouro sobre amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e índice de seletividade (InSe) em formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	58
Tabela 10: Índice de especificidade (InEs) dos bioisósteros do resveratrol complexados com átomos de ouro.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i> (Infusão de coração e cérebro)
Ca ²⁺	Cálcio
CC ₅₀	Concentração que mata 50% das células
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento do parasito
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DTN	Doença Tropical Negligenciada
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FNM	Mononucleotídeo de flavina
HCl	Ácido clorídrico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IFN- α/β	Interferon- α/β
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-12	Interleucina-12
IL-13	Interleucina-13
InEs	Índice de Especificidade
InIn	Índice de Infecção
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
InSe	Índice de Seletividade
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LV	Leishmaniose visceral
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato
NK	Célula natural killer
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NO ₂ ⁻	Nitrito
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (solução salina tampão fosfato)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
Rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (Meio de cultura)
Sb ³⁺	Antimônio trivalente

Sb ⁵⁺	Antimônio pentavalente
SBF	Soro bovino fetal
Th1	Célula T helper 1
Th2	Célula T helper 2
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TR	Tripanotona redutase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O PARASITO <i>LEISHMANIA</i>	14
1.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA (LC)	20
1.3 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	23
1.4 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS E RESVERATROL	29
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 DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	38
3.3 MANUTENÇÃO DA INFECTIVIDADE DA CEPA DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	38
3.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	38
3.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C	39
3.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS COMPOSTOS EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	40
3.7 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE E DO ÍNDICE DE ESPECIFICIDADE DOS COMPOSTOS	41
3.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE NO PRODUZIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM <i>L. AMAZONENSIS</i>	41
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	42
3.10 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	43
4 RESULTADOS	44
4.1 COMPOSTOS SINTÉTICOS ANÁLOGOS DE ALCALÓIDES MARINHOS 3-ALQUIL PIRIDINAS	44
4.2 COMPOSTOS SINTÉTICOS BIOISÓTEROS DO RESVERATROL E SEUS COMPLEXOS METÁLICOS	54
5 DISCUSSÃO	63
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
ANEXO	88

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) englobam um grupo de doenças crônicas, que causam considerável morbidade e mortalidade entre as populações mais pobres do mundo (HOTEZ et al., 2007; NORMAN et al., 2010; UTZINGER et al., 2012). Essas doenças se concentram em países com baixos índices de desenvolvimento humano e são consideradas negligenciadas devido à inexistência de políticas efetivas para controlá-las e aos baixos investimentos no desenvolvimento de novas drogas e vacinas para combatê-las (LINDOSO e LINDOSO, 2009). As leishmanioses são uma das DTNs devido aos limitados recursos investidos em seu diagnóstico, tratamento e controle (WHO, 2013).

Leishmanioses é o nome designado a um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011; DORLO et al., 2012) e transmitidas ao homem através da picada de insetos vetores genericamente denominados flebotomíneos (SHUKLA et al. 2010; DORLO et al., 2012). Esses insetos pertencem à ordem Diptera, à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae (SHUKLA et al. 2010), sendo que dois gêneros de flebotomíneos podem transmitir a doença para humanos: *Phlebotomus* no “Velho Mundo” e *Lutzomyia* no “Novo Mundo” (WENIGER et al., 2001; SANTOS et al., 2008; HORTA et al., 2012).

Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem (PILLAI et al., 2012), sendo que a espécie envolvida, assim como a resposta imune do hospedeiro, são fatores determinantes das manifestações clínicas da doença. Tais manifestações podem ser divididas em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV) (MURRAY et al. 2005; MCCONVILLE e NADERER, 2011).

O impacto das leishmanioses na saúde pública é evidente considerando a rápida expansão de zonas endêmicas nos anos recentes. Atualmente, encontra-se distribuída em 98 países, mais de 350 milhões de pessoas estão em áreas de risco de contrair a doença e 2 milhões de novos casos surgem todo ano (WHO, 2010; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011). Além disto, possui um índice de mortalidade anual maior do que 60.000, o qual, dentre as doenças parasitárias, só é

ultrapassado pela malária (WHO, 2010; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011; MCCALL et al., 2012).

As leishmanioses possuem ampla distribuição mundial, com focos de infecção distribuídos no “Novo Mundo” (América Central e América do Sul) e no “Velho Mundo” (sul da Europa, norte e leste da África, Oriente Médio e Índia) (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão e mais de 90% dos casos da forma cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, Iran, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru (WHO, 2010). No Brasil, a média de casos de LV no período de 2005 a 2009, foi de 3.679 casos/ano, com uma taxa de letalidade de 5,8% em 2009. Quanto à LC, no período de 2000 a 2009, foi registrada no Brasil uma média de 24.684 casos/ano (PELLISSARI et al., 2011).

Estudos epidemiológicos demonstram que nas duas últimas décadas o número de casos de leishmanioses aumentou devido principalmente à ampliação de áreas endêmicas. Tal fato se deve a fatores como crescimento de centros urbanos, desmatamento e aquecimento global, que conjuntamente, alteram os hábitos do inseto vetor, e estes, expandem seu nicho ecológico, o que contribui para a urbanização da doença e abre novos focos endêmicos (CRUZ *et al.*, 2009). Além disto, tem sido reportado que a coinfeção do vírus da imunodeficiência humana (HIV) com as leishmanioses também constitui um fator que está contribuindo para o aumento das áreas endêmicas ao redor do mundo (RUSSO et al., 2003; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2011).

1.1 O parasito *Leishmania*

Parasitas do gênero *Leishmania* pertencem à ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae e as espécies atualmente conhecidas como capazes de infectar o homem são agrupadas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Figura 1). Essa classificação foi baseada na localização do parasito no intestino do flebotomíneo (LAINSON e SHAW, 1987; BATES, 2007; ASSIS et al., 2012). Esses parasitos mantêm seu ciclo de vida através da transmissão entre um inseto vetor e um hospedeiro mamífero e caracterizam-se por apresentar duas formas evolutivas: amastigotas em hospedeiros vertebrados e promastigotas nos insetos vetores (KAYE e SCOTT, 2011; CHAVALI et al., 2012).

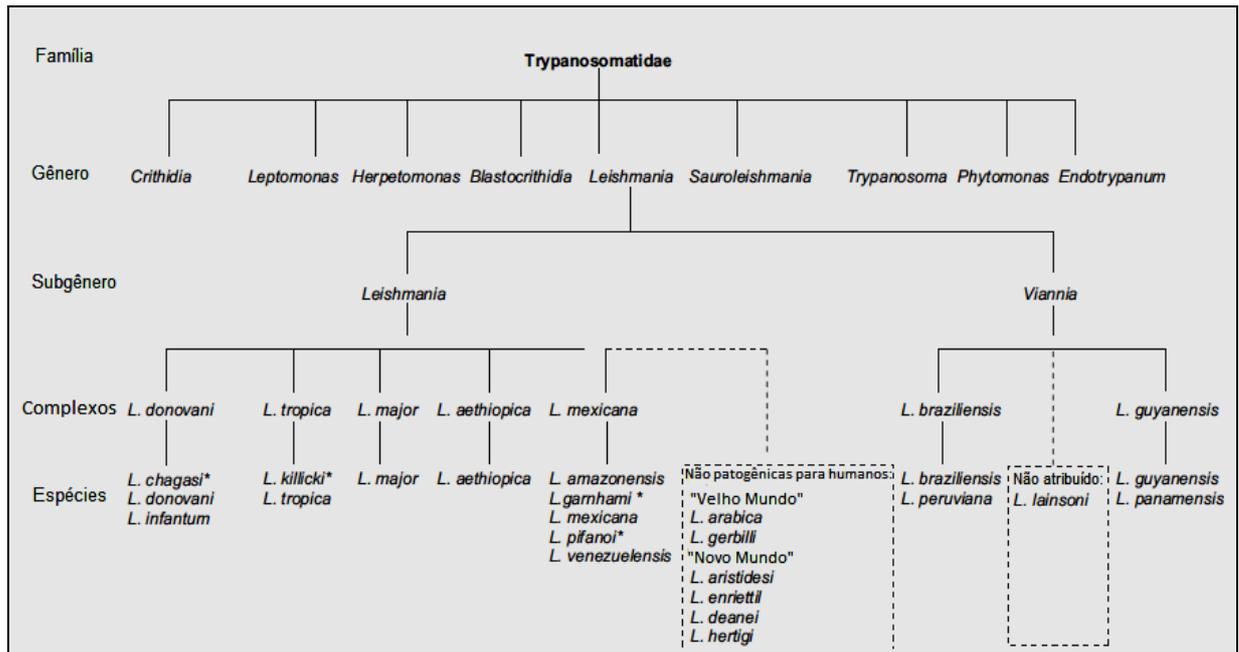


Figura 1: Taxonomia da família Trypanosomatidae. *Status das espécies está em discussão. **L. chagasi* no "Novo Mundo" é a mesma espécie que *L. infantum*. Fonte: WHO, 2010 (adaptado).

As formas promastigotas (Figura 2A) são alongadas, móveis, flageladas e extracelulares, sendo encontradas no trato digestivo do inseto vetor, onde passam por uma série de modificações bioquímicas até tornarem-se infectantes (promastigotas metacíclicas). Essas serão transmitidas ao hospedeiro mamífero durante a picada do inseto. As formas amastigotas (Figura 2B) são ovais, não possuem flagelo externalizado e vivem como parasitos intracelulares obrigatórios em uma variedade de células de mamíferos, mais notavelmente dentro de fagócitos profissionais, como os macrófagos (KAYE e SCOTT, 2011).

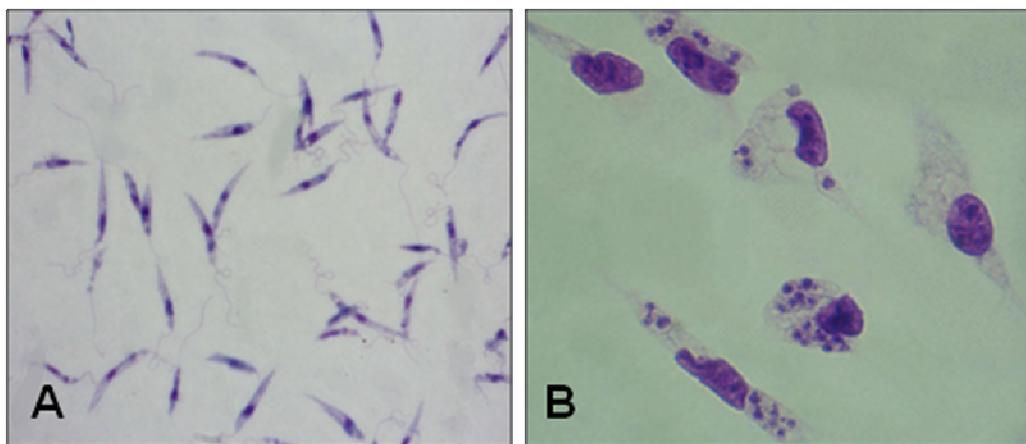


Figura 2: (A) Promastigotas de *Leishmania braziliensis*. (B) Amastigotas de *Leishmania major* no interior de macrófagos. Aumento de 1000X. Fonte: Do autor.

No hospedeiro vertebrado, o ciclo de vida dos parasitos *Leishmania* (Figura 3) começa quando o inseto vetor se alimenta de sangue e, durante esse processo, regurgita promastigotas metacíclicos na pele do hospedeiro mamífero (BEATTIE e KAYE, 2011). Esses promastigotas são fagocitados por uma variedade de células hospedeiras, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, contudo é amplamente aceito que os macrófagos são as principais células infectadas por *Leishmania* (MCCONVILLE e NADERER, 2011).

Inicialmente, a maioria dos promastigotas metacíclicos injetados na pele são rapidamente fagocitados por neutrófilos, porém, no interior dessas células os promastigotas conseguem sobreviver e não se diferenciam em amastigotas (BEATTIE e KAYE, 2011). Acredita-se que os neutrófilos, após fagocitarem os parasitos, entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos, permitindo que o parasito entre em tais células sem induzir os mecanismos de defesa das mesmas (KAYE e SCOTT, 2011).

Entretanto, os macrófagos também fagocitam promastigotas livres, sendo que este parasito interage com uma variedade de receptores presentes na membrana desta célula. Após a internalização, o fagossomo recém-formado sofre amadurecimento como resultado de eventos de fusão com endossomos e lisossomos (MCCONVILLE e NADERER, 2011; ASSIS et al., 2012) resultando na formação de um vacúolo parasitóforo acidificado e com marcadores de fagolisossomo maduro (MCCONVILLE e NADERER, 2011). Dentro deste compartimento acidificado os parasitos conseguem se diferenciar em amastigotas (VAN ASSCHE et al., 2011), sendo que o pH ácido e a mudança de temperatura do inseto vetor para o hospedeiro vertebrado são fatores determinantes para esse processo de diferenciação (BARAK et al., 2005; BEATTIE e KAYE, 2011; CHOW et al., 2011). O vacúolo parasitóforo maduro ainda continua se fundindo com endossomos tardios, fagossomos e autofagolisossomos e também pode se fundir ou receber tráfego vesicular do retículo endoplasmático. Portanto o vacúolo parasitóforo contendo *Leishmania* é uma organela altamente dinâmica que recebe continuamente conteúdo de uma variedade de organelas. Além disso, muitos estudos têm mostrado que os vacúolos parasitóforos que abrigam *Leishmania* são compartimentos nutricionalmente complexos que contém uma série de fontes de carbono e nutrientes essenciais. Assim, apesar desses parasitos possuírem uma limitada capacidade de sintetizar *de novo* uma ampla variedade de aminoácidos,

purinas, vitaminas, lipídeos e outros metabólitos, suas necessidades essenciais são supridas pela presença de nutrientes dentro de seus vacúolos parasitóforos (MCCONVILLE e NADERER, 2011).

Dentro do vacúolo parasitóforo, os amastigotas se replicam e após algum tempo, a célula hospedeira se rompe liberando esses amastigotas, que infectam outras células. No caso de espécies dermatrópicas os amastigotas se restringem à derme, porém quando se tratar de espécies visceralizantes, os amastigotas se disseminam invadindo órgãos como baço, fígado e medula óssea (BEATTIE e KAYE, 2011). O ciclo se completa quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante seu processo de alimentação. No trato digestório do inseto, os macrófagos se rompem liberando os amastigotas, que se convertem em promastigotas procíclicos. Esses se replicam, sofrem mudanças bioquímicas, se tornam infectivos, passando a serem denominados metacíclicos, e migram para a porção anterior do tubo digestivo do inseto, para serem novamente transmitidos ao hospedeiro vertebrado (KAYE e SCOTT, 2011).

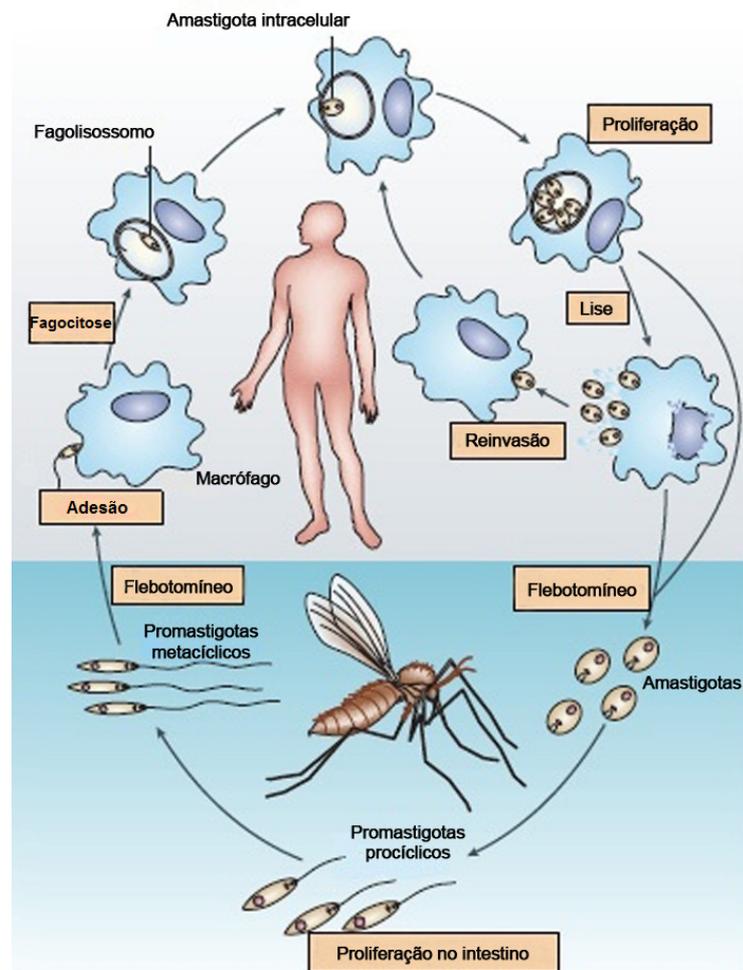


Figura 3: Ciclo de vida do parasito *Leishmania*. Fonte: CHAPPUIS et al., 2007 (adaptado).

A permanência e a sobrevivência dos parasitos no intestino do inseto são garantidas por moléculas contendo fosfoglicanos que são liberadas pelos promastigotas ou expressas em sua superfície (MOUGNEAU, BIHL e GLAICHENHAUS, 2011). Por exemplo, estudos usando parasitos deficientes em lipofosfoglicano (LPG) de superfície, mostraram que essa molécula medeia a fixação do promastigota ao epitélio do intestino, prevenindo a perda do parasito durante a excreção do alimento digerido (SACKS, 2001; MOUGNEAU, BIHL e GLAICHENHAUS, 2011). Já foram inclusive identificados, no intestino de flebotomíneos, receptores de LPG, podendo ser citado, como exemplo, o trabalho de Kamhawi e colaboradores (2004), onde um conjunto de galectinas que são expressas no intestino do vetor *Phlebotomus papatasi* são usadas por *L. major* como

receptores de ligação específica ao intestino do inseto (MOUGNEAU, BIHL e GLAICHENHAUS, 2011).

A persistência do parasito dentro do macrófago é determinada por um balanço entre a habilidade de ativação dos macrófagos infectados versus a habilidade do parasito de resistir aos mecanismos citotóxicos da ativação dos mesmos (MUKBEL et al., 2007). Em modelos de leishmaniose experimental, a diferenciação de células T CD4⁺ naive em células T helper (Th) 2, que secretam interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, permite a replicação e disseminação dos parasitos para outros macrófagos. Em contraste, a diferenciação de células T CD4⁺ naive em células Th1, secretoras de interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), contribui eficientemente para a eliminação do parasito, principalmente pelo aumento da habilidade dos macrófagos destruírem os protozoários, através da indução da produção de espécies reativas do nitrogênio e do oxigênio (MOUGNEAU, BIHL e GLAICHENHAUS, 2011; HORTA et al., 2012).

O óxido nítrico (NO), uma das espécies reativas do nitrogênio, é um importante mediador da atividade antimicrobiana de macrófagos e, na leishmaniose murina, exerce um papel importante na morte dos parasitos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (GENESTRA et al., 2003). A elevada toxicidade do NO é atribuída à sua reatividade com o oxigênio e com intermediários reativos do oxigênio, rendendo numerosas espécies tóxicas (RIVERO, 2006). Este radical livre é produzido a partir do amino ácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (GENESTRA et al., 2003; POULOS e LI, 2012), na presença de co-fatores como dinucleotídeo de nicotinamida adenina fosfato (NADPH), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetrahydrobiopterina (GENESTRA et al., 2006). As NO sintases constituem uma família de três distintas isoformas, duas constitutivas, NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), e uma induzível (iNOS) (GENESTRA et al., 2003). As nNOS e eNOS são constitutivamente expressas em células como proteínas pré-formadas, que são ativadas em resposta a estímulos específicos da célula, através do aumento das concentrações de cálcio (Ca²⁺) intracelular e da ligação do Ca²⁺ à calmodulina. Essas isoformas produzem baixos montantes de NO, como parte de uma resposta fisiológica normal. Em contraste, a iNOS é independente de Ca²⁺, não é uma enzima constitutiva e é expressa em resposta a citocinas pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α e IL-1 β , e/ou estímulos microbianos (DIEFENBACH et al., 1998; DIEFENBACH et al., 1999; IBIZA

e SERRADOR, 2008), sendo que esta isoforma produz de 100 a 1000 vezes mais NO do que as enzimas constitutivas (RIVERO, 2006).

Em modelo experimental de infecção por *L. major*, pequenas quantidades de NO derivado da iNOS, gerado por macrófagos ativados, ativa células natural killer (NK) a responderem a IL-12 e IFN- α/β , os quais as permitem tornarem-se citotóxicas e liberarem IFN- γ , controlando então a disseminação do parasito. Portanto, o NO não é apenas uma molécula com atividade microbicida na defesa contra patógenos, mas também participa do desenvolvimento de uma resposta imune inata contra o parasito (IBIZA e SERRADOR, 2008).

1.2 Leishmaniose Cutânea (LC)

A LC engloba um conjunto de enfermidades que acometem a pele e/ou mucosas do homem e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos, em regiões tropicais e subtropicais do “Velho e Novo Mundo” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A LC é também designada como leishmaniose tegumentar, terminologia proposta em 1925 à Sociedade Francesa de Dermatologia, sendo esta a primeira contribuição de pesquisadores brasileiros ao estudo desta doença (OLIVEIRA e BRODSKYN, 2012).

É uma doença que acompanha o homem desde a antiguidade, existindo relatos e descrições encontrados na literatura desde o século I d.C (LAINSON, 1997; CAMARGO e BARCINSKI, 2003, BASANO E CAMARGO, 2004). Nas Américas, foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., que apresentavam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose mucocutânea (BASANO E CAMARGO, 2004). Entretanto, com relação à observação da doença na pele pela primeira vez no Brasil há divergências. De acordo com o Gontijo e Carvalho (2003) e Basano e Camargo (2004), Alexandre Cerqueira em 1855, foi o primeiro a observar a existência da moléstia na pele, porém no Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana do Ministério da Saúde (2006) tal papel é atribuído à Moreira no ano de 1895. Contudo, a presença dos parasitos em lesões cutâneas e nasofaríngeas, só foi confirmada pela primeira vez no Brasil, em 1909 por Lindenbergh, que encontrou formas idênticas à *L. tropica*, espécie responsável por uma das formas da doença no “Velho Mundo”, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas no interior do Estado de

São Paulo. Gaspar de Oliveira Vianna, por considerar o parasito encontrado diferente de *L. tropica*, batizou-o de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcer de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir”. No Brasil, até a década de setenta, todos os casos de LC eram atribuídos à *L. braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas (BASANO E CAMARGO, 2004).

No Brasil, no período de 1988 a 2009, a LC apresentou um coeficiente médio de detecção de 16 casos por 100 mil habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência ao crescimento da endemia, registrando os coeficientes mais elevados nos anos de 1994 e 1995, quando atingiram níveis de 22,83 e 22,94 casos por 100 mil habitantes, respectivamente (Figura 4). Observa-se ainda expansão geográfica, visto que, no início dos anos 80, foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003, todos os estados apresentaram autoctonia da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

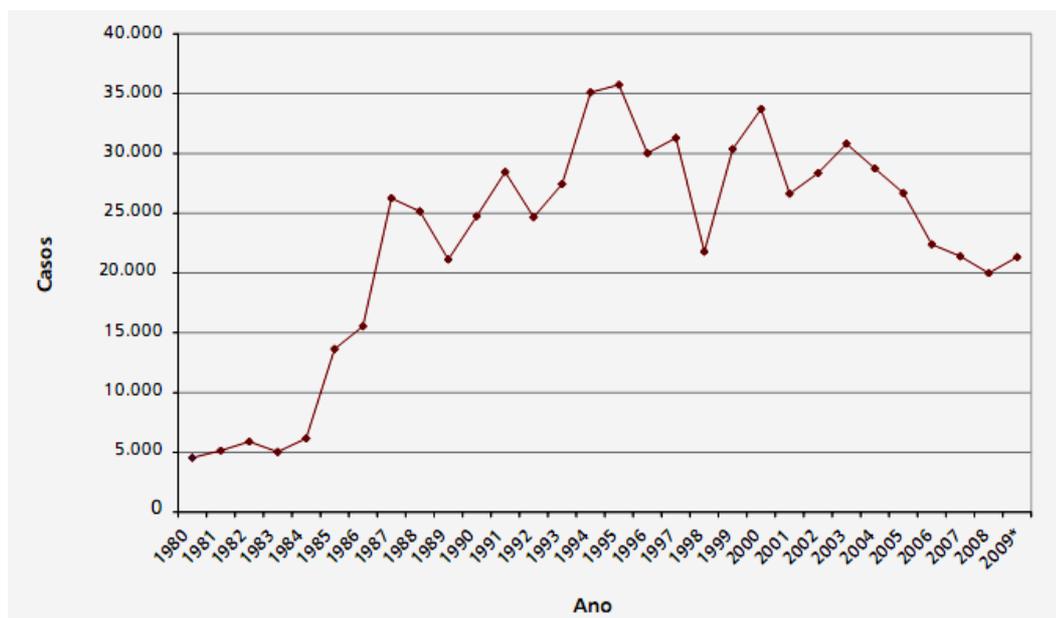


Figura 4: Casos de leishmaniose cutânea (LC) no Brasil entre 1980 e 2009. Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011 (adaptado).

A LC pode se apresentar sob as seguintes formas clínicas: leishmaniose cutânea localizada (LCL), podendo apresentar disseminação ou não, cutânea difusa (LCD) e mucocutânea (LMC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; REITHINGER et al., 2007).

A LCL usualmente afeta partes descobertas do corpo, que são facilmente picadas pelo inseto vetor, incluindo a face, pescoço e braços (CHOI e LERNER, 2001). Uma lesão clássica começa com um nódulo ou pápula no local da inoculação das formas promastigotas. Essa lesão cresce lentamente, levando no mínimo uma semana para alcançar seu tamanho final (WHO, 2010). As lesões são freqüentemente ulceradas, de fundo granuloso e base eritematosa, podendo ser única ou múltipla, dependendo do número de picadas infectantes do inseto vetor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). No “Novo Mundo”, a LCL é causada por múltiplas espécies pertencentes ao subgênero *Leishmania*, como *L. mexicana* e *L. amazonensis* e *Viannia*, como *L. braziliensis* (BAILEY e LOCKWOOD, 2007; WHO, 2010), *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. peruviana*, sendo que também pode ser causada por *L. chagasi/L.infantum*, o que é freqüentemente atípico e reportado principalmente na América Central (WHO, 2010).

A partir da LCL, pode haver disseminação parasitária pelas vias hematogênica ou linfática. Nesse caso, as lesões cutâneas são pequenas, ulceradas, numerosas (de 20 a 100 lesões) e podem aparecer em áreas próximas e até mesmo distantes do local da picada do inseto (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). As respostas celular e humoral aos antígenos de *Leishmania* permanecem intactas e essa forma de LC tem sido descrita em associação com *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* (WHO, 2010).

A LCD é uma variação da LC na qual as lesões são disseminadas e caracterizadas como nódulos não ulcerados cheios de parasitos. A doença usualmente começa com uma lesão primária inicial e então dissemina, por via linfática ou hematogênica, para envolver outras áreas da pele (CHOI e LERNER, 2001). Os pacientes exibem uma anergia específica aos antígenos de *Leishmania*, enquanto a proliferação e a resposta dos linfócitos a outros patógenos intracelulares permanecem normais (DAVID e CRAFT, 2009). No “Novo Mundo” tem sido descrita associada com *L. mexicana* e *L. amazonensis* (WHO, 2010).

Uma das formas mais graves da LC é a LMC, que é mais comumente encontrada no “Novo Mundo”, onde o seu principal agente etiológico é a *L. braziliensis*, apesar de que diversas evidências têm mostrado ocorrência da doença mucocutânea associada à *L. panamensis* (CHOI e LERNER, 2001). Dentre a população de indivíduos infectados, 1 a 10% dos pacientes desenvolvem a forma mucosa (WEIGLE e SARAIVA, 1996; BLUM et al., 2004; MACHADO-COELHO et al.,

2005; KONECNY e STARK, 2007; DAVID e CRAFT, 2009). A principal característica das espécies de *Leishmania* que causam a LMC é a capacidade de causar metástases em mucosas e no trato respiratório superior, por disseminação linfática ou hematogênica (WHO, 2010). A doença começa com eritema e ulceração das narinas e pode evoluir para perfuração do septo nasal, ulceração do palato e edema gengival, sendo que eventualmente pode haver destruição progressiva da mucosa oronasofaríngea, de cartilagens faciais e de estruturas das vias aéreas superiores, resultando em completa desfiguração (DAVID e CRAFT, 2009).

Neste trabalho, foi utilizada a *L. amazonensis*, considerada como de grande importância clínica pela variedade de manifestações a ela atribuída. Esta espécie tem sido encontrada em diversas regiões do Brasil associada à várias formas clínicas da LC, as quais vão desde a forma mais simples, que é a LCL, a manifestações como LCD (CARVALHO et al., 2012; OLIVEIRA e BRODSKYN, 2012) e LCM, sendo neste último caso, mais rara (OLIVEIRA e BRODSKYN, 2012). Sua presença está associada a florestas úmidas da Bacia Amazônica, nos estados de Rondônia, Pará, Amazonas, e Maranhão (BASANO e CAMARGO, 2004; FORTÉA et al., 2007). Ainda pode ser encontrada em outros estados brasileiros, como Bahia, Minas Gerais e Goiás e em outros países do continente Americano, como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa (BASANO e CAMARGO, 2004). A perpetuação de *L. amazonensis* no ecossistema natural é feita pelos vetores *Lutzomyia flaviscutellata* e *Lu. olmeca* e por diversos hospedeiros silvestres, principalmente o roedor *Proechymis* spp. (FORTÉA et al., 2007; OLIVEIRA e BRODSKYN, 2012).

1.3 Tratamento das Leishmanioses

O tratamento clássico das leishmanioses requer a administração de drogas tóxicas e pouco toleradas (TIUMAN et al., 2011; CHAVALI et al., 2012). Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para tratar tanto a LC e sua variedade de manifestações clínicas, quanto a LV, sendo que esta terapia já foi implantada há cerca de 60 anos atrás (CROFT e OLLIARO, 2011; DEN BOER et al., 2011). Outras drogas também têm sido empregadas no tratamento das leishmanioses, entre as quais se destacam a anfotericina B, pentamidina, miltefosina e paromomicina (RATH et al., 2003). A seguir serão abordados alguns detalhes

sobre cada um desses compostos citados acima e na Figura 5 consta a estrutura química dos mesmos.

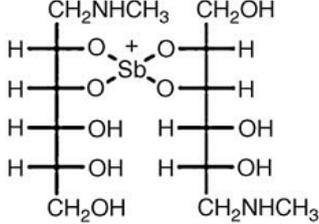
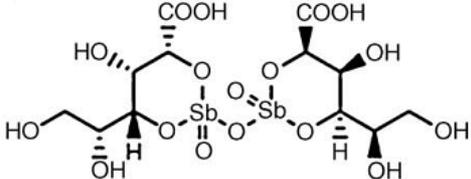
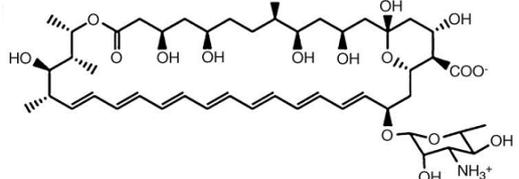
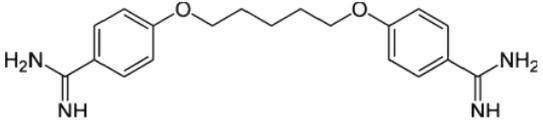
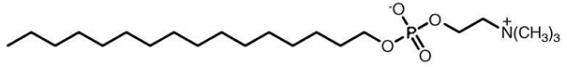
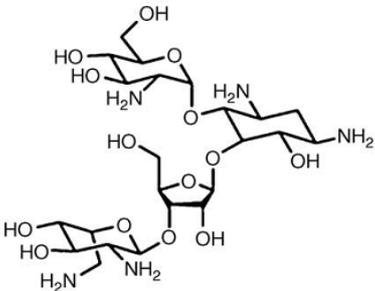
Nome	Estrutura
<p style="text-align: center;">Antimoniato de Meglumina (Glucantime®)</p>	
<p style="text-align: center;">Estibogluconato de sódio (Pentostam®)</p>	
<p style="text-align: center;">Anfotericina B</p>	
<p style="text-align: center;">Pentamidina</p>	
<p style="text-align: center;">Hexadecilfosfocolina (Miltefosina)</p>	
<p style="text-align: center;">Paromomicina</p>	

Figura 5: Estrutura química das principais drogas usadas para o tratamento das leishmanioses. Fonte: NAVARRO et al., 2010 (adaptado).

O uso medicinal de compostos de antimônio, para diversos fins terapêuticos, já é conhecido há séculos antes da era cristã, porém, somente em 1912, Gaspar de

Oliveira Vianna observou que o antimônio trivalente (Sb^{+3}) ou tártaro emético era eficaz na terapêutica da LC. Três anos mais tarde, na Itália, também foi comprovada sua eficácia no tratamento da LV (RATH et al., 2003). Contudo, este medicamento, por possuir uma série de efeitos tóxicos e indesejáveis, como tosse, dor no peito e depressão (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004), foi substituído por compostos de antimônio pentavalente (Sb^{+5}), que apesar de também possuírem muitos efeitos colaterais, são 10 vezes menos tóxicos para células de mamíferos do que compostos a base de Sb^{+3} (RATH et al., 2003). Então, em 1920 Bramachari desenvolveu o primeiro composto a base de Sb^{+5} , o uréia estibamina (RATH et al., 2003), que emergiu como uma terapia efetiva contra a LV na Índia (HALDAR, SEN e ROY, 2011). O desenvolvimento de compostos menos tóxicos levou à síntese do gluconato de antimônio sódico (Solustibosan) em 1937 (KIKUTH e SCHMIDT, 1937) e do estibogluconato de sódio (Pentostam®) em 1945 (GOODWIN, 1995). Durante a Segunda Guerra Mundial, surgiu na França um medicamento alternativo, o antimoniato de meglumina (ou antimoniato de N-metil glucamina), comercializado como Glucantime® (RATH et al., 2003). Atualmente os antimoniais pentavalentes estão disponíveis em duas diferentes formulações, Glucantime® e Pentostam®, sendo que somente o primeiro é comercializado no Brasil (GOTO e LINDOSO, 2010).

Apesar de já serem usados há décadas para o tratamento das leishmanioses, os mecanismos celulares e moleculares de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foram completamente elucidados. Não se sabe se a forma ativa é o Sb^{+3} ou o Sb^{+5} , portanto são propostos três principais modelos com relação ao mecanismo de ação dos antimoniais: modelo de pró-droga, modelo de atividade leishmanicida intrínseca e o modelo de ativação do sistema imune do hospedeiro (HALDAR, SEN e ROY, 2011).

O primeiro modelo defende a idéia de que compostos a base de Sb^{+5} funcionam como pró-droga, em que o Sb^{+5} sofre redução biológica a uma forma mais ativa contra o parasito e também mais tóxica ao hospedeiro, o Sb^{+3} . Contudo o local em que ocorre tal reação (macrófago ou amastigota), assim como o mecanismo de redução (enzimática ou não enzimática) permanecem controversos. Porém, sabe-se que a habilidade do parasito reduzir o Sb^{+5} em Sb^{+3} é estágio específico, visto que só amastigotas, e não promastigotas são capazes de realizar tal redução. Isto explica porque amastigotas são suscetíveis à ação do Sb^{+5} , enquanto

promastigotas possuem baixa suscetibilidade (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Este modelo foi sugerido há mais de 50 anos por Goodwin e Page (1943) e tem sido corroborado por estudos em que foi constatada a presença de compostos de Sb^{+3} em soros de pacientes tratados com Glucantime® (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004). Dentre os potenciais alvos moleculares do Sb^{+3} , pode-se destacar a enzima tripanotiona redutase (TR). O sistema tripanotiona/TR mantém a tripanotiona em seu estado reduzido e em conseqüência protege os tripanossomatídeos do dano oxidativo (FRÉZARD, DEMICHELI e RIBEIRO, 2009). O Sb^{+3} interfere com o metabolismo da tripanotiona pela inibição da TR, ocasionando estresse oxidativo e conseqüente morte por apoptose. De acordo com o segundo modelo, o Sb^{+5} possui uma atividade leishmanicida intrínseca. Estudos sugerem que ele inibe a glicólise e a betaoxidação de ácidos graxos, além disso, Sb^{+5} , mas não Sb^{+3} , inibe especificamente a enzima DNA topoisomerase tipo I, impedindo com isso a replicação do DNA. A terceira hipótese proposta para a ação dos antimoniais consiste na ativação do sistema imune do hospedeiro mamífero e conseqüente morte dos parasitos (HALDAR, SEN e ROY, 2011).

A terapia com antimoniais pentavalentes é longa, variando de 20 a 30 dias, possui alto custo, a via de administração é intravenosa ou intramuscular e o uso desses medicamentos está relacionado a uma série de efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, artralgias, mialgias, perda de apetite, febre, dor de cabeça, náuseas, urticária, leucopenia, trombocitopenia e elevação de enzimas pancreáticas (OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, não devem ser usados por pacientes com insuficiência renal e por mulheres grávidas. Outro problema que vem acompanhando a terapia com antimoniais é a falha ao tratamento, documentada em diversas regiões do mundo. A eficácia do tratamento varia de acordo com a região geográfica, com a espécie de *Leishmania* envolvida e com a forma clínica da doença (GOTO e LINDOSO, 2010). No “Novo Mundo”, por exemplo, a eficácia do tratamento com antimoniais tem sido variável. Na Bolívia, a falha ao tratamento foi documentada em 7% dos pacientes, no Brasil em 16% e na Colômbia em 39% (GOTO e LINDOSO, 2010).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico usado como segunda escolha para tratar das leishmanioses, em pacientes não responsivos ao tratamento com antimoniais pentavalentes (AMATO et al, 2008), e é o tratamento de primeira escolha para gestantes com leishmanioses e para pacientes co-infectados por

HIV/leishmanioses (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Apesar da anfotericina B apresentar uma excelente atividade leishmanicida com pequeno número de casos de recorrência e melhor ação do que os antimoniais, as dificuldades encontradas quanto ao seu uso fora do ambiente hospitalar e o seu alto potencial nefrotóxico, impede a sua utilização como droga de primeira escolha (AMATO *et al.*, 2008). Este composto tem atividade seletiva contra *Leishmania* devido à alta afinidade da anfotericina B ao ergosterol presente na membrana plasmática deste parasito, mas também reconhece, em menor extensão, o colesterol presente em células humanas (SANTOS *et al.*, 2008). O mecanismo de ação da anfotericina B decorre de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade da membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (URBINA, 1997; SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA, 2004). Além de nefrotoxicidade, este medicamento pode apresentar outros efeitos adversos, incluindo febre, cefaléia, náuseas, vômitos, anorexia, tremores, calafrios, flebite, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia, alterações cardíacas e distúrbios do comportamento. Sua via de administração é intravenosa e seu uso é contra indicado em pacientes cardiopatas, hepatopatas e, especialmente, nefropatas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Tentando diminuir os efeitos adversos deste medicamento, foram desenvolvidas algumas formulações da anfotericina B associada a lipídeos, porém o elevado custo dessas preparações inviabiliza a sua utilização em países em desenvolvimento (TIUMAN *et al.*, 2011).

A pentamidina é uma diamida aromática (RATH, *et al.*, 2003) que foi inicialmente utilizada no tratamento de pneumonias causadas por *Pneumocystis carinii* (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Esse composto demonstrou ser efetivo no tratamento das leishmanioses, sendo indicado para os casos não responsivos aos antimoniais pentavalentes (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2005), e já mostrou apresentar a mesma eficácia dos compostos de antimônio. Esta droga tem sido utilizada com sucesso para tratar a LC e a LMC em algumas regiões do “Novo Mundo”. Ela interfere com a síntese de DNA da *Leishmania*, modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo fragmentação da membrana mitocondrial, levando à conseqüente morte do parasito (GOTO e LINDOSO, 2010). Sua via de administração é intravenosa ou intramuscular e possui uma série de efeitos adversos, como dor no local da injeção, gosto metálico na boca, dor de cabeça, dispnéia, hipotensão e hipoglicemia (DAVID e CRAFT, 2009).

A miltefosina, um alquilfosfolípídeo, foi desenvolvida como um agente antineoplásico para o tratamento de cânceres cutâneos e tem sido aplicada para tratar as leishmanioses (TIUMAN et al., 2011), sendo a primeira, e até o presente momento, a única droga oralmente administrada para o tratamento das leishmanioses (VAN ASSCHE et al., 2011). Em estudo conduzido na Índia, com a participação de mais de 1100 pacientes com LV, dentre eles adultos e crianças, esta droga apresentou índice de eficácia de 95% (ANTINORI, SCHIFANELLA e CORBELLINO, 2012). A administração oral de miltefosina tem sido usada para o tratamento da LV na Índia desde 1998 e atualmente é recomendada na Índia e Etiópia para tratar a LV e na Colômbia, Bolívia e Guatemala para tratar a LC (GODINHO et al., 2012). Entretanto, para *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. chagasi*, espécies de *Leishmania* prevalentes no Brasil, a miltefosina tem apresentado baixo efeito, podendo-se esperar que altas doses deste composto seriam necessárias para tratar pacientes infectados com essas espécies (MORAIS-TEIXEIRA et al., 2011). Acredita-se que esta droga atue interferindo na composição lipídica, na permeabilidade e na fluidez da membrana plasmática do parasito, induzindo morte celular por apoptose (PARIS et al., 2004; VERMA e DEY, 2004; COSTA-FILHO, LUCAS e SAMPAIO, 2008). Apesar de ser considerada menos tóxica do que as outras drogas empregadas no tratamento das leishmanioses, a miltefosina apresenta importantes efeitos colaterais a nível gastrointestinal, incluindo náuseas, vômitos (RUBIANO et al., 2012), diarreia e dor no estômago (DORLO et al., 2011). Além disso, tem mostrado ser teratogênica e, portanto não é recomendada sua utilização por mulheres em idade fértil (GODINHO et al., 2012).

A paromomicina é o único aminoglicosídeo com atividade leishmanicida clinicamente importante. Possui pobre absorção oral e, portanto deve ser utilizada por via tópica, parenteral (TIUMAN et al., 2011), injetável (SINHA et al., 2011) ou intralesional, porém a paromomicina via tópica é considerada insuficiente para tratar qualquer forma de LC (DAVID e CRAFT, 2009). Em estudo realizado na Índia, a paromomicina foi usada para tratar pacientes com LV e 94% desses apresentaram cura. Com isso, em 2006 esta droga, em sua forma injetável, foi registrada para o tratamento da LV na Índia (SINHA et al., 2011). Porém, em outras regiões, como por exemplo, no leste da África, a paromomicina apresentou baixa eficácia (ANTINORI, SCHIFANELLA e CORBELLINO, 2012). Acredita-se que a paromomicina atue

inibindo a síntese de proteínas e modificando a fluidez e a permeabilidade da membrana plasmática do parasito. Além disso, estudos têm mostrado que a mitocôndria também constitui um grande alvo desta droga. Os principais efeitos adversos relacionados à utilização da paromomicina são elevação das transaminases hepáticas, ototoxicidade e dor no local da injeção (MALTEZOU, 2010).

Dado a grande dificuldade de tratar adequadamente pacientes infectados com *Leishmania*, a pesquisa e desenvolvimento de novos compostos com ação leishmanicida é algo imprescindível e indiscutível (TIUMAN et al., 2011).

1.4 Produtos naturais marinhos e resveratrol

Produtos naturais têm sido usados na medicina tradicional como terapia para diversas doenças, incluindo as parasitárias (CUTIGNANO et al., 2003; MAYER et al., 2009). A quinina, por exemplo, é um produto natural extraído das cascas de uma árvore peruana, e este composto foi amplamente utilizado para o tratamento da malária e em alguns casos da doença, ainda pode ser empregado (PRUDHOMME et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Apesar da maioria dos produtos naturais serem derivados de plantas terrestres (CUTIGNANO et al., 2003; MAYER et al., 2009), a partir da década de 60, organismos marinhos também têm sido investigados como fontes de metabólitos secundários biologicamente ativos (TEMPONE, OLIVEIRA e BERLINCK, 2011), pois os seres marinhos vivem em condições relativamente hostis, como baixa temperatura e alta pressão, e isso faz com que tais organismos possuam características bioquímicas únicas (FELCZYKOWSKA et al., 2012). O oceano, que ocupa cerca de 70% da superfície da terra, é uma rica fonte de produtos naturais e contém quase 80% de todas as variedades de vida do planeta (ABRAHAM et al., 2012). Durante os últimos 30 anos, milhares de compostos com diferentes atividades biológicas têm sido isolados de fontes marinhas, como esponjas, algas, corais (ABRAHAM et al., 2012; NORO, KALAITZIS e NEILAN, 2012), briozoários, tunicados e cianobactérias (NORO, KALAITZIS e NEILAN, 2012) e muitos compostos de origem marinha têm sido também sintetizados (CUTIGNANO et al., 2003).

Atualmente, muitos produtos naturais marinhos já se encontram em uso clínico para tratar infecções virais, dores neuropáticas e câncer. Além disto, muitos

outros compostos marinhos se encontram em fase de triagem clínica para serem empregados no tratamento do câncer, da doença de Alzheimer, da asma e de processos inflamatórios (NORO, KALAITZIS e NEILAN, 2012). Além destas atividades farmacológicas, estudos mostram também outras atividades biológicas de compostos de origem marinha, como atividade antibacteriana (MORALES et al., 2006), antioxidante (ZUBIA, ROBLEDO e FREILE-PELEGRIN, 2007) e anticoagulante (MEDEIROS et al., 2008).

A descoberta de produtos marinhos com atividade antiparasitária nos anos 80 ganhou atenção de diversos grupos de pesquisa que direcionaram seus trabalhos visando obtenção de metabólitos secundários marinhos para o tratamento de doenças parasitárias, como malária, doença de Chagas e leishmanioses (TEMPONE, OLIVEIRA e BERLINCK, 2011). Veiga-Santos e colaboradores (2010) e Santos e colaboradores (2010), por exemplo, demonstraram o efeito do elatol, um metabólito secundário isolado da alga vermelha *Laurencia dendroidea*, em *Trypanosoma cruzi* e *L. amazonensis*, respectivamente. Recentemente, Prudhomme e colaboradores (2008) mostraram o efeito significativo de um metabólito secundário marinho em cepas de *Plasmodium falciparum* resistente e não resistente à cloroquina. Foi demonstrado ainda, por Orhan e colaboradores (2010), a ótima atividade de um alcalóide marinho em *Trypanosoma brucei rhodesiense*, *L. donovani* e *P. falciparum* e sua moderada atividade em *T. cruzi*. Além disso, estudos recentes mostraram que alcalóides obtidos de organismos marinhos têm apresentado boa atividade em *L. major* (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010), *L. donovani* (LININGTON et al., 2007) e *L. amazonensis* (NAKAO et al., 2004).

Alcalóides marinhos 3-alkil piridinas, como a viscosalina (Figura 6), um alcalóide natural isolado de *Haliclona viscosoei*, apresenta atividade antimicrobiana em diferentes bactérias (VOLK e KOCK, 2004). Theonelladin C (Figura 6), um alcalóide estruturalmente relacionado à viscosalina e obtido de *Theonella swinhoei* é um importante agente antineoplásico (KOBAYASHI et al., 1989). É interessante ressaltar que recentemente um grupo de análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas foi testado em *P. falciparum* e se mostraram efetivos (HILÁRIO et al., 2011).

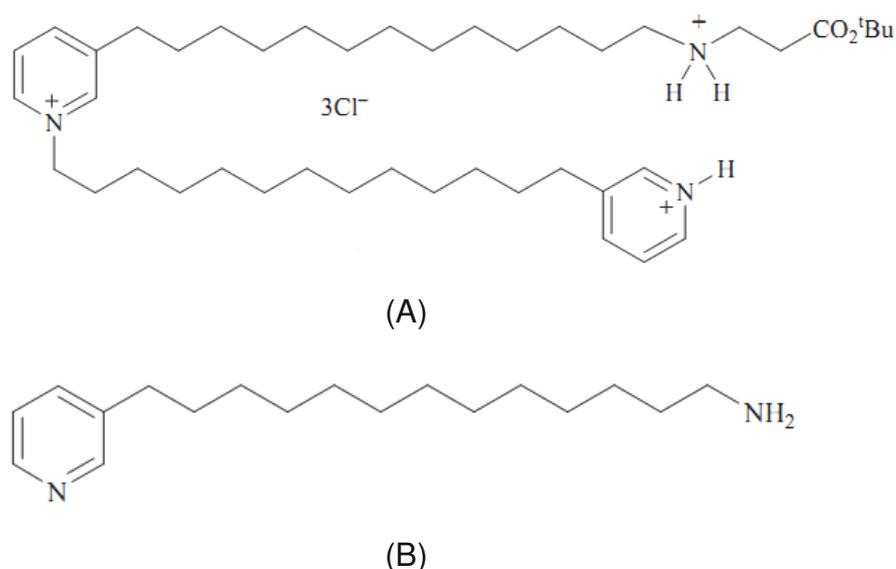


Figura 6: Estrutura química da Viscosalina (A) e do Theonelladin C (B), exemplos de alcalóides marinhos bioativos. Fonte: HILÁRIO et al., 2011.

O resveratrol, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno (Figura 7), é um composto polifenólico que foi primeiramente isolado de raízes da planta *Veratrum grandiflorum* em 1940 (BAUR e SINCLAIR, 2006). Em 1963 tal substância foi extraída de raízes de *Polygonum cuspidatum*, uma planta tradicionalmente usada na medicina asiática (BAUR e SINCLAIR, 2006). Atualmente sabe-se que este composto está presente principalmente nas cascas e sementes de uva (BOGDAN e BAUMANN, 2009), e apresenta-se em concentrações relativamente elevadas no vinho tinto (0,1-14,3 mg/L) (SHANG *et al.*, 2009). Esta substância existe na natureza como isômeros *cis* e *trans* (CALABRESE, MATTSON e CALABRESE, 2010) sendo sua forma *trans* a responsável por seus efeitos biológicos (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2012).

O resveratrol atraiu pouco interesse até 1992, quando foi postulado para explicar alguns efeitos cardioprotetores do vinho tinto (BAUR e SINCLAIR, 2006), pois o consumo diário e prolongado de vinho tinto pela população do sul da França estava associado a um reduzido índice de mortalidade por doenças coronarianas e a explicação para tal fato estava justamente na presença do resveratrol no vinho tinto (CALABRESE, MATTSON e CALABRESE, 2010). Este efeito cardioprotetor do resveratrol pode ser explicado pelas suas propriedades antioxidante (MIKSTACKA, RIMANDO E IGNATOWICZ, 2010) e anti-inflamatória (GIOVINAZZO et al., 2012).

Atualmente esse composto está sendo amplamente estudado e já se sabe que ele pode prevenir ou diminuir a progressão de uma ampla variedade de doenças, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer (LI,

XIA e FÖRSTERMANN, 2012). A atividade quimiopreventiva contra o câncer é considerada o efeito benéfico mais importante do resveratrol. Estudos têm mostrado que esta substância inibe eventos celulares associados com iniciação, promoção e progressão do câncer (EL-AGAMY, 2010). Porém, seu mecanismo de ação antitumoral ainda não é claro, sabe-se somente que em algumas linhagens tumorais o resveratrol induz apoptose (LIN et al., 2011). Recentemente, Fernández-Pérez e colaboradores (2012) testaram o efeito do resveratrol em duas linhagens de células de leucemia humana e em uma linhagem de células de câncer de mama e notaram que baixas concentrações do resveratrol diminuíram a proliferação desses tipos celulares através de um bloqueio no ciclo celular, enquanto altas concentrações deste composto reduziram a proliferação celular como resultado de indução de apoptose. Em trabalho publicado por Wang e colaboradores (2013) foi mostrado que o resveratrol é capaz de impedir a ocorrência de metástase causada por tumor de pulmão.

Além das propriedades farmacológicas acima citadas, o resveratrol tem mostrado atividade em diferentes microorganismos, incluindo fungos (JUNG *et al.*, 2005), bactérias (CHAN, 2002) e vírus (DOCHERTY *et al.*, 1999). Além disto, apresenta efeito antiparasitário, incluindo a capacidade de inibir a viabilidade de larvas e vermes adultos de *Trichinella spiralis* (OZKOC et al., 2009), atividade em formas tripomastigotas de *Trypanosoma evansi* (NYUNT et al., 2012) e moderada atividade em *P. falciparum* (SON et al., 2007).

Em estudo realizado por Kedzierski e colaboradores (2007), a atividade do resveratrol foi testada em formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. Observou-se que o resveratrol apresentou como concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) o valor de 45 µg/ml (196,9 µM) em formas promastigotas, após 48 horas de tratamento. Além disso, este composto apresentou redução do número de macrófagos infectados com amastigotas de *L. major* após o mesmo tempo de tratamento, nas concentrações de 20, 40 e 45 µg/mL. No mesmo estudo foi demonstrado que o resveratrol não apresentou toxicidade em macrófagos não infectados até a concentração de 45 µg/mL.

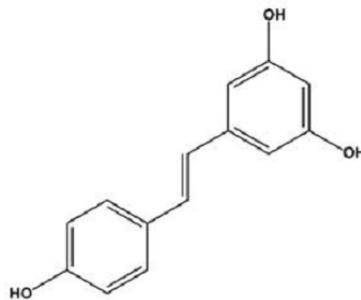


Figura 7: Estrutura química do resveratrol. Fonte: SON et al., 2007.

Tendo em vista que as leishmanioses são doenças importantes, tanto do ponto de vista clínico quanto epidemiológico, e sabendo que compostos marinhos e, resveratrol têm apresentado atividades biológicas interessantes, este trabalho, teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida de análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas e de bioisósteros do resveratrol e seus complexos com ouro.

Compostos contendo metais apresentam variados efeitos biológicos (BENÍTEZ et al., 2011). Em trabalho publicado por El-Metwaly e Refat (2011) moléculas complexadas a antimônio, estanho, bismuto e chumbo apresentaram efeito em diferentes espécies de fungos e bactérias. Compostos complexados à platina e vanádio têm apresentado significativo efeito antiparasitário (NAVARRO et al., 2010; BENÍTEZ et al., 2011). Um exemplo de suma importância é a utilização de compostos de antimônio como primeira linha para o tratamento das leishmanioses (HALDAR, SEN e ROY, 2011).

Bioisósteros são substâncias distintas, porém estruturalmente relacionadas (MEANWELL, 2011; CANALES et al., 2012), pois compartilham semelhantes formatos, volumes, distribuições eletrônicas e propriedades físico-químicas (CANALES et al., 2012), no entanto, são reconhecidos de maneira similar por sistemas biológicos (MEANWELL, 2011), mantendo atividades biológicas similares (MEANWELL, 2011; CANALES et al., 2012). A produção de bioisósteros é uma importante estratégia da química medicinal que pode ser usada para aumentar a potência, a seletividade (YANG et al., 2010), a estabilidade, a permeabilidade através da membrana plasmática (HAMADA e KISO, 2012) e as propriedades farmacocinéticas de compostos candidatos a novos fármacos (YANG et al., 2010; HAMADA e KISO, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos, *in vitro*, de compostos análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol e seus complexos com ouro, em *Leishmania amazonensis* e em macrófagos peritoneais. Além disso, avaliar se o efeito leishmanicida desses compostos envolve mecanismos moduladores de resposta celular.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico de análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas em formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar o efeito citotóxico de bioisósteros do resveratrol e seus complexos com ouro em formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos acima citados em células de mamíferos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c;
- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos, que apresentaram atividade antipromastigota e baixa toxicidade em macrófagos, em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*;
- Avaliar a relação entre estrutura e atividade dos compostos;
- Determinar a seletividade dos compostos sobre promastigotas e amastigotas intracelulares, em relação à célula hospedeira;
- Determinar a especificidade dos compostos sobre os diferentes estágios do parasito;
- Avaliar os níveis de NO produzidos por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com os compostos.

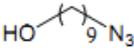
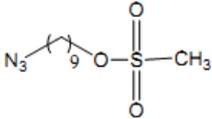
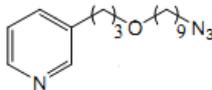
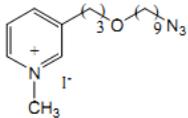
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Compostos Sintéticos

Foram testados 12 compostos sintéticos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas (compostos de **1-12**) e 7 bioisósteros do resveratrol (compostos de **13-19**), sendo que destes, quatro compostos são complexados com átomos de ouro (compostos de **16-19**). Os análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas foram sintetizados sobre a orientação da Prof^a. Dr^a. Rossimiriam Pereira de Freitas, do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais e os bioisósteros do resveratrol foram sintetizados, sobre a orientação do Prof. Dr. Alexandre Cuim e do Prof. Dr. Adilson David da Silva do Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Na tabela 1 estão representadas as estruturas químicas dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas e na tabela 2 constam as estruturas químicas dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Tabela 1: Estrutura química e nome químico dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas.

Composto	Estrutura Química	Nome Químico
1		9-azido-nonan-1-ol
2		9-azidononil metanosulfonato
3		3-(3-(9-azidononaciloxi)propil)piridina
4		Sal de Iodeto de N-metil-3-(3-(9-azidononaciloxi)propil)piridina

Continuação Tabela 1: Estrutura química e nome químico dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas.

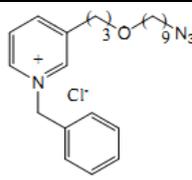
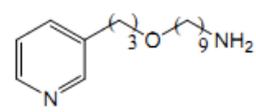
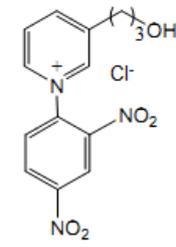
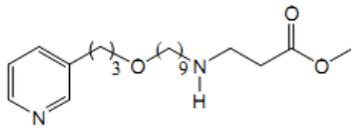
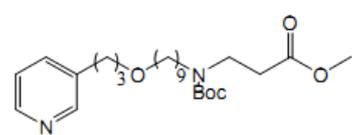
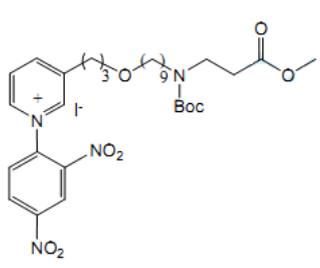
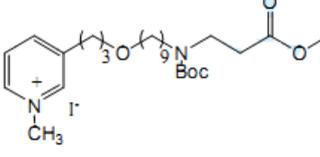
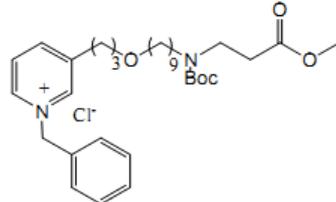
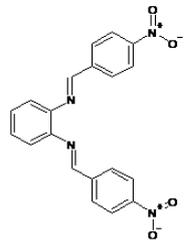
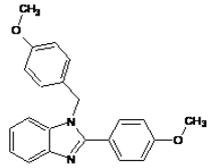
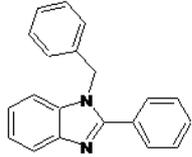
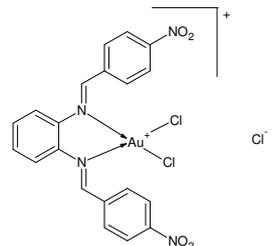
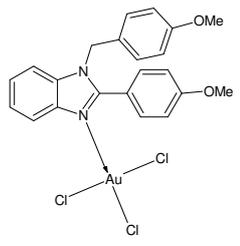
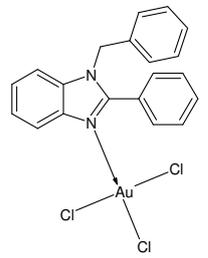
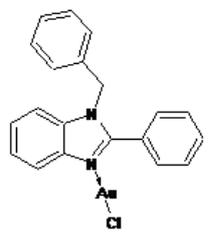
Composto	Estrutura Química	Nome Químico
5		Sal de cloreto de N-benzil 3-(3-(9-azidononacilloxi)propil)piridina
6		1-nonanamina-9-(3-piridinilpropoxi)
7		Sal de cloreto de N-(2,4-dinitro-fenil)-3-piridinilpropanol
8		Metil <i>N</i> -[9-[3-(3-piridinil)propoxi]nonil] β-alaninato
9		Metil <i>N</i> -[1,1-dimetiletoxicarbonil]- <i>N</i> -[9-[3-(3-piridinil)propoxi]nonil] β-alaninato
10		Sal de iodeto de N-(2,4-dinitrofenil)- <i>N</i> -(metil <i>N</i> -[1,1-dimetiletoxicarbonil]- <i>N</i> -[9-[3-(3-piridinil)propoxi]nonil] β-alaninato)
11		Sal de iodeto de N-metil-(metil <i>N</i> -[1,1-dimetiletoxicarbonil]- <i>N</i> -[9-[3-(3-piridinil)propoxi]nonil] β-alaninato)
12		Sal de cloreto de N-(benzil)- <i>N</i> -(metil- <i>N</i> -[1,1-dimetiletoxicarbonil]- <i>N</i> -[9-[3-(3-piridinil)propoxi]nonil] β-alaninato)

Tabela 2: Estrutura química e nome químico dos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Composto	Estrutura Química	Nome Químico
13		<i>N,N'</i> -bis[(4-nitrofenil)metileno]-1,2-benzenodiamina
14		2-(4-metoxifenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]-1H-benzimidazol
15		2-fenil-1-(fenilmetil)-1H-benzimidazol
16		Cloreto de [N,N'-bis[(4-nitrofenil)metileno]-1,2-benzenodiamina bis(chloro)] aurato (III)
17		Tris cloro[2-(4-metoxifenil)-1-[(4-metoxifenil)metil]benzimidazol]aurato(III)
18		Tris cloro[2-fenil-1-(fenilmetil)benzimidazol]aurato(III)
19		Cloro[2-fenil-1-(fenilmetil)benzimidazol]aurato(I)

3.2 Cultivo de *L. amazonensis*

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio Warren (infusão de coração e cérebro humano - meio BHI, acrescido de hemina e ácido fólico) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e mantidas a 25°C. Os parasitos foram constantemente retirados a partir de lesões de camundongos Balb/c e os promastigotas mantidos *in vitro* com repiques realizados 2 vezes por semana.

O SBF foi adquirido da Cultilab (Campinas, São Paulo, Brasil), o meio BHI foi adquirido da Himedia (Mumbai, Índia) e a hemina e o ácido fólico foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

3.3 Manutenção da infectividade da cepa de *L. amazonensis*

Para a manutenção da infectividade da cepa de *L. amazonensis* foram utilizados camundongos Balb/c, machos, com 6 semanas de idade e pelo menos 25 gramas. Foram inoculados, no coxim plantar esquerdo de cada animal, 50 µl de uma solução de PBS contendo 2×10^6 promastigotas/mL. 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 de formas amastigotas, que em seguida foram colocadas em meio Warren suplementado com 20% de SBF e mantidos a 25°C, para que houvesse a conversão das formas amastigotas em promastigotas.

3.4 Avaliação da toxicidade dos compostos em promastigotas de *L. amazonensis*

A atividade antipromastigota foi realizada de acordo com o método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT), baseado na redução do tetrazólio sódico em formazan pelas desidrogenases mitocondrais de células vivas (MOSSMAN, 1983).

As formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, após contagem em câmara de Neubauer, foram distribuídas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^6 células/mL. Os compostos foram adicionados

em concentrações variadas após diluição em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo que a concentração máxima de DMSO usada foi de 0,03%, concentração esta que não se mostrou tóxica aos parasitos. Os testes foram realizados em duplicatas, no qual em alguns poços não houve adição de compostos (controle). Após 72 horas de incubação em estufa a 25°C, foram adicionados 10 µL de MTT a 5 mg/mL em cada poço e as placas foram novamente incubadas durante quatro horas a 25°C. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/ácido clorídrico (HCl) (solução de isopropanol/HCl a 0,7%) e lida em espectrofotômetro a 570 nanômetros (Multiskan EX - Thermo Electron Corporation, Vantaa, Finlândia). Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição do crescimento dos promastigotas em relação ao controle. Foi então 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 miltefosina (obtida da Cayman Chemical Company, Michigan, USA) e a anfotericina B (obtida da Cristália, São Paulo, Brasil) foram utilizadas como fármacos de referência. O MTT e o DMSO foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

3.5 Avaliação da toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c

Para a análise da toxicidade dos compostos em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, obtidos após prévia inoculação intraperitoneal de 2 mL de tioglicolato 3% (Himedia, Mumbai, Índia), 72 horas antes da eutanásia. Os camundongos foram então eutanasiados para a realização do lavado peritoneal, utilizando 5 mL de solução de Hank's estéril, sendo que em cada camundongo o processo foi repetido para recuperar um maior número de células. A solução obtida do lavado peritoneal foi centrifugada a 1000 rpm por 10 minutos, os macrófagos foram ressuspensos em meio RPMI-1640 (Cultilab, Campinas, São Paulo, Brasil) e contados em câmara de Neubauer. Após a contagem, os macrófagos foram suspensos em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de SBF na concentração de 2×10^6 células/mL e foram plaqueados em placas plásticas de 96 poços. As placas permaneceram por 16 horas em estufa com 5% de dióxido de carbono (CO_2) a 37°C, para a adesão dos macrófagos. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada das células não aderidas e os

compostos, após diluição em DMSO, foram então adicionados em diferentes concentrações, sendo que a máxima concentração utilizada deste solvente foi de 0,05%, que não se mostrou tóxica às células. As placas foram transferidas novamente para estufa com 5% de CO₂ a 37°C, onde permaneceram por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados, em cada poço, 10 µL de MTT (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/mL. Após duas horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/HCl (solução a 0,7%) e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nanômetros (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 calculados como porcentagem de inibição dos macrófagos em relação ao controle. Foi então determinado o CC₅₀ (concentração citotóxica que mata 50% das células) de cada molécula com o auxílio do programa *GraFit 5* (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K). A miltefosina e a anfotericina B foram utilizadas como fármacos de referência.

3.6 Avaliação da toxicidade dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

Para a realização dos testes anti-amastigota foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c, obtidos como já descrito na seção 3.5. As células obtidas no lavado peritoneal foram centrifugadas e contadas em câmara de Neubauer. Sobre lamínulas de vidro de 13 milímetros de diâmetro, em placas de 24 poços, foram distribuídos, em cada poço, 300µL de suspensão a 2x10⁶ células/mL em meio RPMI-1640 contendo 10% SBF. As placas foram transferidas para estufa com 5% de CO₂ a 37°C para que os macrófagos aderissem às lamínulas. Após 16 horas, as células foram lavadas com PBS estéril para a retirada dos macrófagos não aderidos e foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na fase estacionária de crescimento. As placas foram então colocadas em estufa com 5% de CO₂ a 33°C e após 3 horas de interação, cada poço foi lavado com PBS estéril para a retirada dos parasitos que não foram fagocitados e os compostos, após diluição em DMSO, foram adicionados em diferentes concentrações. A máxima concentração de DMSO usada foi de 0,03%. Após 72 horas de tratamento, em estufa com 5% de CO₂ a 33°C, as lamínulas foram retiradas, as células foram fixadas com álcool

absoluto, coradas com Giemsa e desidratadas em bateria de acetona/xilol. Cada teste foi realizado em duplicata. A miltefosina e a anfotericina B foram utilizadas como fármacos de referência.

O efeito antiparasitário dos compostos para formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi avaliado a partir da contagem dessas formas dentro dos macrófagos parasitados em relação ao controle (macrófagos infectados sem a adição de compostos). Foram contados um total de 100 macrófagos infectados em cada lamínula, os amastigotas intracelulares e as células não infectadas presentes nos campos correspondentes. Os resultados foram calculados como porcentagem de inibição da carga global de amastigotas em relação ao controle. A partir desse teste de viabilidade foi determinado o CI_{50} de cada molécula com o auxílio do programa Probit. Além disso, foram construídos gráficos expressando o índice de infecção (InIn) dos controles e dos tratados, sendo que este índice é calculado pela multiplicação da porcentagem de células infectadas pelo número total de amastigotas e posterior divisão deste valor pelo número total de células (infectadas e não infectadas).

3.7 Determinação do índice de seletividade e do índice de especificidade dos compostos

O índice de seletividade (InSe) tem como objetivo determinar a seletividade de toxidez dos compostos sobre as formas parasitárias (promastigotas e amastigotas) quando comparadas às células de mamíferos (macrófagos peritoneais). O InSe é calculado pela razão entre o CC_{50} em macrófagos peritoneais e o CI_{50} em formas promastigotas ou amastigotas de *L. amazonensis*.

O índice de especificidade (InEs) tem como objetivo determinar a especificidade dos compostos nos dois estágios do parasito, promastigotas e amastigotas. O InEs é calculado pela razão entre o CI_{50} em formas promastigotas de *L. amazonensis* e o CI_{50} em formas amastigotas de *L. amazonensis*.

3.8 Determinação dos níveis de NO produzidos por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*

A dosagem do NO foi realizada no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com *Leishmania* após 48 horas da adição dos compostos. O NO foi

dosado através da concentração de nitrito (NO_2^-), um subproduto estável do NO, usando o reagente de Griess (GREEN et al., 1982).

Alíquotas de 50 μl do sobrenadante das culturas infectadas com *Leishmania* foram retiradas após 48 horas de tratamento com os compostos e incubadas com 50 μl do reagente de Griess (25 μl de Sulfanilamida (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) e 25 μl de N-1-diidrocloreto de naftiletlenodiamina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5%) por um período de 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 540 nanômetros (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) e a produção de nitrito foi quantificada através da comparação com uma curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO_2 .

Os controles utilizados nesse experimento foram: (1) controle negativo de produção de NO, constituído de macrófagos; (2) controle positivo de produção de NO, constituído de macrófagos + estímulo (lipopolissacarídeo (LPS) de bactéria *Escherichia coli* J5 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$ ou IFN- γ (obtido do sobrenadante da cultura de células da linhagem L1210) a 0,9 ng/mL + LPS a 1 $\mu\text{g/mL}$) e (3) controle de macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

3.9 Análise Estatística

Nos ensaios antipromastigota de *Leishmania* e de toxicidade em macrófagos os valores dos CI_{50} e do CC_{50} para cada composto foram determinados graficamente a partir de uma curva de regressão não linear, com intervalo de confiança de 95%, utilizando o programa *GraFit* versão 5 (Erithacus Software Ltd., Horley, U.K). Para ensaios antiamastigotas, os valores dos CI_{50} foram calculados utilizando o programa Probit, que utiliza o método de Litchfiet e Wilcoxon e um intervalo de confiança de 95%.

Para a construção de gráficos expressando o \ln e de dosagem de NO a análise estatística foi realizada por análise de variância (One-way ANOVA) usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.0, sendo que diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett.

3.10 Considerações éticas

Todos os ensaios envolvendo animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (CEEA 059/2011, 060/2011, 015/2012, 016/2012 e 017/2012).

4 RESULTADOS

4.1 Compostos sintéticos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas

O efeito dos análogos de alcalóides marinhos foi testado em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e os resultados foram publicados no Chemical Biology & Drug Design (Anexo). A tabela 3 mostra os CI_{50} de cada um dos compostos testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os compostos **4**, **5** e **12** apresentaram significativa atividade leishmanicida com CI_{50} abaixo de 3 μ M. As moléculas **3**, **10** e **11** também apresentaram boa atividade, com CI_{50} abaixo de 15 μ M. O composto **7** foi o que apresentou menor atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis*, possuindo o maior CI_{50} (23,92 μ M). As demais moléculas não foram ativas em promastigotas desta espécie de *Leishmania*.

Compostos contendo apenas o grupamento terminal azida não apresentaram efeito sobre promastigotas de *L. amazonensis* (compostos **1** e **2**), porém a união deste grupo azida com um grupamento piridina, dando origem ao composto **3**, aumentou significativamente a atividade leishmanicida. A redução do terminal azida, do composto **3** para o composto **6**, reduziu a atividade antileishmania, o que confirmou a importância do grupo azida associado à piridina para a atividade em promastigotas de *L. amazonensis*. Os compostos **4** e **5** foram os mais ativos da série e esta atividade se deve à existência de um nitrogênio quaternário no grupo piridina associado à presença do grupo terminal azida. Os compostos **7**, **10**, **11** e **12** também foram ativos, atividade esta atribuída à presença de um nitrogênio quaternário em suas moléculas, porém, a ausência do grupo azida nesses compostos fez com que eles fossem menos ativos do que as moléculas **4** e **5**. É interessante ressaltar que os sais **10**, **11** e **12**, que contém uma cadeia lateral com um grupo éster terminal, similarmente a um alcalóide natural, a viscosalina (Figura 6), foram bastante ativos.

Tabela 3: Efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas sobre promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	Estrutura Química	CI ₅₀ (μM) ^a
1		>87,00
2		>87,00
3		14,95 ± 0,31
4		1,07 ± 0,02
5		1,09 ± 0,06
6		>87,00
7		23,92 ± 0,80
8		>87,00
9		>87,00
10		4,53 ± 0,20
11		11,41 ± 0,18
12		2,87 ± 0,17
	Miltefosina	21,39 ± 1,18
	Anfotericina B	0,15 ± 0,009

^aCI₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa Grafit.

Para analisar a toxicidade dos compostos em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. Como pode ser visto na figura 8, os compostos **3, 4, 5, 6, 8, 10, 11 e 12** foram tóxicos para os macrófagos, matando mais de 60% das células na concentração de 100 μM . Apenas quatro (compostos **1, 2, 7 e 9**) apresentaram baixa toxicidade para estas células, inibindo a viabilidade celular em menos de 40% na mesma concentração.

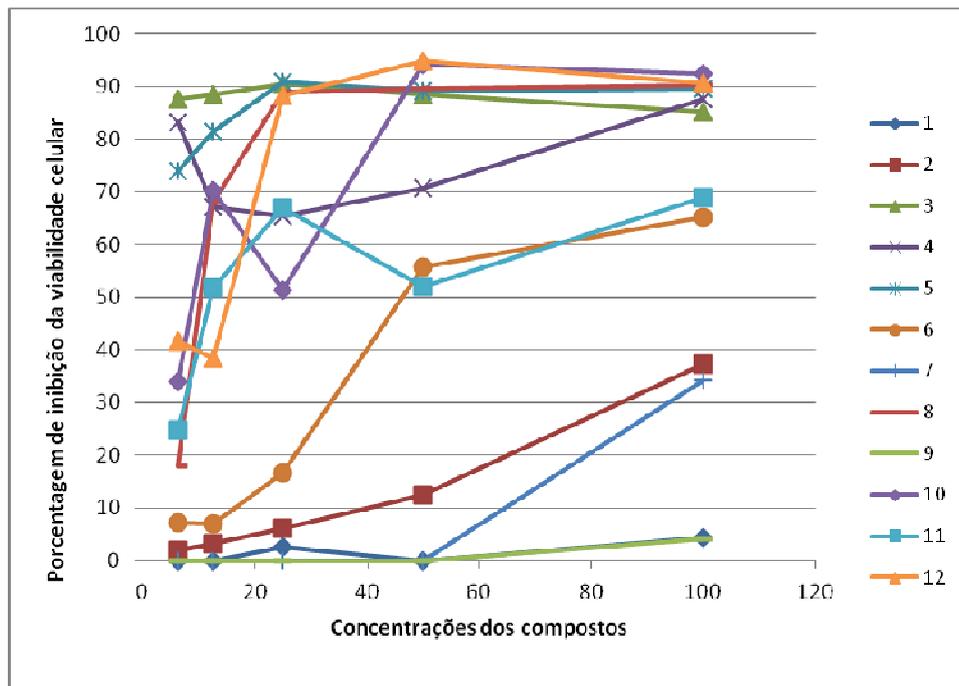


Figura 8: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com os análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas.

Ainda com relação à toxicidade dos compostos em macrófagos, foi calculado o CC_{50} (Tabela 4). Como pode ser observado, a maioria dos compostos apresentou CC_{50} abaixo de 40 μM , sendo que o composto **5** foi o mais tóxico ($\text{CC}_{50} < 0,10 \mu\text{M}$).

Na tentativa de analisar a seletividade dos compostos, foi calculado o índice de seletividade (InSe) em formas promastigotas de *L. amazonensis* (CC_{50} em macrófagos/ CI_{50} em promastigotas de *L. amazonensis*), como pode ser verificado na Tabela 4. O composto **12** foi o que se mostrou mais seletivo para o parasito em seu estágio extracelular, sendo cerca de cinco vezes mais tóxico para promastigotas de *L. amazonensis* ($\text{InSe} = 5,49$) do que para os macrófagos.

Tabela 4: Efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas sobre macrófagos peritoneais e índice de seletividade (InSe) em promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	CC ₅₀ (µM) ^a	InSe ^b
1	>100,00	-
2	>100,00	-
3	1,11 ± 0,24	0,07
4	0,37 ± 0,05	0,35
5	<0,10	<0,09
6	35,48 ± 0,47	-
7	>100,00	>4,18
8	9,00 ± 0,13	-
9	>100,00	-
10	7,93 ± 0,24	1,75
11	10,53 ± 0,05	0,92
12	15,75 ± 1,91	5,49
Miltefosina	131,99 ± 3,95	6,17
AnfotericinaB	85,81 ± 30,49	572,07

^aCC₅₀ de cada composto corresponde à média de 2 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa Grafit.

^bÍndice de seletividade: razão entre CC₅₀ em macrófagos e CI₅₀ em promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 3).

De acordo com Tempone, Oliveira e Berlinck (2011) compostos candidatos a novos fármacos leishmanicidas devem ter InSe maior do que um, indicando que a molécula é mais tóxica em *Leishmania* do que em células de mamíferos. Portanto, de todos os análogos de alcalóides marinhos testados, aqueles com significativa atividade antipromastigota e InSe próximo ou maior que um, foram selecionados para serem testados em amastigotas de *L. amazonensis*, sendo que os compostos escolhidos foram: **7, 10, 11 e 12**.

Na tabela 5 estão representados os CI₅₀ dos compostos **7, 10, 11 e 12** em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, bem como os InSe em formas amastigotas (CC₅₀ em macrófagos/CI₅₀ em amastigotas de *L. amazonensis*).

Como pode ser verificado na tabela 5 todos os compostos testados em formas amastigotas de *L. amazonensis* apresentaram significativa atividade, com CI₅₀ abaixo de 3,0 µM. A presença de um grupo éster terminal nas moléculas **10, 11 e 12**, semelhante ao alcalóide natural viscosalina (Figura 6), garantiu a esses compostos um efeito antiamastigota mais significativo do que o composto **7**. O

composto **10** foi o mais ativo, com CI_{50} de 0,27 μM , sendo que tal atividade pode ser atribuída à presença de dois grupamentos NO_2 no anel aromático ligado à piridina, pois o composto **12** também possui um anel aromático ligado à piridina, no entanto, a ausência dos grupos NO_2 faz com que este seja menos ativo do que o composto **10**. A presença de um grupo metil, no composto **11**, ou de um anel aromático, no composto **12**, ligado ao nitrogênio da piridina foi indifente, já que tais compostos apresentaram o mesmo efeito em formas amastigotas de *L. amazonensis* (CI_{50} de 1,03 e 1,33 μM para os compostos **11** e **12**, respectivamente) (Tabela 5).

Além disso, quando foi calculado o $InSe$, os compostos foram, no mínimo, 10 vezes mais tóxicos para amastigotas intracelulares do que para células de mamíferos (Tabela 5). O composto **10**, o mais ativo em amastigotas, é 29 vezes mais tóxico para o parasito ($InSe = 29,00$) do que para os macrófagos, já o composto **7**, o que se apresentou menos ativo em formas amastigotas de *L. amazonensis* é, no mínimo 36 vezes mais tóxico para amastigotas intracelulares ($InSe > 36$) do que para macrófagos. Esses resultados mostram uma excelente seletividade dos análogos de alcalóides marinhos em amastigotas de *L. amazonensis*, quando comparado à célula hospedeira.

Tabela 5: Efeito dos compostos **7**, **10**, **11** e **12** sobre amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e índice de seletividade ($InSe$) em amastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	CI_{50} (μM) ^a	$InSe$ ^b
7	2,78 (1,31 - 5,91)	>36,00
10	0,27 (0,13 - 0,58)	29,00
11	1,03 (0,45 - 2,38)	10,00
12	1,33 (1,03 - 1,72)	12,00
Miltefosina	4,15 (2,89 - 5,96)	31,80
Anfotericina B	0,18 (0,12-0,26)	476,72

^a CI_{50} dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com intervalo de confiança. Calculado pelo método de Litchfiet e Wilcoxon, através do programa Probit.

^bÍndice de seletividade: razão entre CC_{50} em macrófagos (Tabela 4) e CI_{50} em amastigotas de *L. amazonensis*.

No intuito de explorar ainda mais a atividade anti-amastigota dos análogos de alcalóides marinhos, foi calculado o índice de infecção ($InIn$) de *L. amazonensis* após o tratamento com os compostos (Figura 9). O $InIn$ foi obtido pela multiplicação da porcentagem de células infectadas pelo número total de amastigotas e posterior

divisão deste valor pelo número total de células (infectadas e não infectadas), sendo portanto, uma variável que considera o número de amastigotas e a porcentagem de infecção dos macrófagos. Os quatro compostos mostraram significativo efeito em formas amastigotas de *L. amazonensis*, contudo esta atividade mostrou uma fraca relação entre dose e resposta, o que pode ser visto pela figura 9. O composto **10** foi o mais ativo na redução do InIn, inibindo cerca de 60% deste índice na menor concentração utilizada (0,6 μM). Contudo, o composto **12** foi o mais efetivo para inibição do InIn na maior concentração usada (10 μM), inibindo, nessa concentração, 99,4% deste índice.

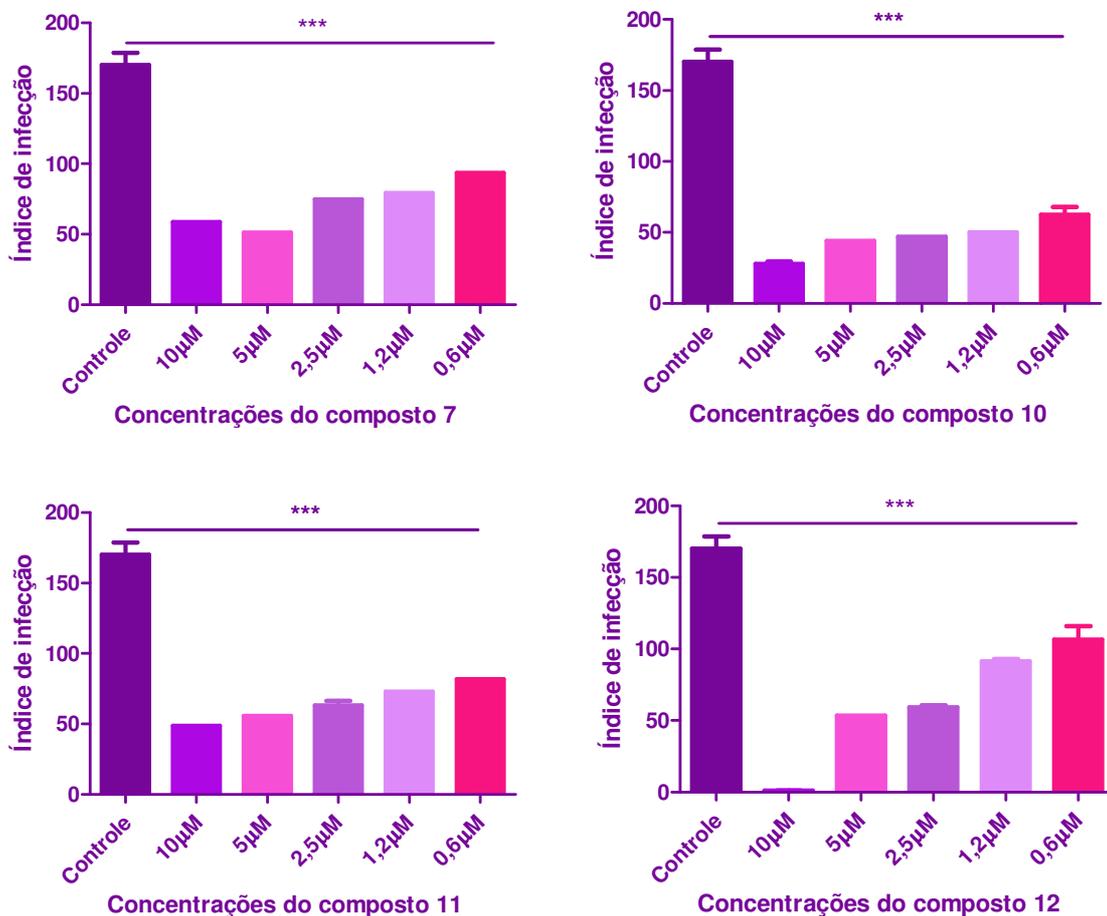


Figura 9: Efeito dos compostos **7**, **10**, **11** e **12** sobre amastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento. O índice de infecção foi calculado pela fórmula: % células infectadas x número total de amastigotas/número total de células. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0, usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foi analisado pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,0001$ (***).

Para ilustrar a atividade leishmanicida dos análogos de alcalóides marinhos 3-alquil piridinas em amastigotas intracelulares, foram fotografadas as lamínulas correspondentes às concentrações de 10 μM de cada composto, a maior concentração utilizada nos testes (Figura 10). A análise desta figura permite verificar que quando comparado ao grupo controle (Figura 10a), no qual não houve adição de compostos, todas as substâncias foram capazes de reduzir o número de amastigotas presentes no interior dos macrófagos (Figuras 10b-e).

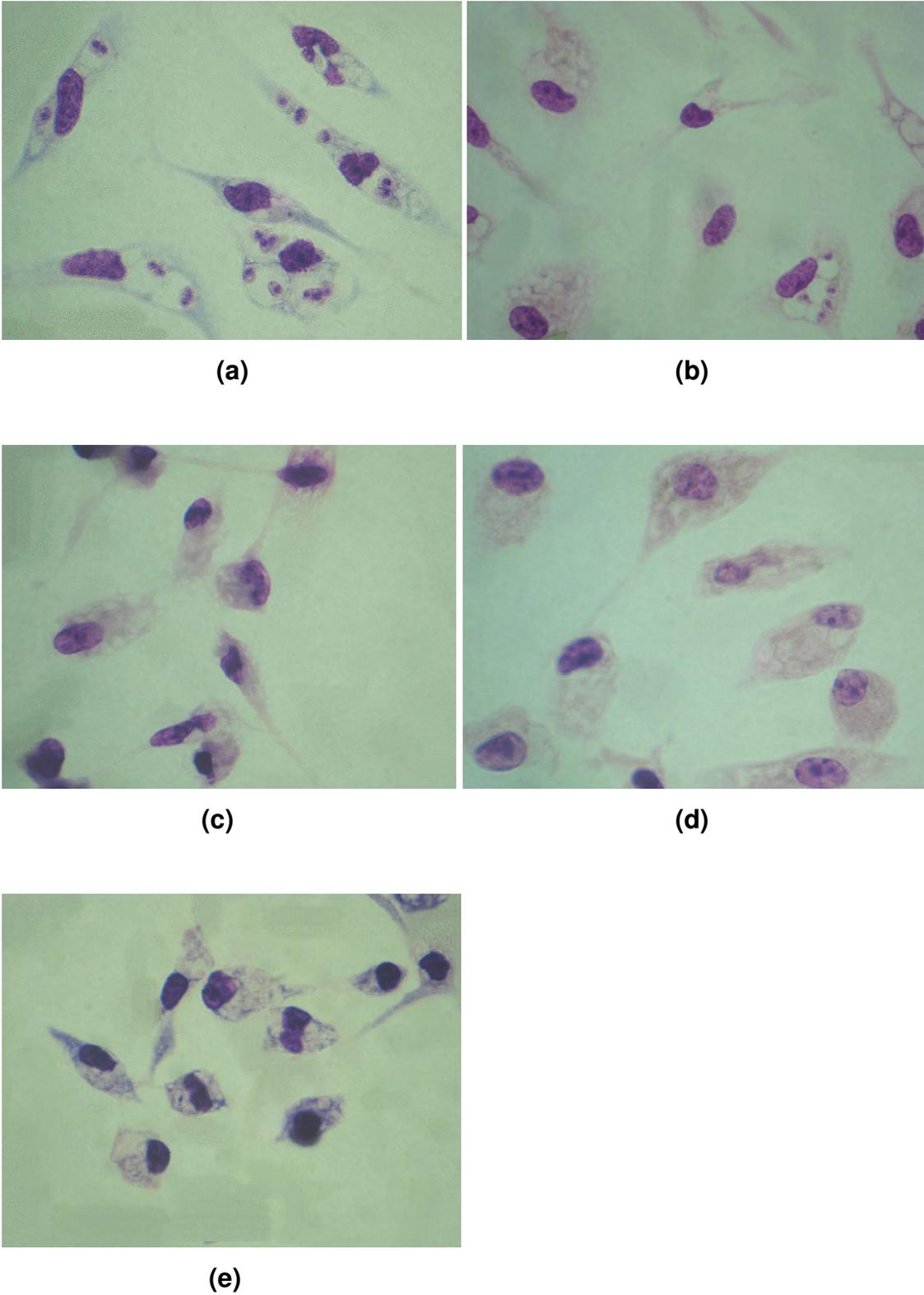


Figura 10: Fotomicrografia ilustrativa do efeito dos análogos de alcalóides marinhos 3-álquil piridinas sobre amastigotas de *L. amazonensis*, após 72 horas de tratamento com 10 μM de cada composto. (a) Controle, (b) composto 7, (c) composto 10, (d) composto 11 e (e) composto 12. Aumento de 1000 X.

É interessante ressaltar que os valores dos CI_{50} em formas amastigotas foram menores do que em formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 11), sugerindo uma ação específica dos compostos nos estágios intracelulares do parasito. A tabela 6 mostra os índices de especificidade (InEs) dos compostos 7, 10, 11 e 12, calculados pela divisão do CI_{50} em formas promastigotas pelo CI_{50} em formas amastigotas. A análise da tabela 6 mostra que dentre os compostos, o 10 foi o que apresentou maior especificidade contra formas amastigotas, sendo 16,8 vezes mais destrutível para as formas intracelulares de *L. amazonensis* (InEs = 16,80) do que para as formas extracelulares deste parasito.

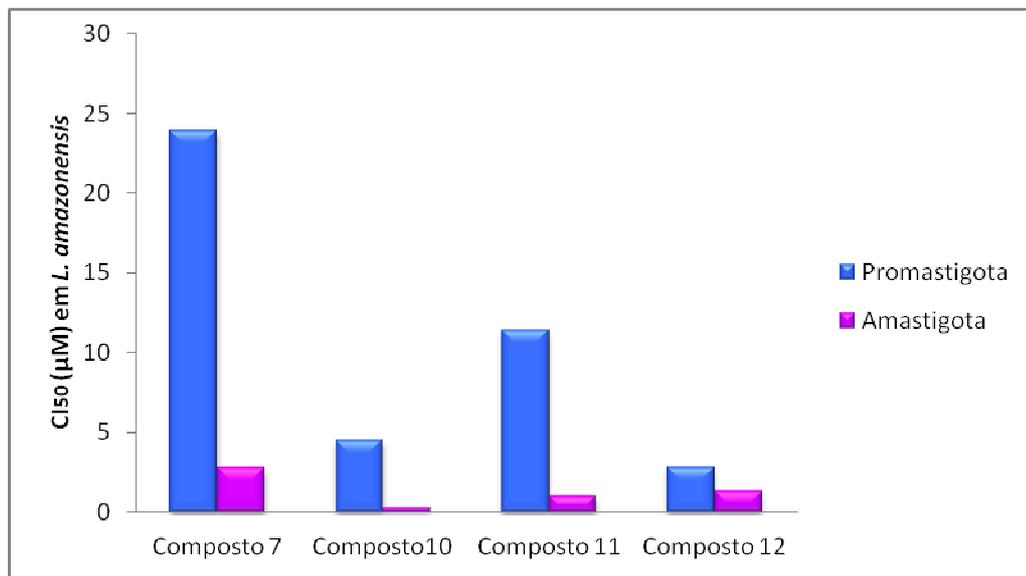


Figura 11: Comparação da atividade leishmanicida dos compostos 7, 10, 11 e 12 entre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 6: Índice de especificidade (InEs) dos compostos 7, 10, 11 e 12.

Composto	InEs ^a
7	8,60
10	16,80
11	11,07
12	2,16

^aÍndice de especificidade: razão entre CI_{50} em promastigota de *L. amazonensis* (Tabela 3) e CI_{50} em amastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 5).

Tendo em vista a significativa atividade e especificidade dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, é interessante pensar que poderia haver algum mecanismo modulador de resposta celular envolvido na ação desses compostos. Sabendo que o NO é uma importante molécula moduladora da resposta leishmanicida, o perfil de produção desta molécula foi mensurado, de maneira indireta, através da produção de nitrito, em cultura de macrófagos infectados com *L. amazonensis*, após 48 horas de tratamento com os compostos. Como pode ser verificado na figura 12, nenhum dos compostos testados em formas intracelulares, na maior concentração usada (10 μM), induziram significativa produção de NO, quando comparado ao controle (macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não tratados). Ao contrário, houve uma discreta inibição, em macrófagos infectados e tratados com os compostos **7**, **10**, **11** e **12**, dos níveis de produção de nitrito, representados por valores negativos. Entretanto estes valores foram considerados estatisticamente iguais aos do controle contendo macrófagos infectados com o parasito.

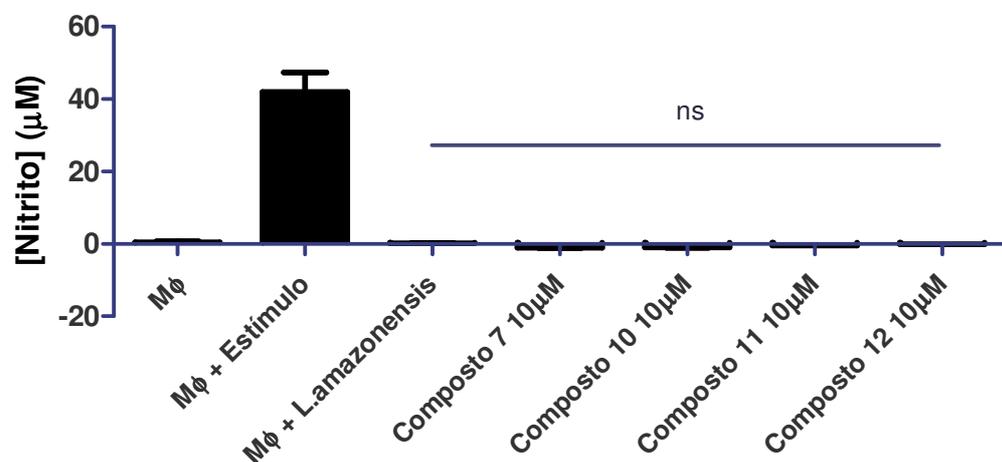


Figura 12: Avaliação dos níveis de NO produzido por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com os compostos **7**, **10**, **11** e **12**, na concentração de 10 μM . O controle positivo foi: macrófagos (M ϕ) + Estímulo (IFN- γ 0,9 ng/mL + LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: não significativo (ns).

4.2 Compostos sintéticos bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos

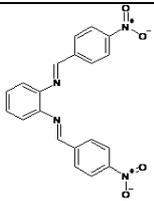
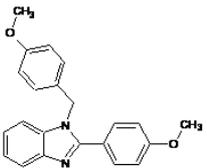
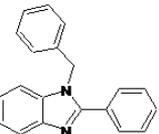
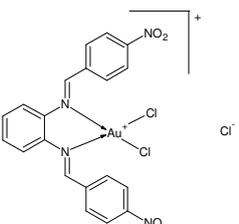
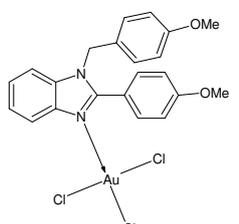
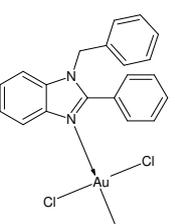
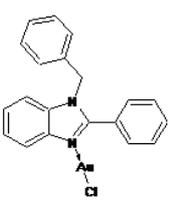
Para a avaliação da atividade leishmanicida de compostos bioisósteros do resveratrol, foram utilizadas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (manuscrito em preparação). Na tabela 7 constam os CI_{50} de cada composto em formas promastigotas desta espécie de *Leishmania*.

Como pode ser verificado, os bioisósteros **13**, **14** e **15** não apresentaram atividade antipromastigota. Quando tais compostos foram complexados com átomos de ouro, resultaram nos compostos **16**, **17**, **18** e **19**, sendo que a introdução do metal às moléculas induziu atividade leishmanicida. Dentre os análogos complexados, o mais ativo foi o composto **17**, obtido a partir do composto **14** complexado com ouro, que apresentou CI_{50} de 5,18 μ M.

Analisando a estrutura dos compostos **17** e **18**, os quais se originaram a partir do composto **14** e **15**, respectivamente, ambos complexados com um átomo de ouro, verifica-se que eles possuem estruturas químicas bastante semelhantes, porém o composto **17** possui dois grupos metoxila, sendo que cada um se liga a um anel aromático distinto. A presença destes grupamentos pode ser a explicação para o fato de tal composto ser mais ativo do que o composto **18**.

É interessante ressaltar que o estado de oxidação do metal também interferiu no efeito biológico dos compostos, pois a presença do ouro em seu estado de oxidação +1 no composto **19** (obtido a partir do composto **15**) garantiu uma atividade leishmanicida menor quando comparado ao composto **18**, que também se originou do composto **15** complexado com ouro, porém este metal aparece em seu estado de oxidação +3.

Tabela 7: Efeito dos bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos sobre promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	Estrutura Química	Cl ₅₀ (μM) ^a
13		>100,00
14		>100,00
15		>100,00
16		21,51 ± 1,97
17		5,18 ± 0,56
18		15,66 ± 0,86
19		42,19 ± 0,38
Miltefosina		21,39 ± 1,18
Anfotericina B		0,15 ± 0,009

^aCl₅₀ de cada composto corresponde à média de 3 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo programa Grafit.

Quanto à toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais, verifica-se, através da figura 13, que os compostos **17** e **18** foram os que se apresentaram mais tóxicos em células de mamíferos, inibindo mais de 60% dos macrófagos na máxima concentração testada (150 μM). Os demais compostos foram pouco tóxicos para os macrófagos, inibindo no máximo 40% da viabilidade dessas células na concentração de 150 μM .

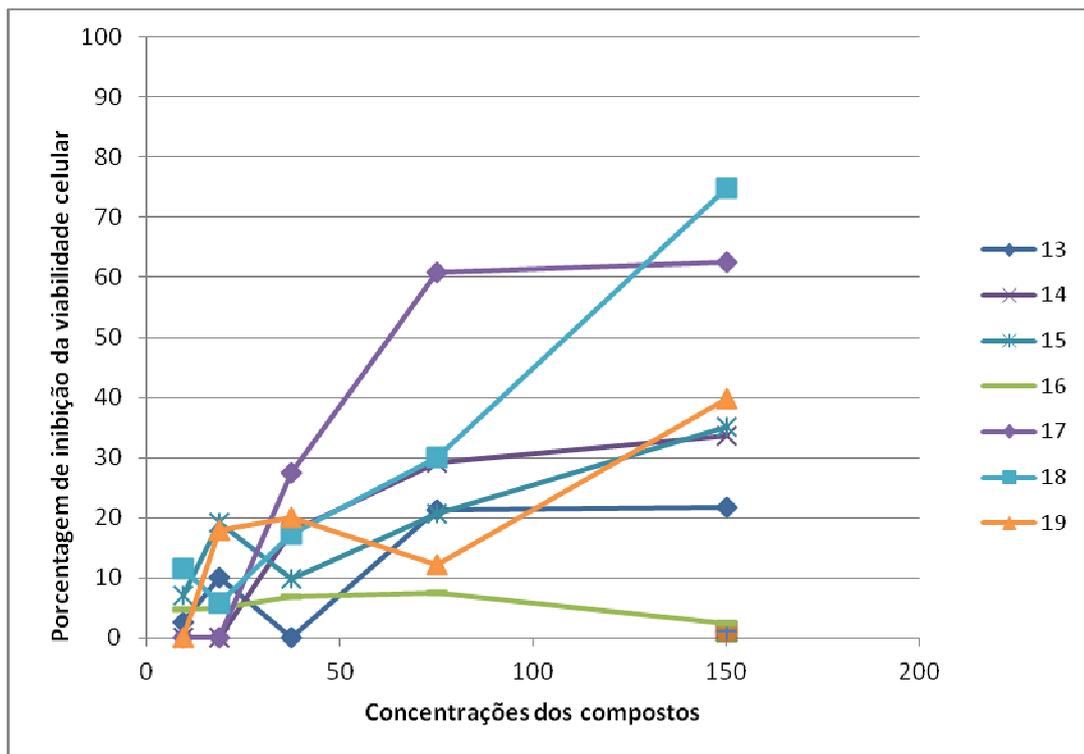


Figura 13: Porcentagem de inibição da viabilidade celular de macrófagos peritoneais após tratamento com os bioisómeros do resveratrol e seus complexos metálicos.

Ainda com relação à toxicidade dos bioisómeros do resveratrol em macrófagos, foram calculados os CC_{50} de cada composto (Tabela 8). Pode-se perceber que a maioria das moléculas apresentou $\text{CC}_{50} > 150 \mu\text{M}$, sendo que o composto **17** foi o que se mostrou mais tóxico, com CC_{50} de 60,28 μM .

Para avaliar a seletividade desses compostos, foi calculado o InSe em formas promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 8). Como pode ser verificado, apesar de alguns compostos terem se mostrado tóxicos em células de mamíferos (compostos **17** e **18**), todas as moléculas ativas em formas promastigotas, apresentaram InSe maior que três, indicando serem no mínimo três vezes mais tóxicas para o parasito do que para o macrófago.

Tabela 8: Efeito bioisósteros do resveratrol e seus complexos metálicos sobre macrófagos peritoneais e índice de seletividade (InSe) em promastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	CC ₅₀ (µM) ^a	InSe ^b
13	>150,00	-
14	>150,00	-
15	>150,00	-
16	>150,00	>6,97
17	60,28 ± 3,60	11,64
18	84,75 ± 13,83	5,41
19	>150,00	>3,55
Miltefosina	131,99 ± 3,95	6,17
Anfotericina B	85,81 ± 30,49	572,07

^aCC₅₀ de cada composto corresponde à média de 2 experimentos ± erro padrão. Calculado pelo Grafit.

^bÍndice de seletividade: razão entre CC₅₀ em macrófagos e CI₅₀ em promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 7).

Por terem apresentado significativa atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis* e por terem se mostrado mais tóxicos para o parasito do que para os macrófagos, os bioisósteros do resveratrol complexados com átomos de ouro foram selecionados para os testes em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Os compostos **16** e **19**, por não terem apresentado toxicidade em macrófagos até 150 µM, foram testados em amastigotas a partir da concentração de 100 µM, no entanto, os compostos **17** e **18**, como se mostraram tóxicos para as células hospedeiras (CI₅₀ de 60,28 e 84,75 µM, respectivamente), foram testados em amastigotas a partir da concentração de 50 µM.

Na tabela 9 estão representados os CI₅₀ desses compostos em amastigotas de *L. amazonensis* e os InSe de cada composto em amastigotas intracelulares. Tais resultados demonstraram que os compostos **16**, **17**, **18** e **19** apresentaram atividade em amastigotas de *L. amazonensis*, sendo que o composto **19** foi o que apresentou maior atividade anti-amastigota, com o menor CI₅₀ (= 5,77 µM). O maior efeito anti-amastigota do composto **19**, quando comparado aos demais compostos testados em formas amastigotas, pode ser atribuído à presença do metal em seu estado de oxidação +1, já que os compostos **16**, **17** e **18** possuem o metal no estado de oxidação +3. A presença de dois grupos metóxi ligados a dois anéis aromáticos

distintos garantiu ao composto **17** um efeito anti-amastigota melhor do que o composto **18** (Tabela 9).

Em relação à seletividade, os compostos **16**, **17**, **18** e **19** também foram mais destrutivos para as formas intracelulares de *L. amazonensis* do que para as células hospedeiras (Tabela 9). Como pode ser verificado, todos apresentaram InSe maior que 3, sendo portanto, no mínimo três vezes mais tóxicos para os amastigotas. É importante ressaltar ainda que o composto **19** se mostrou, no mínimo 26, vezes mais tóxico aos amastigotas (InSe > 26,00) do que aos macrófagos (Tabela 9).

Tabela 9: Efeito dos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro sobre amastigotas de *L. amazonensis* e índice de seletividade (InSe) em formas amastigotas de *L. amazonensis*.

Composto	CI ₅₀ (µM) ^a	InSe ^b
16	17,07 (14,42 - 20,21)	>8,79
17	16,25 (12,12 - 21,79)	3,71
18	25,95 (20,51 - 32,84)	3,26
19	5,77 (4,39 - 7,58)	>26,00
Miltefosina	4,15 (2,89 - 5,96)	31,80
Anfotericina B	0,18 (0,12-0,26)	476,72

^aCI₅₀ dos compostos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com intervalo de confiança. O valor do CI₅₀ corresponde à média de 2 experimentos. Calculado pelo método de Litchfield e Wilcoxon, através do programa Probit.

^bÍndice de seletividade: razão entre CC₅₀ em macrófagos (Tabela 8) e CI₅₀ em amastigotas de *L. amazonensis*.

Explorando ainda mais a atividade anti-amastigota dos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, foi calculado o InIn de *L. amazonensis* após o tratamento com os compostos (Figura 14). No geral, as moléculas testadas foram capazes de reduzir o InIn de maneira dose dependente. O composto **19** se mostrou mais efetivo, causando uma inibição de 99,80%, 98,50%, 92,25%, 78,60% e 63,83% do InIn nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 µM, respectivamente. O composto **16** também se mostrou efetivo, causando uma inibição de 97% e 86,6% do InIn, quando comparado ao grupo controle, nas concentrações de 100 e 50 µM, respectivamente. O composto **17** também apresentou boa inibição, inibindo 74,6% deste índice na concentração de 50 µM. Já o composto **18**, causou inibição significativa do InIn somente nas duas primeiras concentrações testadas (50 e 25 µM).

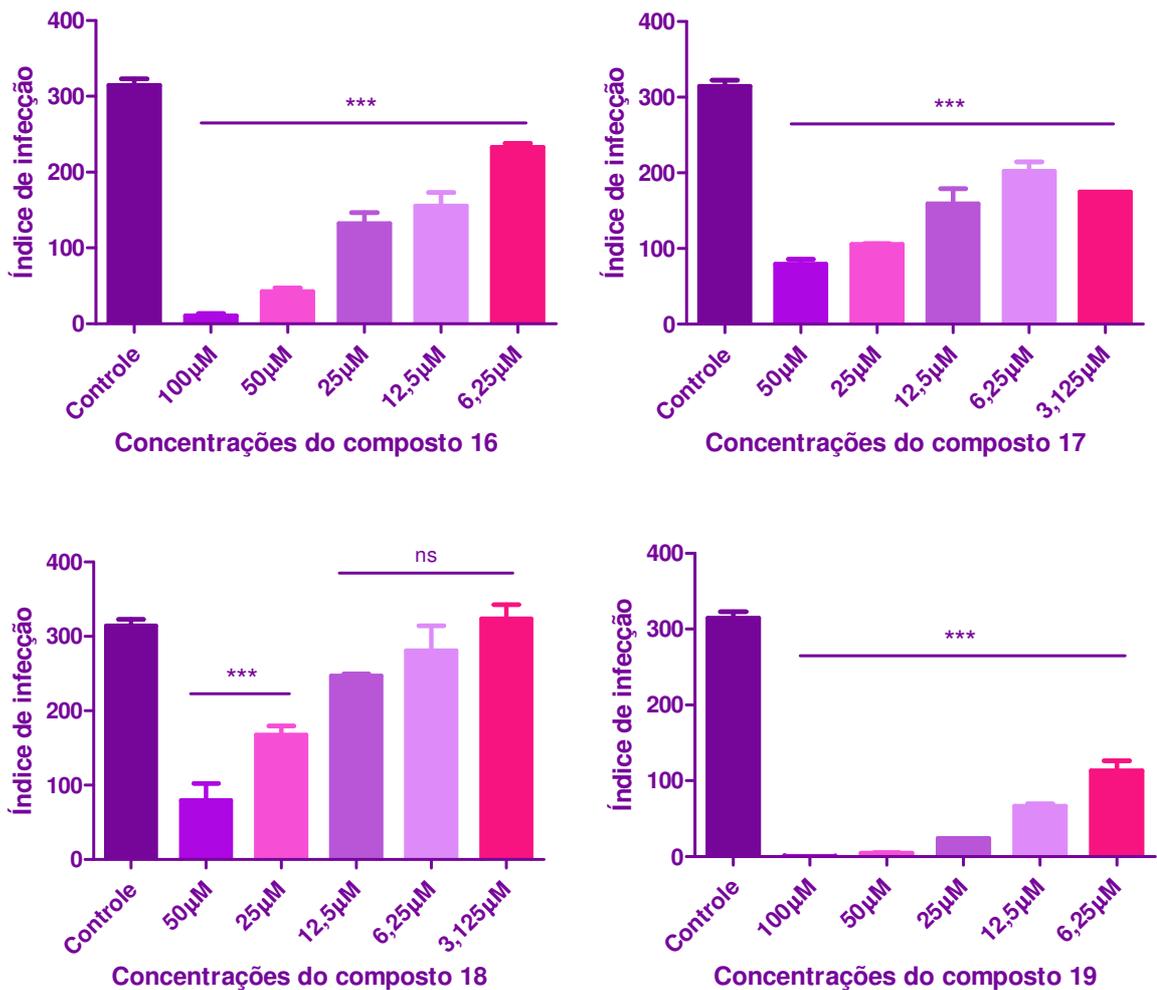


Figura 14: Efeito dos compostos **16**, **17**, **18** e **19** sobre amastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de tratamento. O índice de infecção foi calculado pela fórmula: % células infectadas x número total de amastigotas/número total de células. Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle foi analisado pelo pós-teste de Dunnett: $p < 0,0001$ (***) ; não significativo (ns).

Para ilustrar a ação dos compostos em amastigotas intracelulares, foram fotografadas as lamínulas correspondentes às concentrações mais elevadas de cada um dos compostos testados em amastigotas *L. amazonensis* (Figura 15). Todos os compostos (Figuras 15b-e), na maior concentração (100 ou 50 μM), foram capazes de reduzir o número de amastigotas no interior dos macrófagos, quando comparados ao grupo controle (Figura 15a).

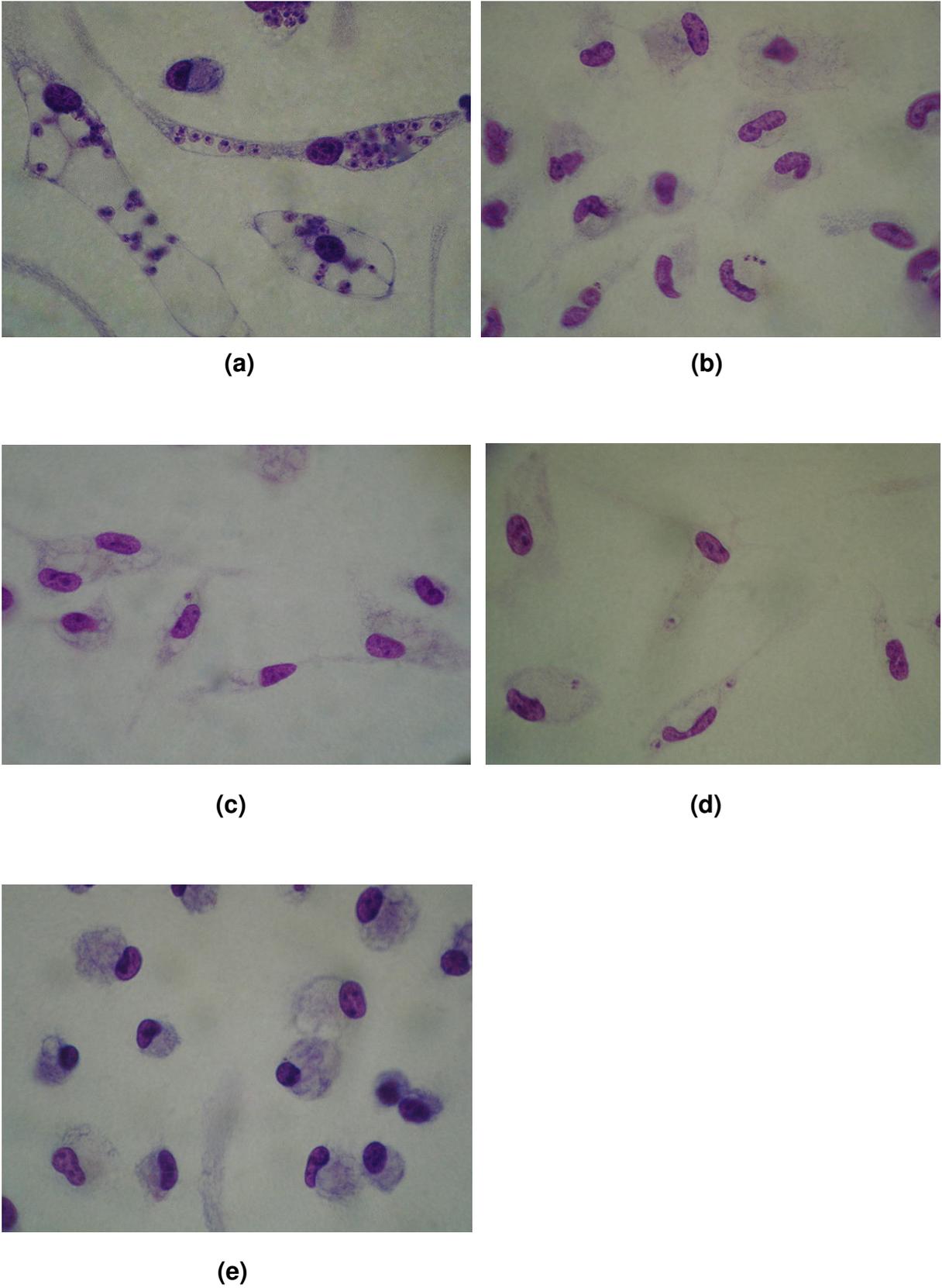


Figura 15: Fotomicrografia ilustrativa do efeito dos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro sobre amastigotas de *L. amazonensis*, após 72 horas de tratamento. **(a)** Controle, **(b)** composto **16** (100µM), **(c)** composto **17** (50µM) e **(d)** composto **18** (50µM) e **(e)** composto **19** (100µM). Aumento de 1000X.

A figura 16 mostra a comparação da atividade leishmanicida entre promastigotas e amastigotas das moléculas **16**, **17**, **18** e **19**. Os compostos **17** e **18** apresentaram maior atividade em promastigotas, já os compostos **16** e **19** mostraram-se mais efetivos contra amastigotas. A tabela 10 mostra o InEs, calculado pela razão entre CI_{50} em promastigotas e CI_{50} em amastigotas. Esta tabela mostra que o composto **19** foi o mais específico para o parasito em seu estágio intracelular, pois ele se mostrou cerca de sete vezes mais ativo em formas amastigotas (InEs = 7,31) do que em formas promastigotas.

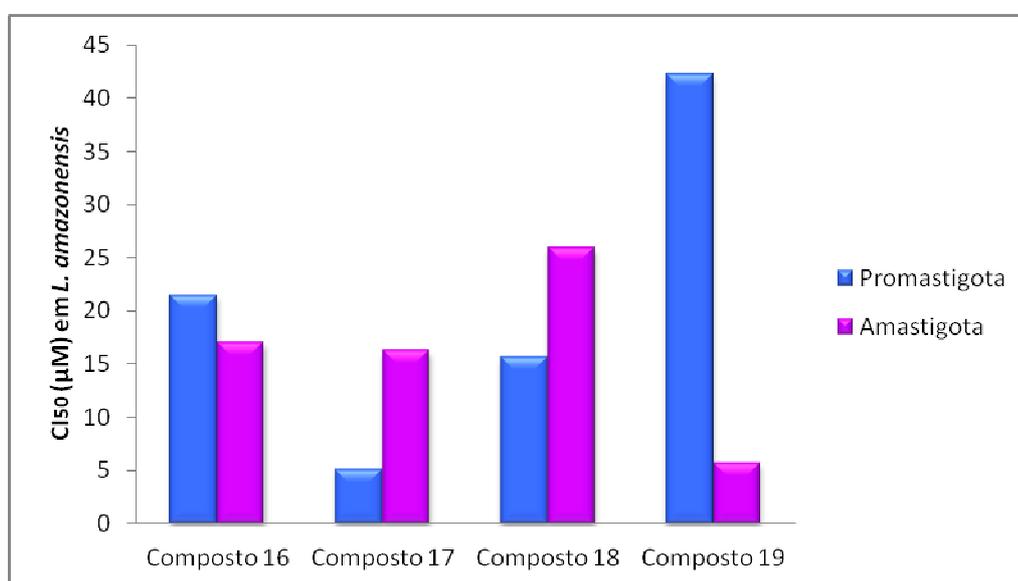


Figura 16: Comparação da atividade leishmanicida dos compostos **16**, **17**, **18** e **19** entre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 10: Índice de especificidade (InEs) dos bioisómeros do resveratrol complexados com átomos de ouro.

Composto	InEs ^a
16	1,26
17	0,32
18	0,60
19	7,31

^aÍndice de especificidade: razão entre CI_{50} em promastigota de *L. amazonensis* (Tabela 7) e CI_{50} em amastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 9).

Com o objetivo de avaliar as propriedades moduladoras de respostas celulares dos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, foi mensurada a produção de NO, de maneira indireta, em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento com os compostos. A figura 17 mostra que nenhum dos compostos testados em formas amastigotas de *L. amazonensis*, na maior concentração utilizada (100 ou 50 μM), induziram significativa produção de NO. Os níveis de NO produzidos na presença de qualquer um dos compostos foi comparado, através do pós-teste de Dunnett, com a concentração de NO no controle contendo macrófagos infectados sem tratamento e os valores obtidos nos tratados foram considerados estatisticamente iguais aos valores do controle, mostrando que os compostos não induziram a produção de NO por macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

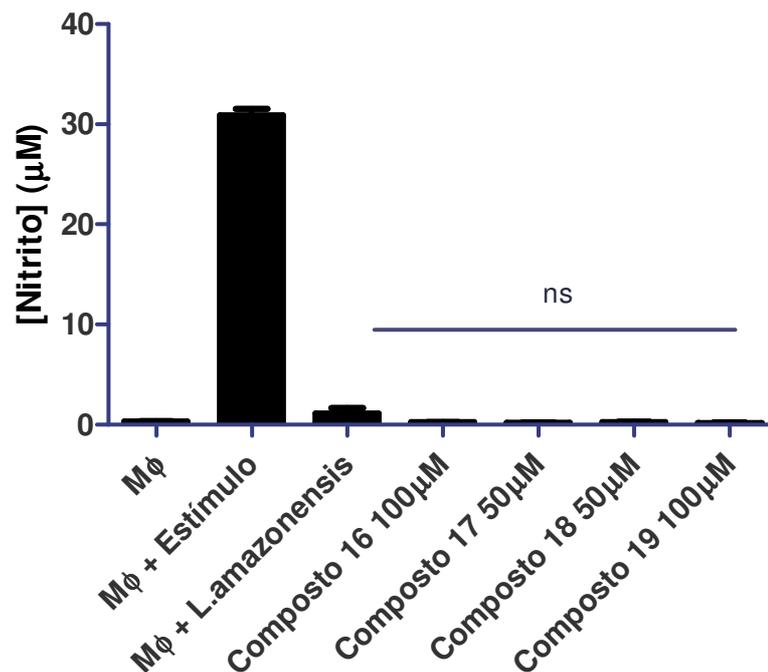


Figura 17: Avaliação dos níveis de NO produzido por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com os compostos **16**, **17**, **18** e **19**. O controle positivo foi: macrófagos (M ϕ) + Estimulo (LPS 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Análises estatísticas foram obtidas no *GraphPad Prism* versão 5.0 usando análise de variância (One-way ANOVA), no qual diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foram analisadas pelo pós-teste de Dunnett: não significativo (ns).

5 DISCUSSÃO

A quimioterapia das leishmanioses tem enfrentado inúmeros desafios, dentre os quais podemos destacar o aumento de resistência dos parasitos às drogas disponíveis, o elevado custo e toxicidade das mesmas, sejam elas de primeira ou de segunda escolha, e o limitado repertório de novas drogas (CHAWLA e MADHUBALA, 2010; MUKHOPADHYAY, SAHA e CHATTERJEE, 2012). Tendo em vista tal dificuldade, tem sido buscadas novas alternativas que possam substituir ou complementar a atual terapia (TIUMAN et al., 2011), visto que atualmente a quimioterapia tem sido um dos pilares de controle das leishmanioses.

Neste trabalho foram testados 19 compostos de origem sintética, sendo 12 análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas (compostos de **1-12**) e 7 bioisómeros do resveratrol (compostos de **13-19**), em *L. amazonensis*. Esta espécie é considerada de grande importância epidemiológica no Brasil devido às manifestações relacionadas a uma das mais graves formas da LC, que é a cutânea difusa (WHO, 2010).

Inicialmente, todos os compostos foram testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Tais formas, por serem extracelulares, são de fácil cultivo e constituem uma alternativa de baixo custo para a realização de triagem de novos compostos com possível atividade leishmanicida (TEMPONE, OLIVEIRA e BERLINCK, 2011). Dentro de cada um dos grupos testados algumas moléculas se mostraram bastante efetivas em formas promastigotas de *L. amazonensis*, podendo-se destacar os compostos **4** e **5** do grupo dos alcalóides marinhos, que apresentaram CI_{50} de 1,07 e 1,09 μM (Tabela 3), respectivamente. Em relação à série dos bioisómeros do resveratrol, destacam-se aqueles complexados a ouro, sendo o composto **17** o mais ativo, com CI_{50} de 5,18 μM (Tabela 7).

De acordo com Sánchez-Moreno e colaboradores (2011), testes com formas promastigotas são meramente indicativos de uma potencial atividade leishmanicida, pois este estágio do parasito não é encontrado no hospedeiro vertebrado. Além disso, como as formas extracelulares de *Leishmania* são significativamente mais suscetíveis aos efeitos induzidos por drogas do que amastigotas intracelulares, testes com promastigotas devem ser considerados preliminares. No intuito de

promover informações mais relevantes sobre a eficácia do composto, este teste deve ser complementado com um teste em formas intracelulares do parasito (TEMPONE, OLIVEIRA e BERLINCK, 2011). Vermeersch e colaboradores (2009) enfatizaram que o modelo de amastigota intracelular deve ser empregado como “padrão-ouro” para a avaliação da atividade leishmanicida *in vitro*, pois as formas amastigotas constituem o estágio do parasito encontrado nos hospedeiros mamíferos e são responsáveis pelas manifestações clínicas da doença. É interessante ressaltar que ensaios em amastigotas intracelulares são demorados e difíceis de serem realizados, pois envolvem inúmeras etapas ao longo de diversos dias (BRAGA, 2008).

Neste trabalho, compostos que apresentaram significativa atividade antipromastigota e maior seletividade ao parasito em relação à célula hospedeira, foram selecionados para serem testados em amastigotas de *L. amazonensis*. Para a realização do ensaio antiamastigota, macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento. De acordo com Tempone, Oliveira e Berlinck (2011) macrófagos peritoneais de camundongos constituem o modelo mais preciso para a realização de testes antiamastigota *in vitro*. Além disso, este modelo fornece resultados mais reprodutíveis e proporciona a obtenção de uma elevada taxa de infecção, o que é essencial para uma análise mais rigorosa da atividade leishmanicida.

Dentre os análogos de alcalóides marinhos, os compostos escolhidos foram **7**, **10**, **11** e **12**, enquanto dentre os bioisósteros do resveratrol os compostos **16**, **17**, **18** e **19** foram selecionados, ou seja, apenas os complexos de ouro com bioisósteros do resveratrol.

Todas as moléculas testadas em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, pertencentes ao grupo de análogos de alcalóides marinhos e de bioisósteros do resveratrol complexadas a ouro, foram efetivas, com CI_{50} variando de 0,27 a 25,95 μM (Tabelas 5 e 9). Além disto, todos os compostos apresentaram redução do índice de infecção, quando comparado ao controle não tratado, mostrando efeito não somente sobre o número de amastigotas, mas também sobre a porcentagem de macrófagos infectados (Figuras 9 e 14). Com relação aos análogos de alcalóides marinhos, o composto **10** foi o mais ativo em formas amastigotas de *L. amazonensis*, apresentando CI_{50} de 0,27 μM (Tabela 5). Esses

resultados, mostrando efetiva atividade leishmanicida de análogos de compostos marinhos, corroboram com os de outros autores, os quais relatam amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividade antiprotozoária (SANTOS et al., 2010; VEIGA-SANTOS et al., 2010). Quanto aos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, o composto mais ativo em amastigotas intracelulares foi o **19**, que apresentou CI_{50} de 5,77 μ M.

Em trabalho publicado por Lucas e Kolodziej (2013) o resveratrol foi testado em formas promastigotas e amastigotas de *L. major*. De acordo com este trabalho, o resveratrol, em concentrações abaixo de 153,2 μ M, mostrou moderada atividade em formas promastigotas, e, além disso, este composto promoveu significativa redução da carga de amastigotas intracelulares de maneira dose-dependente. No entanto, tal composto foi relativamente tóxico para a célula hospedeira. Tal fato fez com que os autores sugerissem que a atividade antiamastigota do resveratrol poderia estar mais relacionada ao efeito tóxico deste composto à célula hospedeira do que a uma atividade antiparasitária intrínseca. Vale ressaltar ainda que o resveratrol (obtido da Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) também foi testado no presente trabalho e, assim como seus bioisómeros, não apresentou significativa atividade leishmanicida. Na máxima concentração testada (100 μ M) o resveratrol inibiu a viabilidade celular de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* em 50,34% e 41,71%, respectivamente.

É interessante destacar que a complexação de átomos de ouro à bioisómeros do resveratrol sem atividade antipromastigota (compostos **13**, **14** e **15**), originando os compostos **16**, **17**, **18** e **19**, induziu significativo efeito antiparasitário (Tabela 7). Os íons metálicos têm apresentado variadas atividades biológicas, o que estimulou, em décadas passadas, o desenvolvimento de quimioterapias baseadas no uso de compostos contendo metais (BENÍTEZ et al., 2011). Um importante exemplo é o uso atual de complexos de platina para o tratamento de diversos tipos de câncer (CRAIG et al., 2012). Mais recentemente, um composto complexado à platina mostrou atividade leishmanicida, causando completa inibição do crescimento de amastigotas de *L. donovani* na concentração de 1 μ M (NAVARRO et al., 2010). Moléculas complexadas com vanádio apresentaram atividade em *Trypanosoma cruzi* e em promastigotas e amastigotas de *L. panamensis* e *L. chagasi* (BENÍTEZ et al., 2011). Em relação a compostos complexados com ouro, tem sido demonstrado significativo

efeito antitumoral em diversas linhagens de células de câncer humano (CRAIG et al., 2012; GALASSI et al., 2012).

Deve-se ressaltar ainda que o ouro, na forma de $K[AuCl_4]$, foi utilizado neste trabalho como material de partida para a formação dos complexos metálicos e este composto, quando testado em promastigotas de *L. amazonensis*, apresentou $CI_{50} = 22,77 \mu M$. Entretanto em amastigotas intracelulares o mesmo apresentou efeito leishmanicida somente na máxima concentração testada ($50 \mu M$), onde promoveu uma inibição de 64,69% da viabilidade celular. Nas demais concentrações testadas este metal não mostrou atividade leishmanicida significativa. Esses resultados permitem concluir que a união do ouro aos bioisósteros do resveratrol foi de suma importância para a potencialização do efeito em formas intracelulares de *L. amazonensis*.

Foram observadas diferenças de sensibilidade dos estágios do parasito à ação dos compostos testados. Os análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas mostraram-se mais ativos no parasito em seu estágio intracelular (Figura 11). Entretanto, como mostrado na figura 16, alguns bioisósteros do resveratrol complexados com ouro foram mais ativos em promastigotas (compostos **17** e **18**) e outros em amastigotas (compostos **16** e **19**). É comum ocorrer diferenças com relação à sensibilidade dos estágios do parasito *Leishmania* a uma variedade de drogas, visto que os mesmos têm diferentes hospedeiros, sendo os promastigotas encontrados habitando o intestino do inseto vetor e os amastigotas parasitando células do sistema monofagocítico de mamíferos. Portanto, estas formas apresentam-se morfológica e metabolicamente bem adaptadas aos distintos compartimentos de seus hospedeiros específicos. Estas implicações morfológicas e bioquímicas de promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp., podem remeter à diferenças de sensibilidade a uma grande variedade de compostos (CHAKRABORTY et al., 2010).

Escobar e colaboradores (2002) retrataram diferenças de sensibilidade entre formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani*, *L. aethiopica*, *L. tropica*, *L. mexicana*, *L. panamensis* e *L. major* aos efeitos da miltefosina, edelfosina e anfotericina B. Em relação aos antimoniais pentavalentes, amastigotas intracelulares são mais suscetíveis do que formas promastigotas (HALDAR, SEN e ROY, 2011). Além disto, Valiathan e colaboradores (2006) mostraram que amastigotas de isolados clínicos e de cepas padrão de *L. donovani* são de 2 a 60 vezes mais

suscetíveis ao estibogluconato de sódio do que promastigotas desta mesma espécie.

Em trabalho publicado recentemente, Muylder e colaboradores (2011) estabeleceram um ponto de corte com relação à especificidade dos compostos entre os dois estágios do parasito, onde foi calculado o índice de especificidade (InEs). De acordo com os autores, valores acima de 2,0 definem compostos mais ativos no estágio intracelular, valores abaixo de 0,4 definem compostos mais ativos em promastigotas e compostos com valores de especificidade entre 0,4 e 2,0 foram considerados ativos em ambos os estágios do parasito.

Baseando nestes dados, foi calculado o InEs de cada um dos compostos testados em ambos os estágios do parasito (Tabelas 6 e 10). Em relação aos análogos marinhos, os quatro compostos testados em amastigotas intracelulares apresentaram InEs maior que 2,0 (Tabela 6), sugerindo maior especificidade dessas moléculas em estágios intracelulares de *L. amazonensis*. Tal fato é de suma importância, já que os amastigotas são responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses. Dentre esses compostos, o **10** foi o que se mostrou mais específico ao parasito em seu estágio intracelular (InEs = 16,80), mostrando-se ser cerca de 17 vezes mais efetivo em amastigotas do que em promastigotas (Tabela 6). Estes resultados sugerem que a ação dos análogos de alcalóides marinhos em *L. amazonensis* envolve alvos específicos nos amastigotas intracelulares e/ou mecanismos relacionados à célula hospedeira, seja através de imunomodulação ou metabolização do composto em uma forma mais ativa. No entanto, pode-se ainda considerar a possibilidade de que o composto seja metabolizado em uma forma mais ativa, pelo próprio parasito intracelular. Os antimoniais pentavalentes, por exemplo, são considerados estágio específico, sendo que um dos mecanismos de ação sugere que o mesmo atue como pró-droga, sofrendo redução biológica a uma forma mais ativa contra os amastigotas, o antimônio trivalente, no entanto, não se sabe se esta redução é realizada pela célula hospedeira ou pelo amastigota (HALDAR, SEN e ROY, 2011).

Em relação aos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, pode-se dizer, que a maioria dos compostos apresentou InEs entre 0,4 e 2,0, sendo considerados ativos em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 10). Estes resultados sugerem alvos semelhantes nos dois estágios do parasito.

Durante as últimas décadas, a incidência de resistência aos compostos de antimônio em *Leishmania* tem aumentado significativamente, entretanto os mecanismos que contribuem para essa resistência são ainda pouco entendidos (MARY et al., 2010). De acordo com Ouellette e Papadopoulou (1993) diversas vias independentes podem contribuir para o fenótipo de resistência em *Leishmania*. A expressão aumentada de transportadores dependentes de energia parece ser a principal explicação para a ocorrência de resistência dos parasitos aos compostos de antimônio (PÉREZ-VICTORIA et al., 2001; MARY et al., 2010). Genes que codificam os receptores ABC (HAIMEURE et al., 2000; MARY et al., 2010) e genes multidroga resistente (MDR) (HENDERSON et al., 1992; MARY et al., 2010) têm se mostrado amplificados em cepas de parasitos resistentes a metais pesados. Além disso, genes relacionados à síntese da glutatona e da tripanotiona podem também estar amplificados em parasitos resistentes (GUIMOND et al., 2003; MARY et al., 2010).

Com relação à miltefosina, apesar de estar apresentando excelente eficácia em triagem clínica de fase 3 há quase uma década, sempre houve apreensão quanto ao surgimento de resistência à esta droga em virtude de seu longo período de eliminação (RIJAL et al., 2013). Em estudo recente foi mostrado uma discreta diminuição da eficácia da miltefosina, após uma década de uso deste composto para o tratamento da LV em Bihar, na Índia (SUNDAR et al., 2012).

Para avaliar a toxicidade dos compostos em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos retirados da cavidade peritoneal de camundongos Balb/c. Dos compostos análogos de alcalóides marinhos, a maioria apresentou elevada toxicidade em macrófagos (Tabela 4 e Figura 8). Estudos anteriores já tinham chamado atenção para a toxicidade de compostos derivados de organismos marinhos em células de mamíferos, como células 293T (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010) e P388 (NAKAO et al., 2004) e macrófagos da linhagem J774.1 (PIMENTEL-ELARDO et al., 2010) e J774G8 (SANTOS et al., 2010). É interessante apontar que alguns dos análogos marinhos testados neste trabalho já haviam sido testados em fibroblastos de pulmão humano e não se mostraram tóxicos para tal linhagem celular, possuindo CI_{50} acima de 50 μ M (HILÁRIO et al., 2011). Dados obtidos no nosso Laboratório têm indicado que macrófagos peritoneais são mais sensíveis a diversos compostos do que macrófagos da linhagem J774A1, incluindo derivados de mercaptopurina e aminoquinolinas.

Com relação à toxicidade dos bioisómeros do resveratrol, apenas dois compostos (**17** e **18**) apresentaram elevada toxicidade em macrófagos, matando mais de 60% das células na máxima concentração testada, que foi de 150 μM (Figura 13). Estudos realizados por Juan, Vinardell e Planas (2002) acerca da toxicidade do resveratrol em ratos, mostraram que tal composto é bem tolerado e não possui toxicidade elevada. Kedzierski e colaboradores (2007), testaram a toxicidade do composto 3,4,4',5'- tetrahidróxi-*trans*-stilbene, um análogo hidroxilado do resveratrol e verificaram que as duas concentrações mais baixas em que houve atividade leishmanicida (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) não afetaram células J774 após 48 horas de incubação, mas afetaram profundamente células mielóides da linhagem Sp2, e em menor grau, afetaram macrófagos peritoneais e fibroblastos.

Uma boa avaliação do efeito leishmanicida de drogas *in vitro* deve incluir a toxicidade em células de mamíferos e a correlação entre esta toxicidade e a atividade antiparasitária, o que é fornecido pelo índice de seletividade (InSe) (TEMPONE, OLIVEIRA e BERLINCK, 2011). Em relação ao InSe dos compostos testados, ambos análogos de alcalóides marinhos e bioisómeros do resveratrol contendo ouro, apresentaram elevada seletividade em amastigotas de *L. amazonensis*, sendo de três a no mínimo 36 vezes mais tóxico para os parasitos intracelulares do que para os macrófagos (Tabelas 5 e 9). Tempone, Oliveira e Berlinck (2011) consideram que candidatos leishmanicidas promissores devem ter InSe maior que 1, caso contrário os compostos são considerados mais tóxicos para as células de mamíferos. Assim, os resultados encontrados neste trabalho reforçam a importância da continuidade dos ensaios leishmanicidas dos análogos marinhos e dos complexos de ouro com bioisómeros do resveratrol.

O estudo acerca do mecanismo de ação de drogas fornece informações que poderão elucidar eventos farmacológicos importantes na ação dos compostos. Um dos mecanismos de ação de drogas em *Leishmania* envolve a indução da produção de NO por células hospedeiras infectadas, conduzindo a morte do parasito em virtude dos efeitos tóxicos do NO produzido pela iNOS (NAHREVANIAN et al., 2012). De acordo com os experimentos realizados no presente trabalho, pode-se concluir que nenhum dos compostos testados induziu a produção de NO por macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Figuras 12 e 17), o que sugere que a ação leishmanicida dos mesmos não é dependente da ativação de macrófagos com consequente produção de NO. Entretanto, considerando a baixa sensibilidade do

Método de Griess, estes experimentos deveriam ser repetidos com a utilização de macrófagos pré-estimulados com IFN- γ , para a confirmação desses dados.

Em estudo realizado por Huh e colaboradores (2007), o prodigiosin, um alcalóide marinho, apresenta atividade antiinflamatória, inibindo a produção de NO por macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS. Quanto ao resveratrol, estudos mostraram, que ele aumenta a bioatividade da eNOS e a produção de NO por esta enzima (LI, XIA e FÖRSTERMANN, 2012; NAKATA, TAKAHASHI e INOUE, 2012), no entanto, em trabalho publicado por Lucas e Kolodziej (2013), foi mostrado que o resveratrol inibiu fortemente a produção de NO por células hospedeiras não infectadas e estimuladas com IFN- γ e LPS.

O efeito de alcalóides de origem marinha em células tumorais tem sido atribuído à indução de apoptose (DYSHLOVOY et al., 2012; TABUNOKI et al., 2012) e interrupção do ciclo celular na fase G₂/M (AOKI et al., 2006; DYSHLOVOY et al., 2012). Estudos têm mostrado que o resveratrol pode inibir o crescimento de células tumorais pela inibição da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), uma proteína que estimula o crescimento celular (FABER et al., 2006) e reduzir o metabolismo de células cancerígenas, impedindo com isso a proliferação das mesmas (IQBAL e BAMEZAI, 2012). Compostos complexados com metais têm exibido atividade antitumoral através da habilidade de se ligar ao DNA da célula cancerígena, impedindo sua replicação (NAVARRO et al., 2011). Além disso, Fricker e colaboradores (2008) reportaram a capacidade de complexos metálicos inibirem enzimas de parasitos, como a cruzipain, a principal cisteína protease de *Trypanosoma cruzi*.

Com relação ao mecanismo de ação leishmanicida dos análogos de alcalóides marinhos e dos bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, mecanismos como a indução da produção de espécies reativas do oxigênio por macrófagos infectados ou simplesmente uma ação direta dos compostos sobre o parasito intracelular podem estar envolvidos. Sabendo que vias metabólicas de parasitos cinetoplastídeos, como *Leishmania* e *Trypanosoma*, são similares àquelas presentes em células tumorais, pode-se considerar uma correlação entre atividades antiparasitária e antitumoral (BENÍTEZ et al., 2011). Portanto, a ligação ao DNA, a interrupção do ciclo celular, a interferência com o metabolismo e a indução de apoptose podem ser um dos alvos desses compostos em *Leishmania*. No entanto,

para determinar o real mecanismo de ação desses compostos em *L. amazonensis*, é necessária a realização de outros ensaios complementares.

Neste trabalho, os análogos de alcalóides marinhos e bioisósteros do resveratrol complexados a ouro apresentaram significativa atividade leishmanicida. Estes resultados abrem perspectivas para ensaios experimentais *in vivo*, bem como o estudo do mecanismo de ação destes compostos, incluindo o possível envolvimento de outros eventos moduladores de resposta celular e também àqueles relacionados à morte do parasito por apoptose.

6 CONCLUSÕES

Em relação aos análogos de alcalóides marinhos e bioisómeros do resveratrol foi possível concluir que:

- 1) A maioria dos compostos testados apresentou efeito em formas promastigotas de *L. amazonensis*, destacando-se os compostos **4** e **5**, dos análogos de alcalóides marinhos e o composto **17**, dos bioisómeros do resveratrol complexados a ouro;
- 2) Dos doze análogos de alcalóides marinhos testados, oito mostraram-se altamente tóxicos para macrófagos, enquanto somente dois bioisómeros do resveratrol complexados a ouro apresentaram elevada toxicidade em tais células;
- 3) Em formas amastigotas de *L. amazonensis*, o composto **10** foi o mais efetivo dentre os análogos marinhos. Dentre os bioisómeros do resveratrol complexados com ouro, o composto **19** foi o mais ativo;
- 4) Todos os compostos apresentaram seletividade para o parasito intracelular quando comparados à célula hospedeira;
- 5) Todos os análogos de alcalóides marinhos e um bioisómero do resveratrol complexado com ouro (composto **19**) mostraram especificidade maior em amastigotas intracelulares do que em formas promastigotas;
- 6) O mecanismo de ação dos análogos de alcalóides marinhos e dos complexos de ouro com bioisómeros do resveratrol parece não depender da indução da produção de NO por macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam a atividade antiparasitária dos análogos de alcalóides marinhos 3-alkil piridinas e dos bioisómeros do resveratrol complexados a ouro em *L. amazonensis* e abrem perspectivas para o delineamento de novos compostos biologicamente ativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAM, I.; EL-SAYED, K.; CHEN, Z.; GUO, H. 2012. Current Status on Marine Products with Reversal Effect on Cancer Multidrug Resistance. **Marine Drugs**, 10: 2312-2321.
- AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, A. V.; NICODEMO, C. A. 2008. Mucosal leishmaniasis current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, 105: 1-9.
- ANDERSEN, E.M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVARRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J.D. 2005. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72: 133-137.
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. 2012. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, 31: 109-118.
- AOKI, S.; KONG, D. X.; SUNA, H.; SOWA, Y.; SAKAI, T.; SETIAWAN, A.; KOBAYASHI, M. 2006. Aaptamine, a spongean alkaloid, activates p21 promoter in a p53-independent manner. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 342 (1): 101-106.
- ASSIS, R.R.; IBRAIM, I.C.; NOGUEIRA, P.M.; SOARES, R.P.; TURCO, S.J. 2012. Glycoconjugates in New World species of *Leishmania*: Polymorphisms in lipophosphoglycan and glycoinositolphospholipids and interaction with hosts. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1820: 1354-1365.
- BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, 25 (2), 203-211.
- BARAK, E.; AMIN-SPECTOR, S.; GERLIAK, E.; GOYARD, S.; HOLLAND, N.; ZILBERSTEIN, D. 2005. Differentiation of *Leishmania donovani* in host-free system: analysis of signal perception and response. **Molecular and Biochemical Parasitology** 141: 99-108.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7 (3): 328-337.
- BATES, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, 37: 1097-1106.
- BAUR, J.A.; SINCLAIR, D.A. 2006. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature Reviews**, 5: 493-506.

BEATTIE, L.; KAYE, P.M. 2011. Leishmania-host interactions: what has imaging taught us? **Cellular Microbiology** **13** (11): 1659-1667.

BENÍTEZ, J.; BECCO, L.; CORREIA, I.; LEAL, S.M.; GUISET, H.; PESSOA, J.C.; LORENZO, J.; TANCO, S.; ESCOBAR, P.; MORENO, V.; GARAT, B.; GAMBINO, D. 2011. Vanadium polypyridyl compounds as potential antiparasitic and antitumoral agents: New achievements. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **105**: 303-312.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. 2004. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **53** (2): 158-166.

BOGDAN, A. I.; BAUMANN, L. 2009. Antioxidantes. **Revista Chilena de Dermatología**, **25** (1): 8-20.

BRAGA, F.G. 2008. **Atividade de derivados purínicos em *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi***. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Juiz de Fora. Juiz de Fora, Brasil, 102p.

CALABRESE, E.J.; MATTSON, M.P.; CALABRESE, V. 2010. Resveratrol commonly displays hormesis: Occurrence and biomedical significance. **Human and Experimental Toxicology**, **29** (12): 980-1015.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. 2003. Leishmanioses, feridas bravas e calazar. **Ciência e Cultura**, **1**: 34-37.

CANALES, E.; CARLSON, J.S.; APPLEBY, T.; FENAUX, M.; LEE, J.; TIAN, Y.; TIRUNAGARI, N.; WONG, M.; WATKINS, W.J. 2012. Tri-substituted acylhydrazines as tertiary amide bioisosteres: HCV NS5B polymerase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** **22**: 4288-4292.

CARVALHO, A.K.; SILVEIRA, F.T.; PASSERO, L.F.D.; GOMES, C.M.C.; CORBETT, C.E. ; LAURENTI, M.D. 2012. *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* promote differential expression of dendritic cells and cellular immune response in murine model. **Parasite Immunology**, **34**: 395-403.

CHAKRABORTY, B.; BISWAS, S.; MONDAL, S.; BERA, T. 2010. Stage Specific Developmental Changes in the Mitochondrial and Surface Membrane Associated Redox Systems of *Leishmania donovani* Promastigote and Amastigote. **Biochemistry**, **75** (4): 494-504.

CHAN, M.M. 2002. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, **63**: 99-104.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews/Microbiology**, **5**: 873-882.

CHAVALI, A.K.; BLAZIER, A.S.; TLAXCA, J.L.; JENSEN, P.A.; PEARSON, R.D.; PAPIN, J.A. 2012. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. **BMC Systems Biology**, **6**: 1-16.

CHAWLA, B.; MADHUBALA, R. 2010. Drug targets in *Leishmania*. **Journal of Parasitic Diseases**, **34 (1)**: 1-13.

CHOI, C.M.; LERNER, E.A. 2001. Leishmaniasis as an Emerging Infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, **6**: 175-182.

CHOW, C.; CLOUTIER, S.; DUMAS, C.; CHOU, M.N.; PAPADOPOULOU, B. 2011. Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2alpha kinase-dependent eIF2alpha phosphorylation. **Cellular Microbiology**, **13 (7)**: 1059-1077.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N.R. 2008. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** **41 (4)**: 424-427.

CRAIG, S.; GAO, L.; LEE, I.; GRAY, T.; BERDIS, A.J. 2012. Gold-Containing Indoles as Anticancer Agents That Potentiate the Cytotoxic Effects of Ionizing Radiation. **Journal of Medicinal Chemistry**, **55**: 2437-2451.

CROFT, S.L.; OLLIARO, P. 2011. Leishmaniasis chemotherapy - challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, **17**: 1478-1483.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. 2006. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, **19 (1)**: 111-126.

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**, **10**: 178-192.

CUTIGNANO, A., TRAMICE, A., DE CARO, S., VILLANI, G., CIMINO, G., FONTANA, A. 2003. Biogenesis of 3-alkylpyridine alkaloids in the marine mollusc *Haminoea Orbigynana*. **Angewandte Chemie International**, **42**: 2633-2636.

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

DEN BOER, M.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; ALVAR, J. 2011. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clinical Microbiology and Infection**, **17**: 1471-1477.

DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; DONHAUSER, N.; LORENZ, E.; LASKAY, T.; MACMICKING, J.; ROLLINGHOFF, M.; GRESSER, I.; BOGDAN, C. 1998. Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. **Immunity**, **8 (1)**: 77-87.

- DIEFENBACH, A.; SCHINDLER, H.; ROLLINGHOFF, M.; YOKOYAMA, W.M.; BOGDAN, C. 1999. Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity. **Science**, **284**: 951-955.
- DOCHERTY, J.J.; FU, M.M.; STIFFLER, B.S.; LIMPEROS, R.J.; POKABLA, C.M.; LUCIA, A.L. 1999. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. **Antiviral Research**, **43**: 145-155.
- DORLO, T.P.C.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, **67**: 2576-2597.
- DORLO, T.P.C.; VAN THIEL, P.P.A.M.; SCHOONE, G.J.; STIENSTRA, Y.; VAN VUGT, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. 2011. Dynamics of Parasite Clearance in Cutaneous Leishmaniasis Patients Treated with Miltefosine. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **5** (12): e1436.
- DYSHLOVOY, S.A.; NAETH, I.; VENZ, S.; PREUKSCHAS, M.; SIEVERT, H.; JACOBSEN, C.; SHUBINA, L.K.; SALAZAR, M. G.; SCHARF, C.; WALTHER, R.; KREPSTAKIES, M.; PRIYADARSHINI, P.; HAUBER, J.; FEDOROV, S.N.; BOKEMEYER, C.; STONIK, V.A.; BALABANOV, S.; HONECKER, F. 2012. Proteomic Profiling of Germ Cell Cancer Cells Treated with Aaptamine, a Marine Alkaloid with Antiproliferative Activity. **Journal of Proteome Research**, **11**: 2316-2330.
- EL-AGAMY, D.S. 2010. Comparative effects of curcumin and resveratrol on aflatoxin B1-induced liver injury in rats. **Archives of Toxicology**, **84**: 389-396.
- EL-METWALY, M.N.; REFAT, M.S. 2011. Elaborated ¹H NMR study for the ligitional behavior of two thiosemicarbazide derivatives towards some heavy metals (Sn(II), Sb(III), Pb(II) and Bi(III)), thermal, antibacterial and antifungal studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, **8**: 519-528.
- ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. 2002. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Tropica**, **81**: 151-157.
- FABER, A.C.; DUFORT, F.J.; BLAIR, D.; WAGNER, D.; ROBERTS, M.F.; CHILES, T.C. 2006. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated glucose metabolism coincides with resveratrol-induced cell cycle arrest in human diffuse large B-cell lymphomas. **Biochemical Pharmacology**, **72**: 1246-1256.
- FELCZYKOWSKA, A.; BLOCH, S.K.; NEJMAN-FALEŃCZYK, B.; BARAŃSKA, S. 2012. Metagenomic approach in the investigation of new bioactive compounds in the marine environment. **Acta ABP Biochimica Polonica**, **59**: 1-5.

- FERNÁNDEZ-PÉREZ, F.; BELCHÍ-NAVARRO, S.; ALMAGRO, L.; BRU, R.; PEDREÑO, M.A.; GÓMEZ-ROS, L.V. 2012. Cytotoxic Effect of Natural trans-Resveratrol Obtained from Elicited *Vitis vinifera* Cell Cultures on Three Cancer Cell Lines. **Plant Foods for Human Nutrition**, **67**: 422 - 429.
- FORTÉA, J.O.; PRINA, E.; LA LLAVE, E.; LECOEUR, H.; LANG, T.; MILON, G. 2007. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, **219**: 66-74.
- FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. 2009. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. **Molecules**, **14**: 2317-2336.
- FRICKER, S.P.; MOSI, R.M.; CAMERON, B.R.; BAIRD, I.; ZHU, Y.; ANASTASSOV, V.; COX, J.; DOYLE, P.S.; HANSELL, E.; LAU, G.; LANGILLE, J.; OLSEN, M.; QIN, L.; SKERLJ, R.; WONG, R.S.; SANTUCCI, Z.; MCKERROW, J.H. 2008. Metal compounds for the treatment of parasitic diseases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, **102**: 1839-1845.
- GALASSI, R.; BURINI, A.; RICCI, S.; PELLEI, M.; RIGOBELLO, M.P.; CITTA, A.; DOLMELLA, A.; GANDIN, V.; MARZANO, C. 2012. Synthesis and characterization of azolate gold(I) phosphane complexes as thioredoxin reductase inhibiting antitumor agents. **Dalton Transactions**, **41**: 5307-5318.
- GENESTRA, M.; DE SOUZA, W.J.S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L.L. 2003. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania* sp.. **Medical Microbiology and Immunology**, **192**: 217-223.
- GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CYSNE-FINKELSTEIN, A L.; VIGNÓLIO-ALVES, L.; LEON, L.L. 2003. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide**, **8**: 1-6.
- GENESTRA, M.; GUEDES-SILVA, D.; SOUZA, W.J.S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SOARES-BEZERRA, R.J.; MONTEIRO, F.P.; LEON, L.L. 2006. Nitric Oxide Synthase (NOS) Characterization in *Leishmania amazonensis* Axenic Amastigotes. **Archives of Medical Research**, **37**: 328-333.
- GIOVINAZZO, G.; INGROSSO, I.; PARADISO, A.; DE GARA, L.; SANTINO, A. 2012. Resveratrol biosynthesis: Plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. **Plant Foods for Human Nutrition**, **67**:191-199.
- GODINHO, J.L.P.; SIMAS-RODRIGUES, C.; SILVA, R.; ÜRMENYI, T.P.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J.C.F. 2012. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **International Journal of Antimicrobial Agents**, **39**: 326-331.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R. 2003. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36 (1)**: 71-80.

GOODWIN, L.G. 1995. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, **89**: 339-341.

GOODWIN, L.G.; PAGE, J.E. 1943. A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. **Biochemical Journal**, **22**: 236-240.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review 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**, **126**: 131-138.

GUIMOND, C.; TRUDEL, N.; BROCHU, C.; MARQUIS, N.; EL FADILI, A.; PEYTAVI, R.; BRIAND, G.; RICHARD, D.; MESSIER, N.; PAPADOPOULOU, B.; CORBEIL, J.; BERGERON, M.G.; LÉGARÉ, D.; OUELLETTE, M. 2003. Modulation of s gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA microarrays. **Nucleic Acids Research**, **31 (20)**: 5886-5896.

HAIMEUR, A.; BROCHU, C.; GENEST, P.A.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. 2000. sAmplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, **108 (1)**: 131-135.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S. 2011. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**, **2011**: 1-23.

HAMADA, Y.; KISO, Y. 2012. The application of bioisosteres in drug design for novel drug discovery: focusing on acid protease inhibitors. **Expert Opinion on Drug Discovery**; **7 (10)**: 903-922.

HENDERSON, D.M.; SIFRI, C.D.; RODGERS, M.; WIRTH, D.F.; HENDRICKSON, N.; ULLMAN, B. 1992. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr1 gene. **Molecular and Cellular Biology**, **12(6)**: 2855-2865.

HILÁRIO, F.F.; DE PAULA, R.C.; SILVEIRA, M.L.T.; VIANA, G.H.R.; ALVES, R.B.; PEREIRA, J.R.C.S.; SILVA, L.M.; DE FREITAS, R.P.; DE PILLA VAROTTI, F. 2011. Synthesis and evaluation of antimalarial activity of oxygenated 3-alkylpyridine marine alkaloid analogues. **Chemical Biology & Drug Design**, **78**: 477-482.

HORTA, M.F.; MENDES, B.P.; ROMA, E.H.; NORONHA, F.S.; MACÊDO, J.P.; OLIVEIRA, L.S.; DUARTE, M.M.; VIEIRA, L.Q. 2012. Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Parasitology Research**, **2012**: 1-11.

HOTEZ, P. J; MOLYNEUX, D. H; FENWICK, A; KUMARESAN, J; SACHS, S. E; SACHS, J. D; SAVIOLI, L. 2007. Control of neglected tropical diseases. **The New England Journal of Medicine**, **357**:1018-1027.

HUH, J.E.; YIM, J.H.; LEE, H.K.; MOON, E.Y.; RHEE, D.K.; PYO, S. 2007. Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF- κ B activation in murine peritoneal macrophages. **International Immunopharmacology**, **7**: 1825-1833.

IBIZA, S.; SERRADOR, J.M. 2008. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. **Inmunología**, **27 (3)**: 103-117.

IQBAL, M.A.; BAMEZAI, R.N.K. 2012. Resveratrol Inhibits Cancer Cell Metabolism by Down Regulating Pyruvate Kinase M2 via Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin. **Plos One**, **7 (5)**: e36764.

JUAN, M.E.; VINARDELL, M.P.; PLANAS, J.M. 2002. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. **Journal of Nutrition**, **132**: 257-260.

JUNG, H.J.; HWANG, I.A.; SUNG, W.S.; KANG, H.; KANG, B.S.; SEU, Y.B.; LEE, D.G. 2005. Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. **Archives of Pharmacal Research**, **28**: 557-560.

KAMHAWI, S.; RAMALHO-ORTIGAO, M.; PHAM, V.M.; KUMAR, S.; LAWYER, P.G.; TURCO, S.J.; BARILLAS-MURY, C.; SACKS, D.L.; VALENZUELA, J.G. 2004. A role for insect galectins in parasite survival. **Cell**, **119**: 329-341.

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

KEDZIERSKI, L.; CURTIS, J.M.; KAMINSKA, M.; JODYNIS-LIEBERT, J.; MURIA, M. 2007. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. **Parasitology Research**, **102**: 91-97.

KIKUTH, W.; SCHMIDT, H. 1937. Contribution to the progress of antimony therapy of kala-azar. **Chinese Medical Journal**, **52**: 425-432.

KOBAYASHI, J.; MURAYAMA, T.; OHIZUMI, Y.; SASAKI, T.; OHTA, T.; NOZOE, S. 1989. Theonelladins A~D, novel antineoplastic pyridine alkaloids from the okinawan marine sponge *Theonella swinhoei*. **Tetrahedron Letters**, **30**: 4833-4836.

KONECNY, P.; STARK, D.J. 2007. An Australian case of New World cutaneous leishmaniasis. **Medical Journal of Australia**, **186 (6)**: 315-317.

LAINSON, R. 1997. Leishmânia e leishmaniose, com particular referência à região Amazônica do Brasil. **Revista Paraense de Medicina**, **11 (1)**: 29-40.

- 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: Academic.
- LI, H.; XIA, N.; FÖRSTERMANN, U. 2012. Cardiovascular effects and molecular targets of resveratrol. **Nitric Oxide, 26:** 102-110.
- LINDOSO, J.A.; LINDOSO, A.A. 2009. Neglected tropical diseases in Brazil. **São Paulo Institute of Tropical Medicine, 51 (5):** 247-253.
- LININGTON, R.G.; GONZÁLEZ, J.; UREÑA, L.D.; ROMERO, L.I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, W.H. 2007. Venturamides A and B: antimalarial constituents of the Panamanian marine cyanobacterium *Oscillatoria* sp. **Journal of Natural Products, 70:** 397-401.
- LIN, H.Y.; TANG, H.Y.; DAVIS, F.B.; DAVIS, P.J. 2011. Resveratrol and apoptosis. **Annals of the New York Academy of Sciences, 1215:** 79-88.
- LUCAS, I.K.; KOLODZIEJ, H. 2013. In vitro Antileishmanial Activity of Resveratrol Originates from its Cytotoxic Potential against Host Cells. **Biological and Pharmacological Activity, 79 (1):** 20-26.
- MACHADO-COELHO, G.L.; CAIAFFA, W.T.; GENARO, O.; MAGALHAES, P.A.; MAYRINK, W. 2005. Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 99 (1):** 55-61.
- MALTEZOU, H.C. 2010. Drug resistance in visceral leishmaniasis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010:** 1-8.
- MARY, C.; FARAUT, F.; DENIAU, M.; DEREURE, J.; AOUN, K.; RANQUE, S.; PIARROUX, R. 2010. Frequency of Drug Resistance Gene Amplification in Clinical *Leishmania* Strains. **International Journal of Microbiology, 2010:** 1-8.
- MAYER, A.M.S., RODRÍGUEZ, A.D., BERLINCK, R.G.S., HAMANN, M.T. 2009. Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. **Biochimica et Biophysica Acta 1790:** 283-308.
- MCCALL, L.I.; ZHANG, W.W.; RANASINGHE, S.; MATLASHEWSKI, G. 2012. Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous *Leishmania donovani* isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. **Vaccine**, doi: 10.1016/j.vaccine.2012.11.065.

MCCONVILLE, M.J.; NADERER, T. 2011. Metabolic Pathways Required for the Intracellular Survival of *Leishmania*. **Annual Review of Microbiology**, **6**: 543-561.

MEANWELL, N.A. 2011. Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. **Journal of Medicinal Chemistry**, **54**: 2529-2591.

MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, K.C.S.; CARDOSO, M.L.; MONTEIRO, G.R.; OLIVEIRA, F.W.; CHAVANTE, S.F.; GUIMARAES, L.A.; ROCHA, H.A.; LEITE, E.L. 2008. Sulfated galactofucan from *Lobophora variegata*: Anticoagulant and anti-inflammatory properties. **Biochemistry**, **73**: 1018-1024.

MIKSTACKA, R.; RIMANDO, A.M.; IGNATOWICZ, E. 2010. Antioxidant effect of trans-resveratrol, pterostilbene quercetin and their combinations in human erythrocytes in vitro. **Plant Foods for Human Nutrition**, **65**: 57-63.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana. Diagnóstico Clínico e Diferencial. Disponível em: www.bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_ita. Acesso em 13 de março de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Disponível em: www.portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_Ita_2ed.pdf. Acesso em 7 de abril de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2010. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia Prático de tratamento da malária no Brasil. Disponível em: www.portal.saude.gov.br/guia_pratico_tratamento_malaria_brasil. Acesso em: 27 de dezembro de 2012.

MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção *Leishmania*-HIV. Disponível em: www.portal.saude.gov.br/portal/pdf/leishmania_hiv_web_25_01_11.pdf. Acesso em 24 de março de 2012.

MORAIS-TEIXEIRA, E.; DAMASCENO, Q.S.; GALUPPO, M.K.; ROMANHA, A.J.; RABELLO, A. 2011. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **106(4)**: 475-478.

MORALES, J.L.; CANTILLO-CIAU, Z.O.; SÁNCHEZ-MOLINA, I.; MENA-REJÓN, G.J. 2006. Screening of antibacterial and antifungal activities of six marine macroalgae from coasts of Yucatán Península. **Pharmaceutical Biology**, **44**: 632-635.

- MOSSMAN. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, **65**: 55-63.
- MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**, **240**: 286-296.
- MUKBEL, R.M.; PATTEN JR.,C.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D.E. 2007. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene** **76** (4): 669-675.
- MUKHOPADHYAY, D.; SAHA, P.; CHATTERJEE, M. 2012. Targets for immunochemotherapy in leishmaniasis. **Expert Reviews of Anti-infective Therapy**, **10**(3): 261-264.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. 2005. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, **366**:1561-1577.
- 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.
- NAHREVANIAN, H.; JALALIAN, M.; FARAHMAND, M.; ASSMAR, M.; ESMAEILI RASTAGHI A.R.; SAYYAH, M. 2012. Inhibition of Murine Systemic Leishmaniasis by Acetyl Salicylic Acid via Nitric Oxide Immunomodulation. **Iranian Journal of Parasitology**, **7** (2): 21-28.
- NAKAO, Y.; SHIROIWA, T.; MURAYAMA, S.; MATSUNAGA, S.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; FUSETANI, N. 2004. Identification of renieramycin as an antileishmanial substance in a marine sponge *Neopetrosia* sp. **Marine Drugs**, **2**: 55-62.
- NAKATA, R.; TAKAHASHI, S.; INOUE, H. 2012. Recent Advances in the Study on Resveratrol. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, **35** (3): 273-279.
- NAVARRO, M.; GABBIANI, C.; MESSORI, L.; GAMBINO, D. 2010. Metal-based drugs for malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis: recent achievements and perspectives. **Drug Discovery Today**, **15**: 1070-1078.
- NORMAN, F.F.; PÉREZ DE AYALA, A.; PÉREZ- MOLINA, J.A.; MONGE-MAILLO, B.; ZAMARRÓN, P.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. 2010. Neglected Tropical Diseases outside the Tropics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **4** (7): e762.
- NORO, J.C.; KALAITZIS, J.A.; NEILAN, B.A. 2012. Bioactive Natural Products from Papua New Guinea Marine Sponges. **Chemistry & Biodiversity**, **9**: 2077-2095.

- NYUNT, K.S.; ELKHATEEB, A.; TOSA, Y.; NABATA, K.; KATAKURA, K.; MATSUURA, H. 2012. Isolation of antitrypanosomal compounds from *Vitis repens*, a medicinal plant of Myanmar. **Natural Product Communications**, **7 (5)**: 609-610.
- OLIVEIRA, C.I.; BRODSKYN, C.I. 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontier in Immunology**, **3**: artigo 145, 9 páginas.
- 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**, doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007.
- ORHAN, I.; ŞENER, B.; KAISER, M.; BRUN, R.; TASDEMIR, D. 2010. Inhibitory Activity of Marine Sponge-Derived Natural Products against Parasitic Protozoa. **Marine Drugs**, **8**: 47-58.
- OUELLETTE, M.; PAPADOPOULOU, B. 1993. Mechanisms of drug resistance in *Leishmania*. **Parasitology Today**, **9 (5)**: 150-153.
- OZKOC, S.; TUNCAY, S.; DELIBAS, S.B.; AKISU, C. 2009. *In vitro* effects of resveratrol on *Trichinella spiralis*. **Parasitology Research**, **105**: 1139-1143.
- PARIS, C.; LOISEAU, P.M.; BORIES, C.; BREARD, J. 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **48**: 852-859.
- PELISSARI, D.M.; CECHINEL, M.P.; SOUZA-GOMES, M.L.; LIMA JUNIOR, F.E.F. 2011. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde** **20 (1)**: 107-110.
- PILLAI, A.B.; XU, W.; ZHANG, O.; ZHANG, K. 2012. Sphingolipid Degradation in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, **6 (12)**: e1944.
- PÉREZ-VICTORIA, J.M.; PARODI-TALICE, A.; TORRES, A.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S. 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. **International Microbiology**, **4 (3)**: 159-166.
- PIMENTEL-ELARDO, S.M.; KOZYTSKA, S.; BUGNI, T.S.; IRELAND, C.M.; MOLL, H.; HENTSCHEL, U. 2010. Anti-parasitic compounds from *Streptomyces* sp. strains isolated from Mediterranean sponges. **Marine Drugs**, **8**: 373-380.
- POULOS, T.L.; LI, H. 2012. Structural Basis for Isoform-Selective Inhibition in Nitric Oxide Synthase. **Accounts of Chemical Research**, doi: 10.1021/ar300175n.
- PRUDHOMME, J.; MCDANIEL, E.; PONTS, N.; BERTANI, S.; FENICAL, W.; JENSEN, P.; LE ROCH, K. 2008. Marine Actinomycetes: A New Source of Compounds against the Human Malaria Parasite. **PLoS ONE** **3(6)**: e2335.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JUNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G. 2003. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, 26: 550-555.

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

RIJAL, S.; OSTYN, B.; URANW, S.; RAI, K.; BHATTARAI, N.R.; DORLO, T.P.C.; BEIJNEN, J.H.; VANAERSCHOT, M.; DECUYPERE, S.; DHAKAL, S.S.; LAL DAS, M.; KARKI, P.; SINGH, R.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C. 2013. Increasing failure of miltefosine in the treatment of kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, re-infection or non-compliance. **Clinical Infectious Diseases**, doi: 10.1093/cid/cit102.

RIVERO, A. 2006. Nitric oxide: an antiparasitic molecule of invertebrates. **Trends in Parasitology**, 22 (5): 219-225.

RUBIANO, L.C.; MIRANDA, M.C.; ARENAS, S.M.; MONTERO, L.M.; BARRAQUER, I.R.; GARCERANT, D.; PRAGER, M.; OSORIO, L.; ROJAS, M.X.; PÉREZ, M.; NICHOLLS, R.S.; SARAIVIA, N.G. 2012. Noninferiority of Miltefosine Versus Meglumine Antimoniate for Cutaneous Leishmaniasis in Children. **The Journal of Infectious Diseases**, 205: 684-692.

RUSSO, R.; LAGUNA, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; MEDRANO, F.J.; ROSENTHAL, E.; CACOPARDO, B.; NIGRO, L. 2003. Visceral leishmaniasis in those infected with HIV: clinical aspects and other opportunistic infections. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 97: 99-105.

SACKS, D.L. 2001. *Leishmania*-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cell Microbiology**, 3: 189-196.

SÁNCHEZ-MORENO, M.; GÓMEZ-CONTRERAS, F.; NAVARRO, P.; MARÍN, C.; RAMÍREZ-MACÍAS, I.; OLMO, F.; SANZ, A.M.; CAMPAYO, L.; CANO, C.; YUNTA, M.J.R. 2011. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* and *Leishmania braziliensis* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 67 (2): 387-397.

SANTOS, A.O.; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. 2010. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, 29: 2733-2743.

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R.; 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.

SHANG, Y.J.; QIAN, Y.P.; LIU, X.D.; DAI, F.; SHANG, X.L.; JIA, W.Q.; LIU, Q.; FANG, J.G.; ZHOU, B. 2009. Radical-Scavenging Activity and Mechanism of Resveratrol-Oriented Analogues: Influence of the Solvent, Radical, and Substitution. **The Journal of Organic Chemistry**, **74**: 5025-5031.

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.

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

SINHA, P.K.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.; NATH, D.; MUKHERJEE, S.; ADITYA, A.K.; SUNDAR, S. 2011. Phase 4 Pharmacovigilance Trial of Paromomycin Injection for the Treatment of Visceral Leishmaniasis in India. **Journal of Tropical Medicine**, **2011**: 1-7.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. 2004. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **40**: 139-149.

SON, I.H.; CHUNG, I.M.; LEE, S.; MOON, H.I. 2007. Antiplasmodial activity of novel stilbene derivatives isolated from *Parthenocissus tricuspidata* from South Korea. **Parasitology Research**, **101**: 237-241.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V.K.; SINGH, A.K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN J.C.; CHAKRAVARTY, J. 2012. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**, **55(4)**: 543-550.

TABUNOKI, H.; SAITO, N.; SUWANBORIRUX, K.; CHARUPANT, K.; SATOH, J. 2012. Molecular network profiling of U373MG human glioblastoma cells following induction of apoptosis by novel marine-derived anti-cancer 1,2,3,4 tetrahydroisoquinoline alkaloids. **Cancer Cell International**, **12**: artigo 14, 16 páginas.

TEMPONE, A.G.; OLIVEIRA, C.M.; BERLINCK, R.G.S. 2011. Current Approaches to Discover Marine Antileishmanial Natural Products. **Planta Medica**, **77**: 572-585.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D.; NAKAMURA, C.V. 2011. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, **15**: 525-532.

URBINA, J. 1997. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, **114**: 91-99.

UTZINGER, J.; BECKER, S.L.; KNOPPA, S.; BLUMB, J.; NEUMAYR, A.L.; KEISER, J.; HATZ, C.F. 2012. Neglected tropical diseases: diagnosis, clinical management, treatment and control. **Swiss Medical Weekly**, **142**: w13727, 24 páginas.

VALIATHAN, R.; DUBEY, M.L.; MAHAJAN, R.C.; MALLA N. 2006. *Leishmania donovani*: Effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. **Experimental Parasitology, 114**: 103-108.

VAN ASSCHE, T.; DESCHACHT, M.; LUZ, R.A.I.; MAES, L.; COS, P. 2011. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine, 51**: 337-351.

VEIGA-SANTOS, P.; ROCHA, K.J.P.; SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS-FILHO, B.P.; SILVA, S.O.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E.M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. 2010. In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. **Parasitology, 137**: 1661-1670.

VERMA, K.; DEY, C. 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy 48**: 3010-3015.

VERMEERSCH, M.; LUZ, R.I.; TOTÉ, K.; TIMMERMANS, J.P.; 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 53**: 3855-3859.

VOLK, C.A.; KOCK, M. 2004. Viscosoline: new 3-alkyl pyridinium alkaloid from the Arctic sponge *Haliclona viscosa*. **Organic & Biomolecular Chemistry, 2**: 1827-1830.

WANG, H.; ZHANG, H.; TANG, L.; CHEN, H.; WU, C.; ZHAO, M.; YANG, Y.; CHEN, X.; LIU, G. 2013. Resveratrol inhibits TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis. **Toxicology, 303**: 139-146.

WEIGLE, K.; SARAIVA, N.G. 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology, 14 (5)**: 433-450.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G.J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. 2001. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology, 78**: 193-200.

WHO 2010. Technical Report Series, 949. **Control of the leishmaniasis**. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf. Acesso em 10 de março de 2012.

WHO 2013. **Tropical diseases**. Disponível em: http://www.who.int/topics/tropical_diseases/en/. Acesso em 14 de janeiro de 2013.

YANG, H.; HENDRICKS, R.T.; ARORA, N.; NITZAN, D.; YEE, C.; LUCAS, M.C.; YANG, Y.; FUNG, A.; RAJYAGURU, S.; HARRIS, S.F.; LEVEQUE, V.J.P.; HANG, J.Q.; LE POGAM, S.; DEBORAH REUTER, D.; TAVARES, G.A. 2010. Cyclic amide bioisosterism: Strategic application to the design and synthesis of HCV NS5B polymerase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **20**: 4614-4619.

ZUBIA, M.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRIN, Y. 2007. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, México. **Journal of Applied Phycology**, **19**: 449-458.

ANEXO

Artigo publicado:

MACHADO, P.A.; HILÁRIO, F.F.; CARVALHO, L.O.; SILVEIRA, M.L.T.; ALVES, R.B.; FREITAS, R.P.; COIMBRA, E.S. 2012. Effect of 3-Alkylpyridine Marine Alkaloid Analogues in *Leishmania* Species Related to American Cutaneous Leishmaniasis. **Chemical Biology & Drug Design**, **80**: 745-751.