

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA, MICROBIOLOGIA E
IMUNOLOGIA.

Flávia Márcia de Castro e Silva

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
AMINOQUINOLINICOS E EFEITO IMUNOMODULATÓRIO EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *L. MAJOR*.**

Juiz de Fora – MG
2010

FLÁVIA MÁRCIA DE CASTRO E SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
AMINOQUINOLINICOS E EFEITO IMUNOMODULATÓRIO EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *L. MAJOR*.**

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

**Orientadora: Dr^a Elaine Soares Coimbra
Co-Orientador: Dr. Adilson David da Silva**

Juiz de Fora
2010

Silva, Flávia Márcia de Castro e.

Atividade leishmanicida de derivados aminoquinolínicos e efeito imunomodulatório em macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania amazonensis* e *L. major* / Carlos Eduardo De Martin Silva. – 2010. 98f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)—Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

1. Leishmaniose. 2. Imunidade. 3. Parasitologia. I. Título.

CDU 616.993.161

Flávia Márcia de Castro e Silva

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS
AMINOQUINOLINICOS E EFEITO IMUNOMODULATÓRIO EM
MACRÓFAGOS PERITONEAIS INFECTADOS COM
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *L. MAJOR*.**

Universidade Federal de Juiz de fora, como parte dos requisitos do Curso de Pós-Graduação Ciências Biológicas, para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia. Aprovada em 05 de Março de 2010, pela Banca Examinadora composta por:



Doutora Elaine Soares Coimbra (Universidade Federal de Juiz de Fora).



Doutor Marcos José Marques (Universidade Federal de Alfenas).



Doutor Adilson David da Silva (Universidade Federal de Juiz de Fora).

DEDICATÓRIA

“Se você abre uma porta, você pode ou não entrar em uma nova sala. Você pode não entrar e ficar observando a vida. Mas se você vence a dúvida, o temor, e entra, dá um grande passo: nesta sala vive-se! Mas, também, tem um preço... São inúmeras outras portas que você descobre. Às vezes curte-se mil e uma. O grande segredo é saber quando e qual porta deve ser aberta. A vida não é rigorosa, ela propicia erros e acertos. Os erros podem ser transformados em acertos quando com eles se aprende. Não existe a segurança do acerto eterno. A vida é generosa, a cada sala que se vive, descobre-se tantas outras portas. E a vida enriquece quem se arrisca a abrir novas portas. Ela privilegia quem descobre seus segredos e generosamente oferece afortunadas portas. Mas a vida também pode ser dura e severa. Se você não ultrapassar a porta, terá sempre a mesma porta pela frente. É a repetição perante a criação, é a monotonia monocromática perante a multiplicidade das cores, é a estagnação da vida... Para a vida, as portas não são obstáculos, mas diferentes passagens”.

Içami Tiba

AGRADECIMENTOS

A Deus sob todas as formas.

*Em todas as portas que foram abertas ou que por algum motivo não quis abri-las, de alguma forma você Gilmar estava junto comigo, me apoiando, me confortando, vocês fazem parte de todas as minhas decisões, é por vocês que eu as tomo,
Eu os amo*

*A minha amada família, Gilmar, meu marido,
Bernardo e Gustavo, meus queridos filhos.*

A Elaine Soares Coimbra, minha querida orientadora
“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina” (Cora Coralina),
pela sua dedicação em minha orientação, compreensão e conhecimento. E acima de
tudo, *“por me orientar como abrir as portas.”*

A Coordenadora do Mestrado Prof^a Ana Paula Ferreira, “por me abrir a primeira
porta”

Ao professor Adilson Silva e Arturene, por fornecer os compostos utilizados em
nossos estudos.

A minha família, principalmente aos meus pais, que nestes anos sentiram a minha
ausência e me apoiaram incondicionalmente, e as minhas irmãs Cristina e
Fernanda.

Tenho tantos nomes na memória, que no fim, receio que alguém fique esquecido nestas páginas.

“A gente não faz amigos, reconhece-os”
(Vinícius de Moraes)

Ao meu braço direito e ao meu braço esquerdo dentro do laboratório, Patrícia e Luciana, minha duas “pequenas” amigas que conquistei nestes dois anos de mestrado, e que me ajudaram de todas formas, com elas aprendi, chorei, sorri, e superei minhas dificuldades.

A Carol, pelos primeiros ensinamentos dentro do laboratório.

A Wallace, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por alguns procedimentos básicos, nos quais foram essenciais para o desenvolvimento de protocolos nesta dissertação. Pela amizade que se estreita, a cada enorme interrogatório...

A Sandra Bertelli e Caio, por estarem sempre dispostos a nos ajudar nos ensaios imunológicos e análise dos resultados.

A professora Jaci, Imunologista compreensão e análise dos resultados.

As amigas do laboratório de parasitologia que de alguma forma também sempre estavam presentes, Nicoli e Marcela, Lili, Lidiane, Therlen.

A Letícia da secretaria a Alice da imunologia, que de alguma forma contribuíram, e também pela amizade.

A Cristina, técnica de laboratório, por cuidar de todo material utilizado em nossos experimentos e pelas primeiras técnicas de laboratório.

A Tia Dilma e Tio Carlos Augusto, minha família, que na hora do aperto, eu recorria a eles.

As minhas amigas Michele, Marlice, Ivana e pelo apoio.

A minha grande amiga Rosely, “*onde tudo começou*”.

RESUMO

As leishmanioses são doenças infecto parasitárias que atingem aproximadamente 12 milhões de pessoas em 88 países em todo o mundo, incluindo o Brasil. Esta doença é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, as quais invadem e se multiplicam dentro de macrófagos no hospedeiro vertebrado. Ainda não existe vacina e a quimioterapia é baseada principalmente nos antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina. Entretanto, estas drogas tem uso limitado devido a toxicidade, longo tempo de tratamento e alto custo. Portanto, existe uma necessidade urgente de desenvolvimento de novas drogas para as leishmanioses. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida de 12 derivados de aminoquinolinas, mais especificamente 4-amino-7-cloro-quinolinas, as quais apresentam grupos diaminas mono e di substituídas com alquil alcino. Em análise preliminar os compostos foram testados em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. major*, *L. chagasi* e *L. braziliensis* e a atividade leishmanicida foi estabelecida pelo método do MTT. Nossos resultados mostraram variada sensibilidade das espécies de *Leishmania* aos compostos testados. Derivados com grupo das amins-livre demonstraram melhor atividade leishmanicida do que outros compostos mono e di-alquil alcino substituídos. O composto **3** (4-amino-7-cloro-N-butilamina)quinolina mostrou o melhor CI_{50} (0,16 μ M para *L. chagasi*) demonstrando um CI_{50} ainda melhor do que o apresentado pela anfotericina-B (1,90 μ M para *L. chagasi*). Interessantemente, foi observada relação estrutura atividade principalmente em promastigotas de *L. chagasi*, sendo importante a presença do grupo amino-livre e o número de átomos de carbono. A maioria dos compostos não mostraram citotoxicidade para células de mamíferos, exceto os compostos com grupo amino-livre. O composto **5** (4-amino-7-cloro-quinolina-N-(prop-2-inil)quinolina foi escolhido para avaliação da atividade em amastigotas intracelulares e a atividade leishmanicida foi a partir da contagem dos parasitos após coloração por Giemsa. O tratamento com o composto em macrófagos infectados com *L. major* e *L. amazonensis* não demonstrou atividade leishmanicida para a primeira espécie deste parasito. Em *L. amazonensis*, o tratamento mostrou significante atividade nas formas intracelulares, reduzindo o número de amastigotas/macrófagos, número de células infectadas e a carga parasitária acima de 90% após 72 horas. O efeito anti-amastigota foi dose e tempo dependente. Nenhuma alteração nos níveis de óxido nítrico pelos macrófagos infectados tanto com *L. amazonensis* quanto por *L. major* foi observada após tratamento com o composto **5**. Entretanto, esta aminoquinolina significativamente aumentou e inibiu a produção de TNF- α em células infectadas com as respectivas espécies. Conjuntamente, estes resultados sugerem que a atividade leishmanicida do composto **5** pode atuar diretamente no parasito ou através de mecanismos imunomodulatórios. Este estudo indica que derivados de aminoquinolinas tem promissoras propriedades leishmanicidas sendo bons candidatos para alvos de pesquisas para desenvolvimento de novas drogas anti-protozoários.

Palavras chave: *Leishmania*, quimioterapia, drogas, aminoquinolinas, óxido nítrico, TNF- α .

ABSTRACT

The leishmaniasis are parasitic-infection diseases that affect 12 million people in 88 countries, it remains a serious public health problem worldwide, including in Brazil. This disease is caused by different *Leishmania* species, which invade and multiply within macrophages in vertebrate host. No vaccine exists yet and chemotherapy has been based mainly in pentavalent antimonials, amphotericin B e pentamidina. However, these drugs have limited use due to their toxicities, long term treatment and high costs. Therefore, there is an urgent need for development of new drugs for leishmaniasis. The aim of this study was to evaluate the leishmanicidal activity in twelve aminoquinolines derivatives, but specifically, 4-amino-7-chloro-quinoline, those present diamine with amine-free, mono-alkyne or di-alkyne groups. In a previous analysis the compounds were tested in promastigote forms of *L. amazonensis*, *L. major*, *L. chagasi* and *L. braziliensis* and the leishmanicidal activities was established by MTT method. Our results showed varied sensibility of the *Leishmania* species to the tested compounds. Derivatives with amine-free groups demonstrated better leishmanicidal activity than the others compounds and the compound **3**(4-amine-7-cloro-N-butilamine)quinoline showed the best IC₅₀ (=0,16 μM for *L. chagasi*) displaying an IC₅₀ better than anfotericin B (1,90 μM para *L. chagasi*) Interestingly, it was observed structure-activity relationships (SAR) mainly in promastigotes of *L. chagasi*, being important the presence of amine-free group and number of carbon atoms. The majority of compounds didn't showed citotoxicity for the mammalian cells, except compounds containing amine-free groups. The compound **5** (4-amine-7- chloro-quinoline-N-prop-2-ynil)quinoline was chosen for antileishmanial evaluation in an intramacrophage amastigotes model and the leishmanicidal activity was achieved from the count of parasites after coloration by Giemsa. The treatment with this compound from infected macrophages with *L. major* e *L. amazonensis* didn't show leishmanicidal activity for the first specie of this parasite. In *L. amazonensis*, the treatment showed a significant activity against intracellular forms, reducing the number of amastigotes/macrophage, the infected cells and the parasite burden above 90% after 72 hours. The anti-amastigote effect was dose and time response. No alteration in nitric oxide levels by infected macrophages as for *L. amazonensis* as well for *L. major* was observed after treatment with the compound 5. However, this aminoquinoline significantly enhanced and inhibit the TNF-α production in infected cells with the respective *Leishmania* species. Together, these results suggest strongly that leishmanicidal activity from compound **5** can be directly in parasites or through the immune modulatory mechanism. This study indicate that aminoquinolines have promising leishmanicidal properties being a good candidates for further research to develop of new anti-protozoan drugs.

Keywords: *Leishmania*, chemotherapy, drug, aminoquinoline, nitric oxide, TNF-α.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses tegumentar e visceral. As áreas afetadas estão marcadas em vermelho de acordo com a OMS-Organização Mundial de Saúde (adaptado de SANTOS <i>et al.</i> , 2008).....	17
Figura 2: Classificação do gênero <i>Leishmania</i> , ilustrando 2 subgêneros, incluindo as espécies mais conhecidas por infectar o homem (adaptado de BATES, 2007)..	20
Figura 3: Ilustração dos insetos vetores <i>Phlebotomus</i> e <i>Lutzomyia</i> (SHARMA e SINGH, 2008).....	26
Figura 4: Vacúolos parasitóforos de macrófagos de camundongos Balb/c infectados com <i>L. major</i> (A) e <i>L. amazonensis</i> (B) sem tratamento (seta) e macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> após tratamento. Coloração de Giemsa, microscopia óptica aumento 1000x.....	28
Figura 5: Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> spp. (1) Inoculação das formas promastigotas metacíclicas pelo inseto vetor, (2) fagocitose das formas promastigotas por macrófagos, (3) diferenciação das formas promastigotas em amastigotas nos vacúolos parasitóforos, (4) lise dos macrófagos infectados e liberação das formas amastigotas (5) ingestão dos macrófagos parasitados pelo inseto durante o repasto sanguíneo, (6) amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, multiplicam por divisão binária e migram para o aparelho sugador do inseto vetor. Adaptado de (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002).....	29
Figura 6: Vias de produção do óxido nítrico (adaptado de HOLZMULLER, GONÇALVES, LESMERE, 2006).....	32
Figura 7: Estrutura química, fórmula estrutural e massa molecular das drogas mais utilizadas no tratamento das leishmanioses adaptado de (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).....	38
Figura 9: Número de amastigotas intracelulares após infecção dos macrófagos com promastigotas provenientes de <i>n</i> passagens <i>in vitro</i> . Os macrófagos foram infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> (1:10) com <i>n</i> passagens em meio de cultivo. As diferenças entre os tempos foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) One-Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni).....	56

Figura 10: Comparação entre o número de amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> mantidas em diferentes temperaturas. Os macrófagos foram infectados com promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com no máximo 4 passagens e mantidos á 37°C à esquerda e 33°C, à direita. Houve diferença estatística dentro dos grupos nos diferentes tempos. Teste One-Way análise de Variância linha contínua onde $p < 0,05$ (* ** ***). Houve diferença estatística significativa entre os dois grupos. One-Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni) linha pontilhada.....	57
Figura 11: Inibição das formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com o composto 5 , em 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram estatisticamente significativos (** $p < 0,0001$) comparados com o grupo controle (ns = não significativo). Teste Análise de Variância (pós teste Dunnett).....	59
Figura 12: N° de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> /macrófago após tratamento com o composto 5 em 24, 48 e 72 horas. Onde $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) são estatisticamente significantes. ns-não significativo. Teste One-Way-Anova (pós teste Dunnett).....	60
Figura 13: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e tratadas com o composto 5 após 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, ns-não significativo. Teste One-Way-Análise de Variância (pós teste Dunnett).....	61
Figura 14: Porcentagem de inibição das formas amastigotas e promastigotas pós tratamento com diferentes concentrações do composto 5 após 72 horas. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa. One-Way Análise de Variância (pós teste de Tukey).....	62
Figura 15: Resultados representativos da avaliação microscópica de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e corados pelo Giemsa. Controle de macrófagos não tratados, 24 horas (1A), 48 horas (2A) e 72 horas (3A) ou após tratamento com o composto 5 na concentração de 6,25 μ M em 24 horas (1B), 48 horas (2B) e 72 horas (3B). Microscopia óptica (1000X).	63

Figura 16: Controles dos níveis de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. amazonensis* na proporção de 1:5 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Os controles foram macrófagos não infectados estimulados e não estimulados. Então, 48 horas após o sobrenadante foi coletado e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. A produção de NO em controle de MØs + *L. amazonensis* + IFN- γ +LPS foi estatisticamente diferente em relação ao controle de MØs + IFN- γ +LPS. A produção de NO em controle de MØs + *L. amazonensis* foi estatisticamente diferente em relação ao controle de MØs. One-Way Análise de variância (pós teste Bonferroni).....

66

Figura 17: Quantificação dos níveis de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com o composto 5. (A), controle de macrófagos e macrófagos tratados com diferentes concentrações do composto 5. (B), controle de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e macrófagos infectados e tratados com diferentes concentrações do composto 5. (C), controle de macrófagos previamente infectados 4 horas antes e estimulados com IFN- γ +LPS. (D), controle de macrófagos somente estimulados com IFN- γ +LPS e macrófagos tratados com diferentes concentrações do composto 5 estimulados IFN- γ +LPS. Então, 48 horas após o tratamento com o composto 5 os sobrenadantes foram coletados e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. A inibição dos níveis produção de NO no tratamento com diferentes concentrações do composto 5 foi estatisticamente significativa quando comparada aos controles nas figuras 16A,C, D ($p<0,001$). Na figura 16B não houve uma diferença nos níveis de NO estatisticamente significativa ($p<0,05$). ns-não significativo. One-Way Análise de Variância (pós teste Dunnett).....

67

Figura 18: Controles dos níveis de NO por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. major* na proporção de 1:10 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Os controles foram macrófagos não infectados estimulados e não estimulados. Então, 48 horas após o sobrenadante foi coletado e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. Os níveis de NO nas amostras estimuladas em relação ao controle não foram estatisticamente significativa ($p<0,05$) e para produção de nitrito nas amostras não estimuladas em relação ao controle foi estatisticamente significativa. One-Way Análise de variância (pós teste Bonferroni).....

68

Figura 19: Quantificação dos níveis de NO por macrófagos infectados com *L. major* e tratados com o composto **5** em diferentes concentrações. Macrófagos peritoneais (2×10^6 célula/ml) infectados com promastigotas de *L. major* (20×10^6 parasitos/ml) e tratados com o composto **5**. Os níveis de NO foi mensurado após 48 horas de infecção. Os níveis de NO em macrófagos tratados quando comparado com o controle macrófagos infectados não foi estatisticamente significativo. ns-não significativo. One-way Análise de Variância (pós teste Dunnett).....

69

Figura 20: Níveis de TNF- α em diferentes tempos (12 18 e 24 horas). Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Não houve diferença estatisticamente significante entre os tempos ($p < 0,05$) ns-não significativo. One-Way Análise Variância (pós teste Bonferroni).....

70

Figura 21: Níveis de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c nos grupos controles. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. amazonensis* na proporção de 1:5 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Após 24 horas houve a coleta dos sobrenadantes. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significante entre os controles ($p < 0,05$). One-Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni).....

71

Figura 22: Quantificação dos níveis de TNF- α por macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c tratados com o composto **5**. (A), controle de macrófagos e macrófagos tratados com diferentes concentrações do composto **5**. (B), controle de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e macrófagos infectados e tratados com diferentes concentrações do composto **5**. (C), controle de macrófagos previamente infectados 4 horas antes e estimulados com IFN- γ +LPS. (D), controle de macrófagos somente estimulados com IFN- γ +LPS e macrófagos tratados com diferentes concentrações do composto **5** estimulados IFN- γ +LPS. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Na figura 20A não houve diferença nos níveis de TNF- α comparado com o controle. Nas figuras 21B,C,D houve aumento nos níveis de TNF- α no tratamento com diferentes concentrações do composto **5** estatisticamente significante quando comparada aos controles. Análise One-Way Análise de Variância (pós teste Dunnet).....

73

Figura 23: Níveis de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c nos grupos controles. As células foram infectadas previamente por 4 horas com <i>L. major</i> na proporção de 1:10 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Após 24 horas houve a coleta dos sobrenadantes. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (** $p < 0,05$). One-Way Análise de Variância (pós teste Dunnett).....	74
Figura 24: Níveis de TNF- α após tratamento com o composto 5. Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c (2×10^6 /ml) foram infectados com <i>L. major</i> (20×10^6 /ml) e tratados com diferentes concentrações do composto 5. Após 24 os sobrenadantes das culturas foram coletados e os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle nas concentrações de 100 μ M, 12,5 μ M e 6,25 μ M ($p < 0,05$). Análise estatística One-Way Análise de Variância (pós teste Kruskal Wallis).....	75
Tabela 1: Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> e suas manifestações clínicas (adaptada de SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; H. E., 2009).....	21
Tabela 2: Drogas mais utilizadas nos tratamentos das leishmanioses e em triagem clínica (CROFT <i>et al.</i> , 2006).....	33
Tabela 3: Estrutura química e nome dos compostos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina.....	41
Tabela 4: Atividade de diaminoquinolinas em promastigotas de <i>Leishmania</i>	51
Tabela 5: Atividade de amino e diamino-monoalcalinos quinolinas em promastigotas de <i>Leishmania</i>	52
Tabela 6: Atividade de diamino-dialcalinos quinolinas em promastigotas de <i>Leishmania</i>	53
Tabela 7: CI ₅₀ dos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.....	54
Tabela 8: Atividade leishmanicida do composto 5 em formas amastigotas de <i>L. major</i> após 24, 48 e 72 horas de tratamento.....	64

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI: Infusão de cérebro e coração (“brain heart infusion”)

°C: Graus Celsius

CD: “cluster” de diferenciação

Células Th1: células Thelper 1 (auxiliadoras) tipo 1

Células Th2: células Thelper 2 (auxiliadoras) tipo 2

CI₅₀: Concentração inibitória 50%

cm: Centímetro

CO₂: Dióxido de carbono

cDNA: Ácido desoxirribonucléico complementar

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico

ELISA: Ensaio imunoenzimático (“enzyme immunosorbent assay”)

HIV: vírus da imunodeficiência humana, do inglês *human infection virus*

IS: Índice de seletividade

IFN- γ : Interferon gama

IL-1: Interleucina - 1

IL-4: Interleucina - 4

IL-10: Interleucina - 10

IL-12: Interleucina - 12

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

LPS: lipopolissacarídeo

LC: Leishmaniose cutânea

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose visceral

mg: miligrama

ml: mililitro

mM: milimolar

μ l: microlitro

μ m: micrômetro

μ M: micromolar

MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenil tetrazolium bromide

hm: nanômetro

NO: óxido nítrico

NO₂⁻: nitrato

NO₃⁻: nitrito

OMS: Organização Mundial da Saúde

PBS: Tampão salina fosfato (“phosphate buffer saline”)

pH: Potencial de hidrogênio

PI: Porcentagem de inibição

SBF: Soro bovino fetal

Sb(V): Estibogluconato de sódio

TGF-β: Fator de crescimento e transformação β

TNF-α: Fator de necrose tumoral α

VPs: Vacúolos parasitóforos

WHO: Organização Mundial de Saúde (“World Health Organization”)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 <i>Leishmania</i> : o parasito.....	19
1.2 Manifestações clínicas das leishmanioses e espécies envolvidas....	20
1.2.1 Infecções subclínicas.....	22
1.2.2 Leishmaniose cutânea (LC).....	22
1.2.3 Leishmaniose cutâneo-mucosa.....	23
1.2.4 Leishmaniose cutânea difusa.....	24
1.2.5 Leishmaniose visceral.....	24
1.3 Espécies utilizadas neste trabalho.....	25
1.4 Ciclo biológico.....	26
1.5 Resposta imunológica nas leishmanioses.....	30
1.6 Quimioterapia nas leishmanioses.....	33
1.7 Novos derivados de Aminoquinolinas.....	38
2 OBJETIVOS.....	40
2.1 OBJETIVO GERAL.....	40
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1 Moléculas utilizadas.....	41
3.2 Parasitos.....	43
3.3 Manutenção da infecção de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> em camundongos Balb/c.....	43
3.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em promastigotas de <i>Leishmania</i>	44
3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos em promastigotas de <i>Leishmania</i>	44
3.6 Avaliação do efeito citotóxico em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i>	45
3.7 Determinação da produção de NO em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i>	46
3.8 Dosagem de Citocina (TNF- α) em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i>	47
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
5 RESULTADOS.....	49
SESSÃO 1.....	49
5.1 - Avaliação da citotoxicidade de derivados de aminoquinolinas nas formas promastigotas de <i>Leishmania</i> e análise da relação estrutura-atividade.....	49

5.2 Citotoxicidade dos compostos aminoquinolinas em macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c.....	53
SESSÃO DOIS	
5.3 Análise da atividade anti-amastigota de <i>Leishmania</i> e do mecanismo de ação através da avaliação da produção de NO e de TNF- α	55
5.4 Padronização do modelo de infecção de macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c com promastigotas de <i>Leishmania</i>	55
5.5 Avaliação do efeito citotóxico do composto 5 em amastigotas intracelulares de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> em 24, 48 e 72 horas.....	57
5.5.1 <i>L. amazonensis</i>	57
5.5.2 <i>L. major</i>	64
5.6 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO) em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> tratados com o composto 5.	65
5.6.1 <i>L. amazonensis</i>	66
5.6.2 <i>L. major</i>	68
5.7 Análise da produção de TNF- α em macrófagos peritoneais infectados com <i>L. amazonensis</i> e <i>L. major</i> após tratamento com o composto 5.....	70
5.7.1 <i>L. amazonensis</i>	72
5.7.2 <i>L. major</i>	74
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÃO	85
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
9 ANEXO A	98
9.1 Synthesis, cytotoxicity, antileishmanial and antitubercular activities of some 4-aminoquinoline analogues and their platinum[II] complexes...	98
9.2 Nitric oxide and TNF- α analyses in <i>Leishmania amazonensis</i> and <i>L. major</i> infected macrophages treated with 4-amino-7-cloro-N-(prop-2-inil)quinoline, a aminoquinoline derivative. (Artigo em preparação)....	98

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, de transmissão vetorial, causadas por diferentes espécies de protozoários flagelados pertencentes ao gênero *Leishmania*. Apresentam um amplo espectro de sinais e sintomas que vão desde a infecção inaparente, passando pela infecção cutânea autolimitante, disseminada, difusa, mucocutânea e culminando com a manifestação mais grave, a forma visceral (ASHFORD, 2000; SERENO *et al.*, 2007; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; CRUZ *et al.*, 2009).

No mundo, as leishmanioses atingem aproximadamente 12 milhões de pessoas em 88 países (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>), destes, 66 são no Velho Mundo e 22 no Novo Mundo (FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; SHARMA e SINGH, 2009). São endêmicas em toda América Latina, África, Ásia e sul da Europa. Segundo o mapa geográfico (figura 1) 90% das leishmanioses cutâneas ocorrem em países como Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Irã, Brasil e Peru; 90% das leishmanioses visceral ocorrem na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil. As leishmanioses apresentam altos níveis de morbidade e mortalidade, representando um grave problema de saúde pública (BAILEY e LOCKWOOD, 2007; SANTOS *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

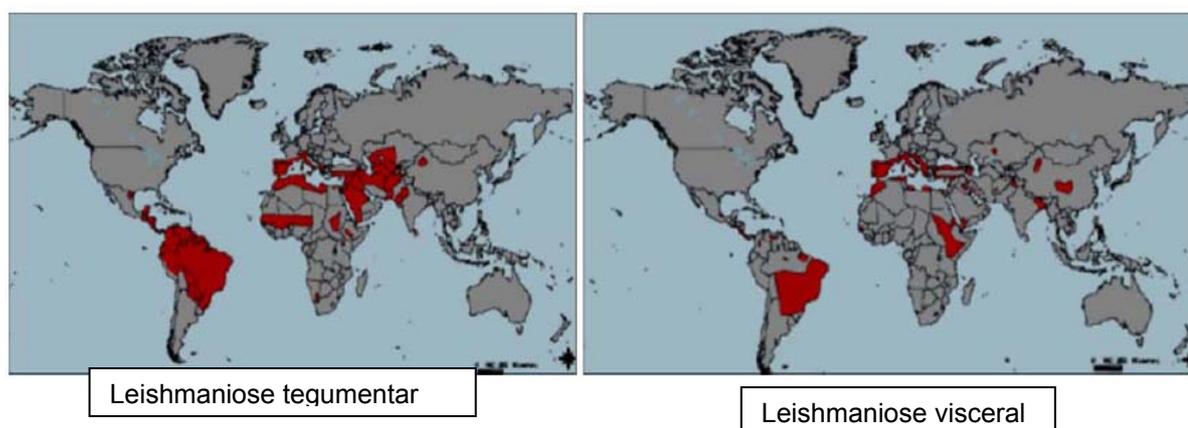


Figura 1: Distribuição geográfica das leishmanioses tegumentar e visceral. As áreas afetadas estão marcadas em vermelho de acordo com a OMS-Organização Mundial de Saúde (adaptado de SANTOS *et al.*, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, revelando a importância desta doença (<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm>)

Estudos epidemiológicos demonstram que globalmente nas duas últimas décadas os números de casos de leishmanioses aumentaram devido à ampliação de áreas endêmicas, juntamente com crescimento dos centros urbanos, desmatamento e aquecimento global. Conjuntamente, estas mudanças alteram os hábitos do inseto vetor e expandem seu nicho ecológico, contribuindo assim para a urbanização da doença e abrindo novos focos endêmicos (SHAW, 2007; CRUZ *et al.*, 2009, SHUKLA *et al.*, 2009). O Brasil constitui o país de maior incidência da doença no continente americano, e ainda está em franca expansão geográfica, devido ao aumento significativo das leishmanioses em áreas periurbanas (GRIMALDI e TESH, 1993; PONTIN, 2003; AMATO *et al.*, 2008).

Anualmente, a estimativa global é de que 1,5 a 2 milhões de pessoas possam desenvolver a doença na forma cutânea, mucocutânea e visceral (MURRAY *et al.*, 2005; PALIT *et al.*, 2008). Entretanto, a incidência da infecção é substancial quando infecções subclínicas são incluídas, com 70.000 casos de morte por ano (MURRAY *et al.*, 2005, REITHINGER *et al.*, 2007). E ainda, segundo CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB (2006) o número de casos de leishmanioses no mundo é subestimado, visto que somente 40 dos 88 países notificam a doença.

Considera-se também, como aumento na transmissão da doença o resultado da coinfeção com o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (REITHINGER *et al.*, 2007; NADERER e MCCONVILLE, 2008). Além disto, a má nutrição também pode estar associada em certos casos de leishmanioses (BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008). Paralelamente, coinfeções tais como malária e pneumonia, aumentam os níveis de morbidade e mortalidade da doença quando não diagnosticada a tempo (ROCHA *et al.*, 2005).

Amato e colaboradores (2008) ainda consideram como agravantes das medidas de controle das leishmanioses, o aumento do turismo em áreas endêmicas e transfusões sanguíneas entre indivíduos positivos assintomáticos. Além disto, o controle das leishmanioses é prejudicado pela ausência de uma vacina. Na prática ainda não existe uma vacina eficaz contra este parasito. Embora, a infecção primária quando curada, geralmente leva a uma proteção

contra futuras infecções, sugerindo a possibilidade de se utilizar uma vacina contra infecções por *Leishmania*, (RODRIGUES, 2005; MURRAY *et al.*, 2005).

Por mais de 60 anos, a quimioterapia para as leishmanioses é baseada principalmente em medicamentos como os antimoniais pentavalentes (Sb(V), estibogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumine (Glucantime®) (CRUZ *et al.*, 2009; FRÉZARD, DEMICHELI, RIBEIRO, 2009; PALIT *et al.*, 2008). Uma segunda linha de drogas utilizadas são a anfotericina B (AmB), um polieno antifúngico, e a pentamidina, um composto aromático derivado de diaminas. Entretanto, a eficácia destas drogas está diretamente relacionada a efeitos colaterais graves, toxicidade e alto custo do tratamento (SANTOS *et al.*, 2008, TEIXEIRA *et al.*, 2008, CRUZ *et al.*, 2009).

1.1 *Leishmania*: o parasito

Leishmania são flagelados pertencentes à família Trypanosomatidae, Ordem kinetoplastida, cuja característica principal é a presença da organela cinetoplasto, que situa-se à base do flagelo e contém sequências repetidas de DNA, também denominado de cDNA (RODRIGUES, 2005; MISHRA *et al.*, 2009). Este gênero compreende várias espécies que infectam o homem e animais. Entretanto, a classificação e identificação destas espécies são complexas, onde os parâmetros analisados envolvem características intrínsecas, como morfologia, aspectos bioquímicos e análise do DNA; e características extrínsecas como aparência clínica das lesões e distribuição geográfica (DINIZ, 2004). Lainson e Shaw (1987), utilizando os parâmetros acima citados, propuseram uma tabela de taxonomia, entretanto ainda não existe uma classificação adotada por todos.

Atualmente, as espécies que parasitam o homem podem ser subdivididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, ou ainda, em dois grandes grupos geográficos, do Velho Mundo e do Novo Mundo (figura 2). A divisão dos subgêneros foi baseada no desenvolvimento das formas promastigotas no intestino do inseto vetor: 1) subgênero *Viannia*, para espécies que incluem uma fase no intestino posterior, com distribuição geográfica limitada ao Novo Mundo; 2) subgênero *Leishmania*, para aquelas espécies que se desenvolvem no

intestino anterior, encontradas também no Novo Mundo e abrangendo todas as espécies do Velho Mundo (BATES, 2007).

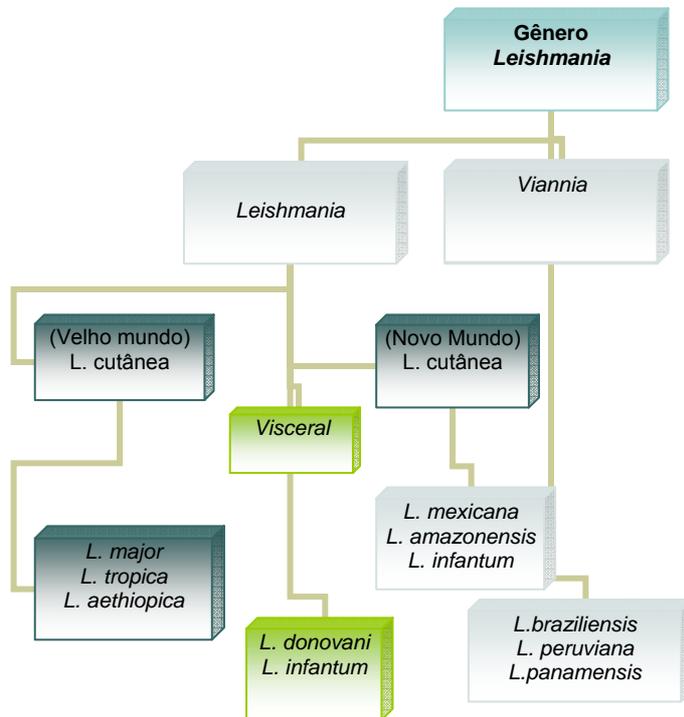


Figura 2: Classificação do gênero *Leishmania*, ilustrando 2 subgêneros, incluindo as espécies mais conhecidas por infectar o homem (adaptado de BATES, 2007).

Neste trabalho, foram utilizadas espécies pertencentes ao gênero *Viannia* e *Leishmania*; *Leishmania* (*V.*) *braziliensis*, *Leishmania* (*L.*) *amazonensis*, e *Leishmania* (*L.*) *chagasi*, encontradas no Novo Mundo e *Leishmania* (*L.*) *major*, no Velho Mundo.

1.2 Manifestações clínicas das leishmanioses e espécies envolvidas.

Apesar de algumas espécies de *Leishmania* serem responsáveis pela maioria dos casos humanos, uma das características mais marcantes deste gênero é a diversidade das manifestações clínicas (tabela 1). A patogênese das leishmanioses, suas manifestações clínicas e o curso da infecção são dependentes de complexas interações relacionadas a propriedades do parasito como virulência, infectividade e patogenicidade, fatores do hospedeiro, como a resposta imunológica (DEANE e GRIMALDI, 1985; GRIMALDI e TESH, 1993; ASHFORD e BATES, 1998; MURRAY *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008).

Tabela 1: Classificação das espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas (adaptada de SAKTHIANANDESWAREN, FOOTE, HANDMAN, 2009).

ESPÉCIE	DOENÇA
SUBGÊNERO LEISHMANIA	
Complexo Donovan	
<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) infantum</i>	visceral
<i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	visceral
Complexo <i>L. aethiopica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) aethiopica</i>	cutânea difusa
<i>Leishmania (Leishmania) garnhami</i>	cutânea
Complexo <i>L. major</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) major</i>	cutânea
Complexo <i>L. tropica</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) tropica</i>	cutânea/visceral
Complexo <i>L. mexicana</i>	
<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i>	cutânea/mucosa/visceral
<i>Leishmania (Leishmania) venezuelensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Leishmania) pifanoi</i>	cutânea
SUBGÊNERO VIANNIA	
Complexo <i>L. braziliensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	cutânea/mucosa
<i>Leishmania (Viannia) peruviana</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) colombiensis</i>	cutânea/mucosa
Complexo <i>L. guyanensis</i>	
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	cutânea
Complexo não especificado	
<i>Leishmania (Viannia) naiffi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) shawi</i>	cutânea
<i>Leishmania (Viannia) lainsoni</i>	cutânea

1.2.1 Infecções subclínicas

As infecções subclínicas são causadas principalmente por aquelas espécies viscerotrópicas, podendo permanecer assintomáticas. Esta observação atrai atenção para fatores do hospedeiro como susceptibilidade e expressão da doença como: idade, estado nutricional e imunidade (MURRAY *et al.*, 2005). Em infecções subclínicas ou assintomáticas, por definição, a resposta do hospedeiro é efetiva onde os sinais de inflamação são rigorosamente regulados. Alternativamente podem ser causadas por espécies avirulentas (MURRAY *et al.*, 2005).

1.2.2 Leishmaniose cutânea (LC)

A LC é a forma mais comum da doença, definida pela presença de lesões exclusivamente na pele, que se iniciam no ponto de inoculação das formas promastigotas infectantes, através da picada do inseto vetor. A lesão primária em geral é única, embora múltiplas picadas do inseto gerem um número elevado de lesões (GONTIJO e CARVALHO, 2003; DAVID e CRAFT, 2009). Produz lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém autolimitadas em hospedeiros imunocompetentes, embora estes parasitos possam persistir em pequenas quantidades ao longo da vida (LIESE, SCHLEICHER, BOGDAN, 2008; PEREIRA e ALVES, 2008).

No Brasil são registrados mais de 30.000 casos anualmente, onde as formas ulceradas são as mais comuns. No Novo Mundo é endêmica na América Central e do Sul e as principais espécies que produzem esta forma clínica pertencem aos complexos *L. braziliensis* e *L. mexicana* (LAISON e SHAW, 1998; BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008). A epidemiologia da leishmaniose cutânea nas Américas é complexa, ocorrendo variações no ciclo de transmissão, nos hospedeiros reservatórios, nos insetos vetores, manifestações clínicas e resposta terapêuticas (BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008).

No Velho Mundo, um exemplo clássico de leishmaniose cutânea localizada é o “Botão do Oriente”, uma úlcera de pele de cura espontânea, causada pela *L. major* em áreas rurais do Oriente Médio, Ásia Central e norte da África e pela *L. tropica* em áreas urbanas do Oriente Médio, Índia e baixo Mediterrâneo (PEARSON, 1993; REITHINGER *et al.*, 2007). Apesar de

raramente associadas com mortalidade, às lesões são geralmente crônicas e quando desfigurantes podem aparecer complicações psicológicas. As características da lesão dependem da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune do hospedeiro mamífero. Tipicamente, um nódulo se forma no local da picada do inseto onde as formas promastigotas foram inoculadas e, com o tempo, pode aparecer sob forma ulcerosa que poderá persistir por vários meses ou anos ou eventualmente curar deixando uma cicatriz leishmaniótica típica como evidência da doença.

Embora, tanto no Velho Mundo quanto no Novo Mundo a leishmaniose cutânea exibe uma diversidade de manifestações clínicas. Em pacientes imunocomprometidos ela é caracterizada pela tendência a latência, persistência e disseminação, reativação e reinfeção. No Novo Mundo, principalmente *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* tem uma grande tendência a disseminar-se pela pele em comparação a outras espécies (MISHRA, SAXENA, SINGH, 2007).

1.2.3 Leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM)

Forma que se complica meses ou anos após a lesão inicial primária, com o aparecimento de lesões destrutivas secundárias nas mucosas do nariz, boca e faringe. É mais comumente relatada no Novo Mundo e tem a *L. braziliensis* como principal agente etiológico (LAINSON e SHAW, 1998; BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008). Entretanto espécies como *L. amazonensis*, *L. major* e *L. infantum/L. chagasi* podem também estarem associadas à leishmaniose cutânea mucosa (REITHINGER *et al.*, 2007). Contudo, ainda lesões secundárias podem ocorrer por extensão direta da lesão primária, ou mais provavelmente, através da disseminação hematogênica. O primeiro sinal de comprometimento mucoso manifesta-se por eritema e discreto infiltrado inflamatório no septo nasal, subsequentemente este se apresenta perfurado, provocando mudança anatômica e aumento do nariz, que se constitui no chamado “nariz de anta”. O processo ulcerativo pode atingir lábios e se propagar pela pele, levando as graves complicações respiratórias por infecções secundárias, podendo levar o paciente a óbito (AMATO *et al.*, 2008; BERN, MAGUIRE, ALVAR, 2008).

1.2.4 Leishmaniose cutânea difusa (LCD)

Apresentam-se com lesões disseminadas, não-ulcerativas e repletas de parasitos. No Novo Mundo a doença é causada por *L. amazonensis* e *L. mexicana* nas Américas Central e do Sul, enquanto que as infecções no Velho Mundo têm sido atribuídas à *L. aethiopica* (LAINSON e SHAW, 1998). A doença usualmente inicia-se com uma lesão primária e depois se dissemina, envolvendo outras áreas da pele, mucosa e vários linfonodos, mas sem visceralização. Esta forma se caracteriza pela anergia da resposta imunológica celular e é de difícil tratamento (LAINSON e SHAW, 1998; REITHINGER *et al.*, 2007).

1.2.5 Leishmaniose visceral (LV)

A leishmaniose visceral ou calazar possui largo espectro epidemiológico, ocorre em áreas tropicais e subtropicais, tem como principais agentes etiológicos, as espécies do subgênero *Leishmania*: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*, agrupadas no complexo donovani. No Brasil a *L. chagasi* tem sido considerada como o principal agente etiológico da leishmaniose visceral, onde são registrados anualmente cerca de 4000 a 5000 casos (BERMAN, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Entretanto, em um estudo no estado da Bahia dentre os 46 casos de leishmaniose visceral, 11 tinham como agente etiológico a *L. amazonensis* (BERMAN, 2006).

A leishmaniose visceral afeta principalmente órgãos como baço, fígado, linfonodos, medula óssea e pele, entretanto outros órgãos podem eventualmente serem atingidos, por exemplo, o intestino e os pulmões. Nos casos não tratados os índices de mortalidade alcançam 100% (SHARMA e SINGH, 2008). Os principais sintomas são: febre, emagrecimento, escurecimento da pele e, em estágio mais avançado, hepatoesplenomegalia, anemia e hipergamoglobulemia (RIÇA-CAPELA *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008). Entretanto ela pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2 a 4 meses ocorrer os sintomas (MURRAY *et al.*, 2005). Contudo, indivíduos assintomáticos apresentam sorologia positiva para *Leishmania* e para o teste intradermal (GARG e DUBE, 2006).

1.3 Espécies utilizadas neste trabalho

Leishmania (L.) *amazonensis*: faz parte do complexo *L. mexicana*. Nos países da América do Sul, pode causar um largo espectro de manifestações clínicas, indo desde simples lesões cutâneas até múltiplas lesões, com nódulos desfigurantes a complicações viscerais. Esta espécie é descrita como único agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa anérgica no Brasil (JI, SUN, SOONG, 2003). Segundo Santos e colaboradores (2007) e Pereira e Alves (2008) e estudos recentes indicam que a distribuição geográfica de *L. amazonensis* no Brasil está aumentando. É também responsável no homem pela leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa (BASANO e CAMARGO, 2004). Encontram-se distribuída no Brasil, principalmente na bacia amazônica, em áreas alagadas (Amazonas, Pará, Rondônia e sudoeste do Maranhão), Bahia, Minas Gerais e Goiás. Está presente em países como Colômbia, Paraguai, Bolívia e Guiana Francesa. Tem como hospedeiros alguns roedores e como principal vetor o *Lutzomyia flaviscutellata*, um flebotomíneo de hábito noturno (BASANO e CAMARGO, 2004).

Leishmania (V.) *braziliensis*: Encontra-se distribuída em todo território nacional, além de vários países da América Central e do Sul. Apresenta como vetor o *Psychodopygus wellcomei* que está se adaptando em áreas peridomésticas e ainda existem vetores de florestas primárias como exemplo *Lu. intermedia*, *Lu whitmani* e outros. Tem como hospedeiros domésticos, cavalos, cães, jumentos e gatos. Causa no homem a leishmaniose cutânea e a cutâneo-mucosa (GONTIJO e CARVALHO, 2003; BASANO e CAMARGO, 2004).

Leishmania (L.) *chagasi*: É considerada endêmica na região nordeste do Brasil, onde é tipicamente uma doença de zona rural e mais recentemente áreas periurbanas vem sendo afetadas. Para alguns autores, a espécie *L. chagasi* é sinônimo da *L. infantum*, responsável pela leishmaniose visceral no Velho Mundo (Santos *et al.*, 2008), Tem como principal reservatório o cão doméstico e como vetor, *Lutzomyia longipalpis* (BERMAN, 2006).

1.4 Ciclo biológico

As espécies de *Leishmania* diferem na virulência, nos sintomas clínicos, na preferência dos insetos vetores e na distribuição geográfica. Entretanto, todas

têm um ciclo similar, consistindo de uma fase imóvel, amastigota, encontrada no hospedeiro mamífero e a forma promastigota flagelada encontrada no inseto vetor, as quais são transmitidas por cerca de 30 espécies de Phlebotomíneos, principalmente aqueles pertencentes ao subgênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (SAKTHIANANDESWAREN, FOOTE, HANDMAN, 2009; SHARMA e SINGH, 2008).

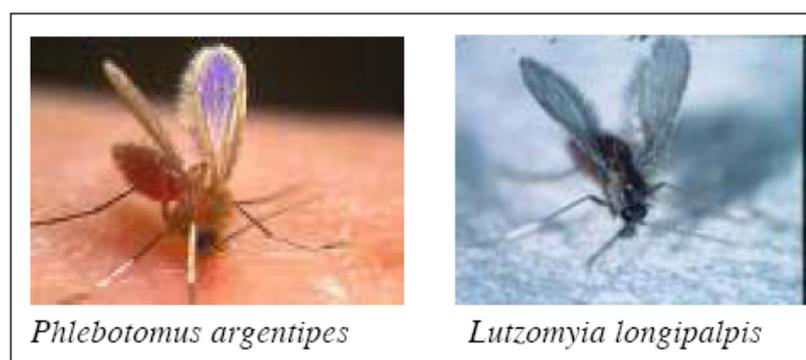


Figura 3: Ilustração dos insetos vetores *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (SHARMA e SINGH, 2008).

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores. Em seu ciclo de vida duas formas são observadas; a promastigota, encontrada no intestino médio do inseto vetor (dípteros da sub-família *Phlebotominae*, gênero *Phlebotomus* no velho mundo e *Lutzomyia* no novo mundo (figura 3). São alongadas, com um núcleo central e o cinetoplasto terminal, possuem um longo flagelo e são móveis. A forma amastigota, caracterizam-se por serem circulares, com diâmetro em torno de 2,5 μm a 5 μm , possuem núcleo, cinetoplasto e um flagelo rudimentar, são imóveis encontradas em vacúolos parasitóforos (VPs), no interior de macrófagos no hospedeiro vertebrado, ou em outros tipos celulares, onde se multiplicam por divisão binária (SHARMA e SINGH, 2008).

O ciclo se inicia quando formas promastigotas metacíclicas infectantes são inoculadas no hospedeiro vertebrado, pelas fêmeas dos insetos vetores durante o repasto sanguíneo (figura 5). Em torno de 1 a 1000 promastigotas são inoculadas neste momento (ALMEIDA, BARRAL, BARRAL-NETTO, 2003; OLIVEIRA e NETTO, 2005). Após a inoculação na derme, as promastigotas metacíclicas, infectam preferencialmente macrófagos e ou células dendríticas, onde se transformam em parasitos intracelulares obrigatório, as amastigotas,

dentro de compartimentos denominados de vacúolos parasitóforos (VPs), (KIMA, 2007; MUKBEL *et al.*, 2007), Entretanto, é bem documentado que outros tipos celulares incluindo neutrófilos e fibroblastos podem ser infectados por *Leishmania* (KIMA, 2007; NADERER e MCCONVILLE, 2008).

Os VPs são compartimentos os quais são acessíveis as *Leishmanias sp.*. Os VPs inicialmente se formam ao redor dos parasitos ingeridos, são delimitados por membranas derivadas da membrana plasmática do macrófago. A fusão deste compartimento com lisossomos e endossomos modificados, resultando em compartimento com muitas características de um fagolisossomo (BURCHMORE e BARRET, 2001). Embora *Leishmania* subverta a via clássica de maturação do fagolisossoma, para então modificar o seu ambiente, o VP possui o ambiente ácido (pH = 5), hidrolítico e ainda contém hidrolases e proteases. No entanto, amastigotas são adaptadas para sobreviverem sob tais condições (BURCHMORE e BARRET, 2001). A morfologia e certas características dos VPs variam entre as diferentes espécies (FORTÉA *et al.*, 2007; KIMA, 2007). Estes vacúolos variam em tamanho e número de amastigotas (figura 4). Aparentemente parecem estar cheios de fluidos, túrgidos. A aparência dos VPs está diretamente relacionada com a virulência dos parasitos, estão ausentes com parasitos mortos ou avirulentos e ainda desaparecem sob terapia leishmanicida (CHANG *et al.*, 2003).

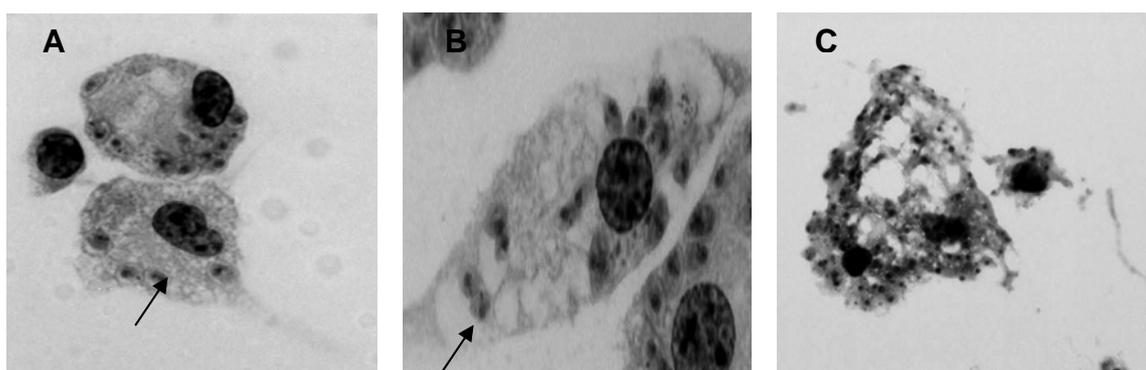


Figura 4: Macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c infectados com *L. major* (A) e *L. amazonensis* (B) sem tratamento e macrófagos infectados com *L. amazonensis* após tratamento (C). As setas mostram os amastigotas dentro do vacúolo parasitóforo. Coloração de Giemsa, microscopia óptica aumento 1000x.

Muitas espécies de *Leishmania* são abrigadas em pequenos e “apertados” VPs. Em contraste, parasitos do complexo *mexicana* cohabitam em grandes e distendidos VPs. Por exemplo, os VPs produzidos por macrófagos

infectados com *L. amazonensis* são enormes (CHANG *et al.*, 2003; REAL, POUCHELET, RABINOVITCH, 2008).

Para sobreviver e se adaptar a este ambiente, as promastigotas sofrem profundas modificações bioquímicas e morfológicas (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSEL, 1999; SARAIVA *et al.*, 2005). Ainda que o parasito seja sensível a mecanismos de defesa tais como anticorpos e sistema complemento, o habitat intracelular oferece uma completa proteção. Somente se os macrófagos forem ativados, os parasitos podem ser mortos e então degradados pelas células hospedeiras (KOLODZIEJ e KIDERLEN, 2005). Dentro do VP, as promastigotas se diferenciam em amastigotas em aproximadamente um período de 12 a 24 horas (SHARMA e SINGH, 2008).

Após sucessivas divisões, a célula hospedeira se rompe liberando as amastigotas que serão fagocitadas por novas células, propagando assim a infecção no hospedeiro vertebrado (REAL, POUCHELET, RABINOVITCH, 2008; DAVID e CRAFT, 2009). As amastigotas são responsáveis por todas as manifestações clínicas no hospedeiro vertebrado (GUPTA, GOYAL, RASTOGI, 2001). No caso de leishmaniose cutânea os macrófagos infectados ficam restritos à pele, conduzindo à formação ulcerosa ou ainda pode disseminar para outros órgãos como no caso de leishmaniose visceral ou para mucosa como na leishmaniose mucocutânea (SHARMA e SINGH, 2008). A ingestão de macrófagos periféricos infectados com as formas amastigotas durante o repasto sanguíneo pela fêmea do inseto vetor completa o ciclo biológico (BATES, 2007).

No interior do intestino do inseto, as amastigotas diferenciam em promastigotas procíclicas, as quais se dividem rapidamente e se fixam às células epiteliais do intestino através do flagelo (BATES, 2007). Após este estágio segue-se a diferenciação de promastigotas-procíclicas para o estágio infectivo, promastigotas-metacíclicas, os quais são liberados do epitélio e migra para a probóscida do inseto vetor aonde serão inoculados no hospedeiro vertebrado. A este processo de diferenciação denomina-se metaciclogênese, onde é acompanhado por mudanças na morfologia do parasito, expressão gênica e modificações estruturais. (ALEXANDER, SATOSKAR, RUSSELL, 1999; SARAIVA *et al.*, 2005).

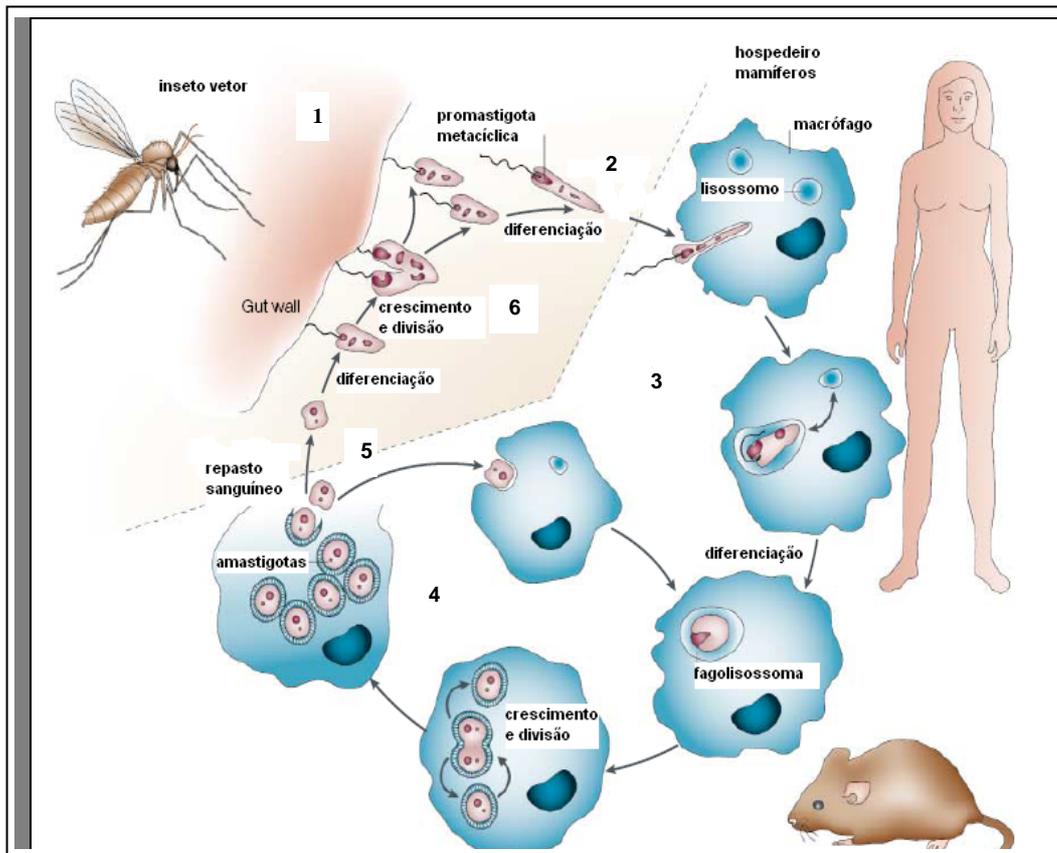


Figura 5: Ciclo de vida da *Leishmania* spp. (1) Inoculação das formas promastigotas metacíclicas pelo inseto vetor, (2) fagocitose das formas promastigotas por macrófagos, (3) diferenciação das formas promastigotas em amastigotas nos vacúolos parasitóforos, (4) lise dos macrófagos infectados e liberação das formas amastigotas (5) ingestão dos macrófagos parasitados pelo inseto durante o repasto sanguíneo, (6) amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas, multiplicam-se por divisão binária e migram para o aparelho sugador do inseto vetor. Adaptado de (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002).

Ocasionalmente, o inseto vetor não está envolvido na transmissão do parasito. A leishmaniose visceral pode ser diretamente iniciada pela forma amastigota via corrente sanguínea (reutilização de seringas, transfusão sanguínea, via transplacentária), ou por transplantes de órgãos; já a leishmaniose cutânea pode ser transmitida através de seringas que contém material infectado (MURRAY *et al.*, 2005).

1.5 Resposta imunológica nas leishmanioses

Mais de 17 de espécies de *Leishmania* são conhecidas por infectar o homem, primariamente conhecidas pelo seu tropismo tecidual (cutâneo, mucocutâneo e visceral). 90% de todas as infecções causadas por *Leishmania*

são restritas à pele, mas esta limitação é principalmente dependente da resposta imune do hospedeiro. Até mesmo espécies que normalmente induzem somente leishmaniose cutânea, podem promover as mais severas formas da doença (crônica, recorrente, disseminada, anérgica e também a forma visceral). Então, uma imunidade protetora contra *Leishmania sp* é crítica na defesa do hospedeiro contra este parasito (STEBULT, 2007).

Fatores do parasito e mecanismos do hospedeiro estão intimamente relacionadas à patogenia das leishmanioses. Inicialmente, para estabelecer a infecção, promastigotas entram nos macrófagos silenciosamente para evadir a resposta imune do hospedeiro, embora, uma progressiva infecção intracelular através das formas amastigotas dependa da manutenção dos macrófagos no seu estado inativo. Ao mesmo tempo, um hospedeiro imunocompetente pode responder através dos mecanismos da imunidade inata e imunidade adquirida (MURRAY *et al.*, 2005).

Atuando em conjunto a imunidade inata e adquirida determinam o resultado da infecção, incluindo cura espontânea e prevenção da reativação e ainda determinam a resposta à quimioterapia. No sítio da infecção, encontra-se todo aparato da imunidade inata (neutrófilos, monócitos, células natural Killer, macrófagos e células dendríticas), produtos solúveis (sistema complemento, interleucinas IL-12, fator de necrose tumoral (TNF- α) e anticorpos, entretanto, estes não são protetores (MURRAY *et al.*, 2005; REITHINGER *et al.*, 2007).

Estudos experimentais em camundongos infectados por *L. major* definiram o paradigma de resistência e susceptibilidade para infecção (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002). Uma resposta imune celular do tipo *Helper-1* (Th-1) caracterizada por células dendríticas, células de grupo de diferenciação-4 (*cluster of differentiation* CD4 e CD8) e secreção de citocinas pro-inflamatórias, como Interferon-gama (IFN- γ) IL-12, e TNF- α , as quais favorecem a resistência à infecção. Em contraste, a resposta imune celular do tipo *Helper-2* (Th-2) caracterizada pelas citocinas IL-4, IL-10 e o fator de crescimento e transformação- β (TGF- β), as quais são aptas a desativar mecanismos microbicidas dos macrófagos, favorecem a infecção intracelular (REITHINGER *et al.*, 2007, STEBULT, 2007). Embora, esta dicotomia Th-1/Th-2 seja bem estabelecida para infecções causadas por *L. major*, este modelo poderia não

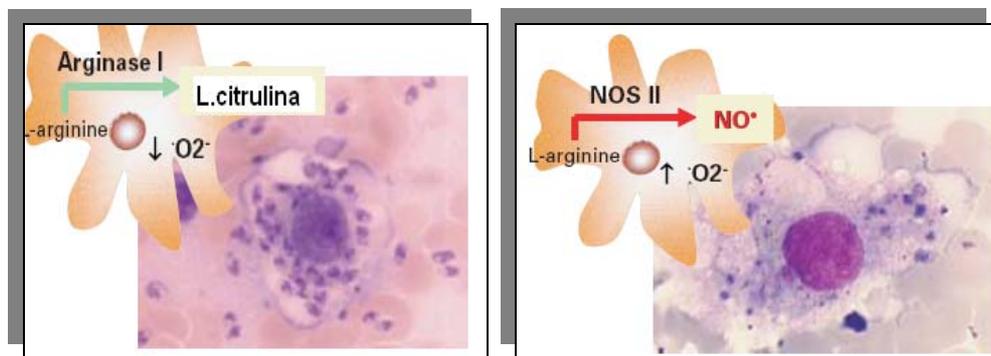
explicar adequadamente a patogenia em infecções murinas causada por outras espécies de *Leishmania* (QI *et al.*, 2004). Considerando que, a maior parte das espécies do complexo *Leishmania* divergiu a cerca de 40-80 milhões de anos atrás, não é surpresa que diferentes fatores de virulência tenham sido identificados em diferentes espécies, e conseqüentemente o crescimento destas no hospedeiro são submetidos a diferentes controles imunológicos (ALEXANDER e BRAYSON, 2005; PEREIRA e ALVES, 2008).

Uma resposta do tipo Th-1 sugere uma imunidade protetora durante a leishmaniose, com IFN- γ sendo a principal citocina envolvida na ativação dos macrófagos em associação com fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), induzindo a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) conseqüentemente estimulando assim a síntese de óxido nítrico (PANARO *et al.*, 1999; BALESTIERI *et al.*, 2002; MUKBEL *et al.*, 2007; WANASEN e SOONG, 2008).

A ativação de macrófagos conduz a um aumento de funções efetoras e regulatórias. A liberação de TNF- α é um marco da ativação destas células, envolvendo necessariamente a morte de protozoários como *Leishmania* e outros patógenos mediada pelo óxido nítrico (KOLODZIEJ e KIDERLEN, 2005). TNF- α é considerado uma das mais importantes citocinas pro-inflamatórias da imunidade inata, juntamente com interleucina-1 (IL-1) que possuem importantes propriedades biológicas. TNF- α é conhecido por estar diretamente relacionado à inflamação e ao choque séptico. A principal fonte de TNF- α em resposta a produtos microbianos são macrófagos/monócitos ativados que se liga a receptores Toll-like, mas também é produzido por linfócitos e células natural killer. TNF- α interfere também com o crescimento, diferenciação e apoptose de células do sistema imune e de outros tipos celulares (KOLODZIEJ e KIDERLEN, 2005; JESUS *et al.*, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um importante mediador da atividade microbicida dos macrófagos (figura 6). Em modelos murinos de leishmaniose o NO tem um papel crucial na eliminação destes parasitos *in vivo* e *in vitro* (GENESTRA *et al.*, 2003). A biossíntese do NO ocorre a partir da L-arginina em uma reação química catalizada pela (iNOS) em dois estágios de oxidação, resultando na produção de NO e L-citrulina (BALESTIERI, *et al.*, 2002; GENESTRA *et al.*, 2006, BOGDAN, 2008). Entretanto, o NO é uma molécula muito instável, possui uma meia vida

curta, dentro de poucos segundos converte em nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-). Evidências indicam que a atividade antiparasitária desta enzima envolve a geração de intermediários reativos do nitrogênio tais como NO assim como de outras moléculas reativas do oxigênio. A produção de NO durante a atividade leishmanicida é variável dependendo da espécie e é estágio-específica (MUKBEL *et al.*, 2007). Nas leishmanioses, dependendo da espécie, a produção de citocinas pró-inflamatórias resulta em um aumento na síntese de NO e de espécies reativas do oxigênio.



Macrófago ativado = Morte *Leishmania*

Macrófago desativado = Sobrevivência
Proliferação

Figura 6: Vias de produção do óxido nítrico (adaptado de HOLZMULLER, GONÇALVES, LESMERE, 2006).

Apesar dos mecanismos leishmanicidas dos macrófagos, *Leishmania sp* possui a habilidade para sobreviver e multiplicar-se dentro destas células, inibindo funções importantes, como a microbicida, que envolve produção de NO e metabólitos do oxigênio (ALEXANDER e BRYSON, 2005; MUNIZ-JUNQUEIRA e PAULA-COELHO, 2008). No intuito de manter a cronicidade da infecção, estes protozoários desenvolveram mecanismos de escape ao sistema imune que incluem a inibição da apoptose, apresentação de antígenos por moléculas MHC, bem como, bloqueio de importantes citocinas e quimiocinas (TUON *et al.*, 2008).

1.6 Quimioterapia nas leishmanioses

As drogas utilizadas nos tratamentos das leishmanioses apresentam os mais diversos problemas, incluindo alta toxicidade, com conseqüente abandono do tratamento pelos pacientes, além de alto custo (SANTOS *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008). Na tabela 2, apresentamos as drogas mais utilizadas no

tratamento das leishmanioses e na tabela 3, apresentamos as estruturas químicas.

Tabela 2: Drogas mais utilizadas no tratamento das leishmanioses e em triagem clínica (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006).

LEISHMANIOSE	Droga
Leishmaniose cutânea	Estibogluconato de sódio
Drogas 1ª escolha	Antimoniato de meglumine
	Anfotericina-B
	Pentamidina
	Paramomicina
Triagem Clínica	Miltefosina
	Paramomicina
	Imiquimod
	Antifungicos Azóis
Leishmaniose visceral	Estibogluconato de sódio
Drogas 1ª escolha	Antimoniato de meglumine
	Anfotericina-B
	Pentamidina
Triagem clínica	Miltefosina
	Paramomicina
	Sitamaquina
	Outras formulações de Anfotericina-B

Os antimoniais usados na clínica são complexos de Sb (V) com N-metil-D glucamina (antimoniato de meglumina ou Glucantime®) ou com gluconato de sódio (estibogluconato de sódio ou Pentostam®) (CRUZ *et al.*, 2009; FRÉZARD *et al.*, 2009). Embora, os antimoniais pentavalentes sejam considerados primeira linha de escolha para quimioterapia das leishmanioses, estes apresentam eficácia variada, com taxas de cura entre 60% a 100%. A via de administração é intravenosa ou intramuscular e demonstram similar eficácia quando administrada em doses equivalentes (TEIXEIRA *et al.*, 2008). São considerados tratamentos lentos, com administração dependente de supervisão médica e ainda possuem alta toxicidade, podendo desencadear efeitos colaterais adversos como artralgia, mialgia, cefaléia, distúrbios gastrointestinais, alterações eletrocardiográficas renais hepáticas, pancreáticas, erupções cutâneas, distúrbios de crase sanguínea, herpes zoster e outros (MAYRINK *et al.*, 2006). O estibugluconato de sódio causa além dos vários efeitos colaterais mencionados uma imunossupressão aguda em pacientes tratados com estes medicamentos (ROCHA *et al.*, 2005). Ainda é relatado com maior frequência um aumento na incidência de recidivas e resistência aos antimoniais (SERENO, HOLZMULLER, LESMERE, 2000; MAYENCE *et al.*, 2004, RODRIGUES *et al.*, 2006; AMATO *et al.*, 2008).

Segundo TEIXEIRA e colaboradores (2008), além de todos os obstáculos apresentados na utilização dos antimoniais, o alto custo é mais um, girando em torno de 200 US\$ por paciente, o que é altamente dispendioso para o sistema de saúde pública de países em desenvolvimento.

Apesar do avanço de técnicas para caracterização molecular, a estrutura exata dos complexos antimonais permanece ainda desconhecida e é assunto de várias controvérsias (FRÉZARD *et al.*, 2009). Além disto, o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes não está bem esclarecido e não se sabe ainda se o antimonial pentavalente atua como pró-droga, sendo posteriormente reduzido á trivalente ou se a forma pentavalente atua diretamente no parasito (FRÉZARD *et al.*, 2009). Considera-se que a atividade leishmanicida dos antimoniais seja independente da atividade microbicida dos macrófagos, com ação direta nas atividades bioenergéticas do parasito, conduzindo a morte (AMATO *et al.*, 2009). Um dado importante a considerar durante a triagem inicial de novos compostos é que as formas promastigotas de *Leishmania sp* são resistentes à ação

leishmanicida dos antimoniais. Entretanto as formas amastigotas são altamente susceptíveis (AMATO *et al.*, 2009).

Dependendo da resposta imune de pacientes com leishmaniose, a eficácia da droga pode ser comprometida, especialmente em pacientes imunodeprimidos (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006). Modelos experimentais têm demonstrado que o estibogluconato de sódio, assim como a Pentamidina são dependentes de uma resposta celular e que a anfotericina B e mitelfosina são independentes, demonstrando que uma imunidade intacta pode ser a chave para a atividade leishmanicida de várias drogas (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006). Outros parâmetros também devem ser analisados na determinação da eficácia da droga tais como farmacocinética, metabolismo e excreção (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006).

Pentamidina, anfotericina B e paramomicina são consideradas como segunda escolha de tratamento (SANTOS *et al.*, 2008). A anfotericina-B é um composto poliênico usado como segunda linha no tratamento da leishmaniose desde 1960, naqueles pacientes que apresentam resistência aos antimoniais. Apesar da anfotericina B apresentar uma excelente atividade leishmanicida com pequenos números de casos de recorrência e melhor ação do que os antimoniais, infelizmente as dificuldades encontradas no uso fora do ambiente hospitalar e o seu alto potencial nefrotóxico inibem o seu uso como droga de primeira escolha (AMATO *et al.*, 2008). Este composto tem atividade seletiva contra fungos, bem como para *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi*. A seletividade é devida a alta afinidade da anfotericina B ao ergosterol da membrana plasmática da *Leishmania*, mas também reconhece o colesterol das células humanas (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB *et al.*, 2006; AMATO *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2008). Diferenças na sensibilidade das espécies podem ser esperadas devido à variação do tipo e quantidade de esteróis nas membranas destas (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB *et al.*, 2006). Atualmente existem formulações da anfotericina-B associada a lipídeos, visando diminuir efeitos adversos promovidos por esta ligação (SANTOS *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2009). Contudo, outras limitações, tais como administração parenteral e alto custo, limitam o uso deste medicamento (DUTTA *et al.*, 2007, SARKAR *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2009).

Pentamidina foi à primeira droga a ser utilizada para pacientes refratários do estibogluconato de sódio (MISHRA *et al.*, 2009), uma amidina aromática,

apresenta atividade antitripanossomatídea, antifúngica, antibacteriana, antiviral e antitumoral (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004). Nos casos de leishmaniose tegumentar resistente aos antimoniais, a pentamidina apresenta bons resultados em pacientes imunodeprimidos, com menos efeitos colaterais do que os antimoniais. Contudo, para a leishmaniose visceral existe a necessidade de se administrar altas doses, aumentando assim, em muito a citotoxicidade da droga (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

A paramomicina um antibiótico aminoglicosídico, com administração parenteral tem sido utilizado na Europa para tratamento de infecções bacterianas (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004; CRUZ *et al.*, 2009). Contudo, está em triagem clínica na Índia e África contra leishmanioses cutânea e visceral. Apresenta uma variação na sensibilidade nas diferentes espécies *Leishmania* (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). A utilização da paramomicina associada ao Pentostam apresentou resultados similares à utilização do Pentostam sozinho, entretanto, o tempo de tratamento foi reduzido (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

Miltefosina (hexadecyfosfocolina-HePC) um análogo estrutural de compostos alquilfosfocolina, originalmente investigado por sua atividade anti-neoplásica. Desde 2002, tem sido usado com sucesso para tratamento da leishmaniose visceral na Índia (AMATO *et al.*, 2008; CRUZ *et al.*, 2009) e também como droga alternativa para pacientes com HIV (SANTOS *et al.*, 2008), além disso, é a primeira droga oral efetiva contra essa doença com uma taxa de cura de 98%. Miltefosina também tem sido usada para tratamento de leishmaniose cutânea (PARIS *et al.*, 2004; AMATO *et al.*, 2008). Entretanto, tem um alto custo, é potencialmente teratogênica, não recomendada para mulheres grávidas e possui significantes efeitos colaterais, (SANTOS *et al.*, 2008; SARKAR *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2008; SHUKLA *et al.*, 2009).

Dentre os mais variados compostos sintéticos que estão sendo avaliados atualmente, em geral as pesquisas têm levado em consideração as formas de administração, como: oral e tópica, com grandes avanços na imunoterapia, inibidores da síntese de purinas (alopurinol) e o uso de produtos naturais (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

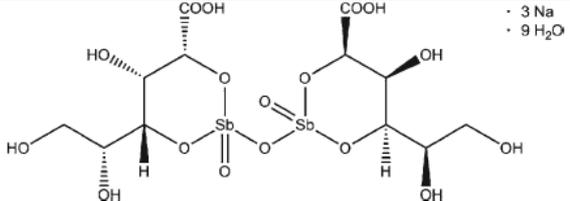
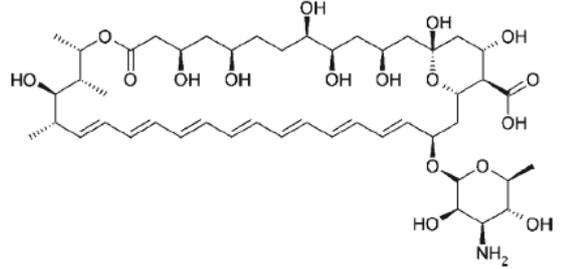
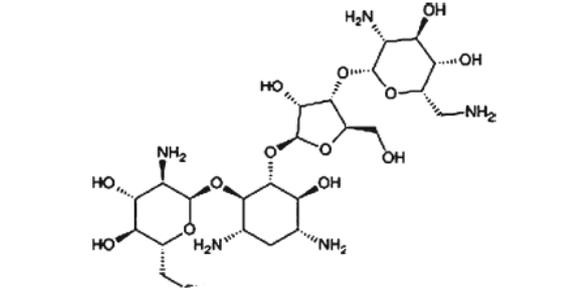
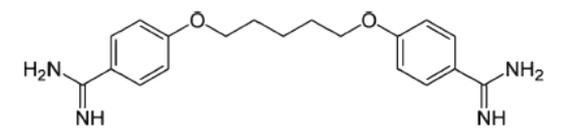
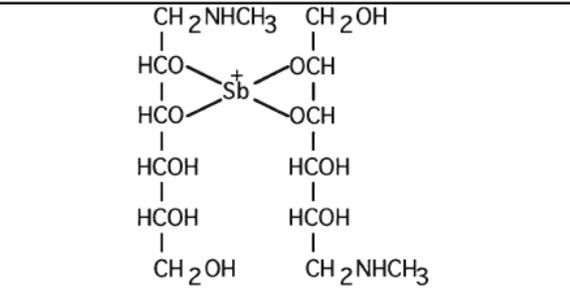
NOME	ESTRUTURA QUÍMICA	FÓRMULA estrutural	MASSA MOLECULAR (g/mol)
Estibugluconato de sódio		$C_{12}H_{38}Na_3O_{26}Sb_2$	910.9
Anfotericina B		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924.084
Paramomicina		$C_{23}H_{47}N_5O_{18}S$	615.629
Pentamidina		$C_{19}H_{24}N_4O_2$	340.42
Antimoniato de meglumine		$C_{14}H_{29}O_{10}N_2Sb$	507.01

Figura 7: Estrutura química, fórmula estrutural e massa molecular das drogas mais utilizadas no tratamento das leishmanioses adaptado de (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006).

O desenvolvimento de uma única droga para todas as manifestações clínicas de leishmaniose esbarra em fatores que devem ser superados: o sítio da infecção visceral ou cutânea que impõe diferentes farmacocinéticas; variações na sensibilidade da droga nas diferentes espécies de *Leishmania* infectantes para o homem e eficácia naquelas espécies que já adquiriram resistência aos

antimoniais (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006). Portanto a necessidade de encontrar novos compostos ou medicamentos efetivos, de menor toxicidade e com um baixo custo, que possam ser utilizados nos tratamentos nos casos de leishmanioses, tornou-se eminente, dando origem a vários trabalhos com produtos naturais e sintéticos.

1.7 Novos derivados de aminoquinolinas

Um grande número de compostos naturais e sintéticos vem sendo testado em ensaios de atividade leishmanicida nitrato (OLMO *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2008). As estruturas destes compostos são bem variadas, frequentemente contém nitrogênio heterocíclico como, quinolinas, acridinas, fenotiazinas, pirimidinas e purinas (OLMO *et al.*, 2002).

No passado os compostos derivados de quinolinas foram extensivamente estudados para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos o que levou a descoberta de algumas drogas, entre as quais a cloroquina e primaquina que têm sido usados como tratamento de primeira escolha para a malária durante décadas (TEKWANI e WALKER, 2006). Substituições do grupo no anel da quinolina com o grupo 6-dietil-aminohexylamino na posição 8, produziu significativa diferença na atividade leishmanicida, dando origem a derivados de 8-aminoquinolinas (MISHRA, SAXENA, SINGH, 2007). Estes constituem uma classe versátil de compostos, que em adição à atividade contra *Plasmodium*, apresentam também relatos na literatura de atividade antileishmania e anticoccídeos (TEKWANI e WALKER, 2006; PALIT *et al.*, 2008). Especificamente 8-aminoquinolinas, têm como droga conhecida a primaquina, muito utilizada como anti-malárico. Resultados recentes já em fase de triagem clínica com algumas 8-aminoquinolinas renovaram o interesse desta classe de compostos como promissora droga leishmanicida (NANAYAKKARA *et al.*, 2008). Estudos extensivos realizados em grandes laboratórios nos Estados Unidos levaram à síntese da WR 238605 (tafenoquina) e WR 6026 (sitamaquina) para o tratamento de malária e leishmaniose, respectivamente (TEKUANI e WALKER, 2006). A sitamaquina, um derivado 8-aminoquinolina, com potencial ação na leishmaniose visceral, é administrada oralmente, e atualmente está sendo sintetizada pelo laboratório GlaxoSmithKline (GSK, <http://www.gsk.com>). Apresenta percentual de

cura na clínica de até 92%, com moderada toxicidade para células humanas (CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CRUZ *et al.*, 2009). Embora, um estudo em pacientes com leishmaniose visceral no Brasil, a taxa de cura encontrada foi de 67% na mais alta dose escalar segura utilizada, demonstrou nefrotoxicidade (SINGH e SINVAKUMAR, 2004).

Estes fatores nos incentivaram a direcionar nossos estudos sobre o efeito de derivados de aminoquinolinas, especificamente 4-amino-7-cloro-quinolina, em *Leishmania sp.*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos citotóxicos de uma série de derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina em diferentes espécies de *Leishmania* e células de mamíferos, bem como o envolvimento da citocina TNF- α e do óxido nítrico (NO) produzidos por macrófagos, no intuito de melhor esclarecer o mecanismo de ação destes compostos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

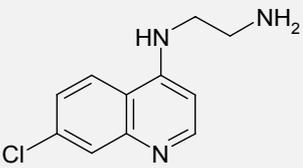
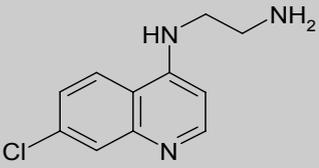
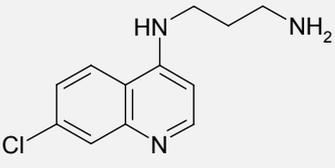
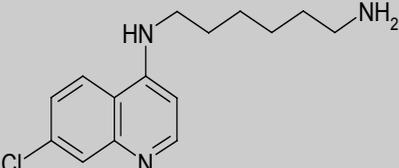
- 1- Avaliar o efeito citotóxico de novos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina, em diferentes concentrações, sobre promastigotas de *L. amazonensis*; *L. chagasi*; *L. major* e *L. braziliensis*;
- 2- Estabelecer relação estrutura-atividade dos compostos;
- 3- Avaliar o efeito citotóxico dos compostos em células de mamíferos, utilizando macrófagos peritoneais de camundongos Balb/c;
- 4- Selecionar um composto com melhor atividade antipromastigota de *Leishmania* e menor citotoxicidade em macrófagos para teste antiamastigota;
- 5- Avaliar o efeito citotóxico do composto 4-Amino-7-cloro-*N*-(prop-2-inil)quinolina (**5**) nas formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major*, em cinética de tempo e diferentes concentrações,
- 6- Quantificar os níveis de NO e da citocina TNF- α em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. major* e tratados com o composto **5**.

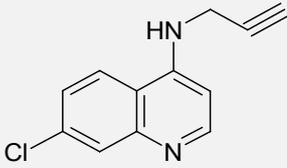
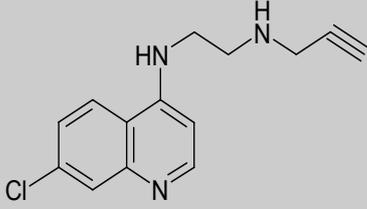
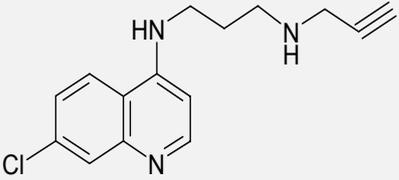
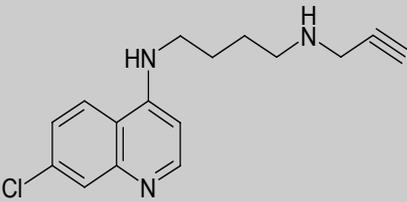
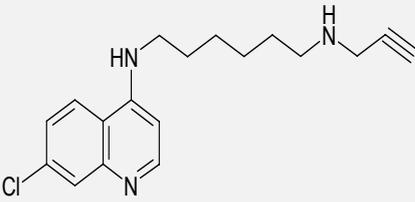
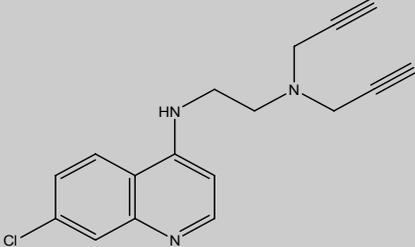
3 MATERIAIS E MÉTODOS

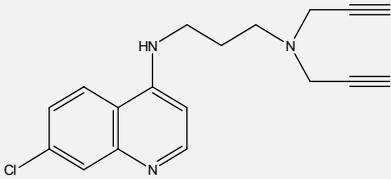
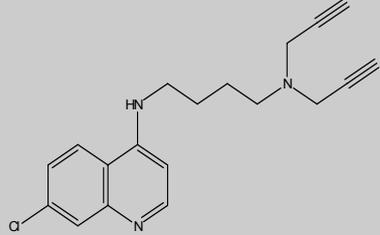
3.1 Moléculas utilizadas

Foram utilizadas moléculas sintéticas derivadas de 4-amino-7-cloro-quinolina, provenientes de síntese no núcleo de pesquisas químicas (NUPEQ) pelo prof. Dr. Adilson David da Silva, do Departamento de Química/Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Juiz de Fora. A anfotericina B fabricada pela Cristália-São Paulo, Brasil e foi gentilmente cedida pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Juiz de Fora. O reagente brometo de 3-(4,5-dimethyl-tiazol-2-il)-2,5difeníl-tetrazólico (MTT) foi adquirido da Sigma-Aldrich.

Tabela 3: Estrutura química e nome dos compostos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina.

	ESTRUTURA QUÍMICA	NOME DO COMPOSTO
1		4-Amino-7-cloro- <i>N</i> -(etilamina)quinolina
2		4-Amino-7-cloro- <i>N</i> -(butilamina)quinolina
3		4-Amino-7-cloro- <i>N</i> -(propilamina)quinolina
4		4-Amino-7-cloro- <i>N</i> -(hexilamina)quinolina

5		4-Amino-7-cloro- <i>N</i> -(prop-2-inil)quinolina
6		4-amino-7-cloro- <i>N</i> -(2-(prop-2-inilamino)etil)quinolina
7		4-amino-7-cloro- <i>N</i> -(2-(prop-2-inilamino)propil)quinolina
8		4-amino-7-cloro- <i>N</i> -(2-(prop-2-inilamino)butil)quinolina
9		4-amino-7-cloro- <i>N</i> -(2-(prop-2-inilamino)hexil)quinolina
10		4-amina-7- <i>N</i> -(2-(di(prop-2-inil)amino)etil)quinolina-

11		4-amina-7-N-(3-(di(prop-2-inil)amino)propil) quinolina
12		4-amina-7-N-(4-(di(prop-2-inil)amino)butil) quinolina

3.2 Parasitos

Foram utilizadas cepas de referência de *Leishmania*: *L. amazonensis* (cepa IFLA/Br/67/PH8); *L. chagasi* (cepa MHOM/Br/74/PP75, isolada de paciente com leishmaniose visceral); *L. major* (MRHO/SU/59/P) e *L. braziliensis* (MHOM/Br/75/M2903), cedidas gentilmente pela prof^a. Maria Aparecida de Souza, da Universidade Federal de Uberlândia. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio Warren (infusão de coração e cérebro - Himédia/ Mumbai, Índia, hemina e ácido fólico - Sigma Chemical Co. St Louis, Mo). Promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em Meio 199 (Sigma Chemical Co. St Louis, Mo.). Promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* foram cultivadas em Meio BHI (Infusão de coração e cérebro) Em todas as condições foi acrescido 10% de soro fetal bovino (SFB) e os parasitos foram cultivados a 24 °C.

3.3 Manutenção da infecção de *L. amazonensis* e *L. major* em camundongos Balb/c.

Para manutenção da cepa de *L. amazonensis* (IFLA/Br/67/PH8) e *L. major* (MRHO/SU/59/P) foram utilizados 2 (para cada espécie) camundongos Balb/c fêmeas com 6 semanas de idade. Foi inoculado no coxim plantar esquerdo 2×10^6 /ml em 100µl de PBS por animal (FIDALGO *et al.*, 2004), após pequenas

modificações. Para a punção foi utilizado o coxim plantar esquerdo dos camundongos Balb/c infectados previamente com as cepas de *L. amazonensis* e *L. major* e após 6 semanas de infecção foram utilizados para punção e retirada das formas amastigotas. Frascos de cultivo celular foram previamente preparados com os respectivos meios de cultura para cada espécie relacionada (meio Warren e BHI) e suplementados com 10% de SBP para o recebimento da punção. Para punção utilizou-se 500 µl de meio Warren e BHI para *L. amazonensis* e *L. major* respectivamente, em uma seringa de 1 ml. Foram ejetados no coxim plantar direito dos respectivos camundongos infectados 100 µl deste meio e imediatamente foi realizada a punção destes 100 µl na mesma seringa, juntando ao meio restante. Posteriormente os 500 µl foram adicionados ao meio contido nos frascos de cultivo celular. Após 24 hs, as primeiras formas promastigotas de *Leishmania* das respectivas espécies começaram aparecer.

3.4 Avaliação da citotoxicidade dos compostos aminoquinolínicos em promastigotas de *Leishmania*.

A atividade anti-promastigota foi realizada em *L. amazonensis*; *L. chagasi*; *L. major* e *L. braziliensis* e determinada de acordo com o método colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimethyl-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólico (MTT), baseado na redução do tetrazólio sódico em formazan (resíduo sólido encontrado após a reação do química MTT) pelas desidrogenases mitocondrais (MOSSMAN, 1983). As formas promastigotas foram distribuídas na placa de 96 poços na concentração de 2×10^6 células/ml para *L. amazonensis* (Meio Warren), *L. major* e *L. braziliensis* (Meio BHI) e de 3×10^6 células/ml para *L. chagasi* (meio 199), suplementado com 10% de SFB. As moléculas testadas foram adicionadas em concentrações variadas após diluição em água ou DMSO (em concentração máxima de 0,8%, não citotóxica para os parasitos). Os testes foram realizados em duplicatas, e no controle não houve a adição de compostos, apenas de DMSO. Após três dias de incubação em estufa a 24 °C, foi adicionado 10 µl de MTT à 5 mg/ml em cada poço e incubado durante quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 µl de isopropanol/ácido clorídrico (solução de isopropanol/HCl a 0,4%) e lida em espectrofotômetro à 570 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). Os

resultados foram expressos em porcentagem de inibição em relação ao controle e a partir desse teste de viabilidade será determinada a concentração inibitória (CI_{50}) de cada molécula, que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento celular. O CI_{50} foi calculado com o auxílio do programa *GraFit 5* (Erithacus Software Ltda., Horley, U.K). A anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência.

3.5 Avaliação da citotoxicidade dos compostos aminoquinolínicos em macrófagos (MØs) peritoneais de camundongos Balb/c.

Para verificar a citotoxicidade em células de mamíferos, foram utilizados MØs peritoneais de camundongos Balb/c estimulados com 1 ml de tioglicolato (3%). Após obtenção do lavado peritoneais dos camundongos Balb/c, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 rpm (centrífuga clínica), o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em meio RPMI-1640, sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionados 100 μ l em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 2×10^6 células/ml de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB em placa de 96 poços que permaneceu por cerca de 1 hora em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C para aderência dos MØs a placa. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril e adicionado meio RPMI-1640 contendo 10% SFB. Após 24 horas, foram adicionadas as moléculas a serem testadas em diferentes concentrações. Todas as moléculas que obtiveram atividade antiparasitária nos testes anti-promastigotas de *Leishmania* foram testadas. Após 48 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C, foi adicionado 10 μ l de MTT (MOSSMAN, 1983) a 5 mg/ml e depois de duas horas, 100 μ l de isopropanol/ácido clorídrico foi adicionado em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). Cada teste foi realizado em duplicata.

3.6 Avaliação do efeito citotóxico em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major*.

Baseado na citotoxicidade dos compostos aminoquinolínicos em formas promastigotas e na citotoxicidade em células de mamíferos, o composto **5**, foi escolhido como modelo para atividade anti-amastigota em *L. amazonensis* e *L. major*.

Os testes biológicos anti-amastigotas foram realizados em MØs peritoneais de camundongos Balb/c estimulados com tioglicolato (3%) durante 3 dias. Na tentativa de estabelecer mecanismos de ação, foi realizado o teste anti-amastigota sob duas condições: (1) pré-tratamento das células hospedeiras com o composto **5** em diferentes concentrações, durante 24 horas e posterior interação de 3 horas das mesmas com promastigotas de *L. amazonensis* e (2) tratamento após interação célula-hospedeira/parasitos. Em resumo: sobre lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro na placa de 24 poços foram distribuídas 300 µl em cada poço de uma suspensão de $2,6 \times 10^6$ MØs peritoneais /ml meio RPMI-1640 contendo 10% SFB que permaneceram por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37° C. Após esse período, as células foram tratadas, lavadas com PBS estéril e adicionado 300 µl em cada poço de uma suspensão de 10×10^6 de promastigotas de *L. amazonensis* e 20×10^6 formas promastigotas de *L. major*, na fase estacionária/ml de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB para interagir por 3 horas com as células hospedeiras na razão de 10:1 parasitos/ MØ (*L. major*) e 5:1 parasitos/MØ (*L. amazonensis*) em estufa de CO₂ à 37° e 33°C respectivamente. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirada dos parasitos que não foram fagocitados e o composto **5** foi adicionado em diferentes concentrações. Após 24, 48 e 72 horas de tratamento, em estufa de CO₂, as células foram coradas com Giemsa. Cada teste foi realizado em duplicata.

O efeito antiparasitário do composto **5** para as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi avaliado a partir da contagem dessas formas dentro dos MØs parasitados em relação ao controle (MØs infectados sem a adição do composto).

3.7 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO) em MØs peritoneais de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*, *L. major* e *L. chagasi*.

O NO das formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi dosado através da concentração de nitrito (NO_2^-), subproduto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Alíquotas de 50 μl do sobrenadante das culturas infectadas com *Leishmania*, foram retiradas após 48 horas de tratamento com os derivados aminoquinolínicos e incubadas com 25 μl de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 25 μl de N-1-diidrocloreto de naftiletlenodiamina (Sigma) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma), sob temperatura ambiente, por 5 minutos. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices) e a produção de nitrito foi quantificada através da comparação com curva padrão utilizando diferentes concentrações de NaNO_2 .

Os controles para este experimento foram: (1) controle positivo de produção de NO sem estímulo, constituído de MØs; (2) controle positivo de produção de NO com estímulo, constituído de MØs + lipopolissacarídeo de bactéria *Scherichia colli* (LPS - 1 $\mu\text{g/ml}$) e IFN- γ (0.9 ng/ml). (3) controle de MØs infectados com *Leishmania* sem estímulo e com estímulo. Após a lavagem dos poços no decorrer do tempo de 48 horas, sobrenadantes foram coletados para mensuração de NO. A placa de 96 poços foi utilizada para observação da produção de NO mediante a utilização do composto.

3.8 Dosagem de Citocina (TNF- α) em MØs peritoneais de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis*, *L. major*.

A concentração da citocina TNF- α presente nos sobrenadantes de suspensão foi determinada pelo método imunoenzimático (ELISA) usando Kit comercial (eBioscience) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram utilizados os sobrenadantes de MØs tratados ou não com os derivados de aminoquinolinas para dosagem da citocina TNF- α . Placas de 96 poços Maxishorp foram sensibilizadas com 50 μl de anticorpo de captura (anti-citocina específico) em uma diluição de 1:250. No 2º dia, a placa foi lavada 5x com tampão de

lavagem (PBS/ tween 20 (10x). Os poços foram bloqueados com o diluente e incubados a temperatura ambiente por 1 hora, e novamente após este tempo lavado mais 5x com PBS tween. Foram então adicionados mais 50 μ l/poço da amostra e feita a curva de calibração. No 3º dia, a placa com a amostra foi lavada e adicionado o anticorpo de detecção 50 μ l/poço (1:250) e incubado a temperatura ambiente, lavada mais 5x e adicionada a enzima avidina diluída em 1:250. Após a adição da enzima adicionou-se 50 μ l do substrato/poço, por 15 minutos, finalizando com 25 μ l da solução stop/poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 450 nm. A quantidade da citocina foi calculada a partir da curva padrão, obtida por diferentes concentrações da citocina recombinante.

4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram representados por média \pm erro-padrão. Foram utilizados *One-Way Análise de Variância* para as análises de tratamento com o composto em diferentes concentrações e diferentes tempos, seguidos por teste de comparações múltiplas de Bonferroni e teste Dunnett para comparações entre os grupos com o grupo controle (*GraphPad Prism 5.00*). As diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$ onde (* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$).

5 RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas sessões: sessão um, na qual foi feita a avaliação da atividade dos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina em promastigotas de *Leishmania* para seleção de um composto biologicamente ativo e sem citotoxicidade em células de mamíferos para os ensaios anti-amastigota. Sessão dois, determinação da atividade anti-amastigota de *Leishmania* e análise do mecanismo de ação através da avaliação da produção de NO e de TNF- α .

SESSÃO UM

5.1 - Avaliação da citotoxicidade de derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina nas formas promastigotas de *Leishmania* e análise da relação estrutura atividade. Em triagem inicial, avaliou-se o efeito antiparasitário, *in vitro*, dos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolinas em promastigotas de várias espécies de *Leishmania* (tabela 4). Para tais ensaios, a viabilidade celular foi analisada após 72 horas de cultivo através do teste colorimétrico do MTT.

Foram utilizadas quatro espécies de *Leishmania*: *L. braziliensis*, *L. major*, *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Observou-se que houve variações de sensibilidade das formas promastigotas nas diferentes espécies de *Leishmania* com os compostos testados e com CI_{50} variando de 0,16 μ M a 87 μ M (tabela 4). Em relação à *L. chagasi*, dentre todos os derivados de 4-amino-7-cloro-quinolinas analisados, a série (**1**, **2**, **3**, **4**) demonstrou melhor atividade (CI_{50} de 7,09 μ M, 2,92 μ M, 0,16 μ M e 13,36 μ M, respectivamente). Além disso, verificou-se que, a atividade leishmanicida inicialmente aumentou com o aumento do número de átomos de carbono nos compostos (**2**, $n=2$; **1**, $n=3$; **3**, $n=4$) e até um número de 4 carbonos. Sendo que com um número 6 metilenos a atividade diminuiu. Dentro desta série, o composto **3** foi o que demonstrou melhor atividade leishmanicida em promastigotas de *L. chagasi* ($CI_{50} = 0,16 \mu$ M), com melhor atividade do que a droga de referência anfotericina B (AmB). Na análise de compostos que apresentam um grupo alcino introduzido na amina observa-se uma diminuição da atividade (tabela 5) com CI_{50} variando de 18,20 μ M a $> 87 \mu$ M, com exceção do composto **9** (CI_{50} de 9,43 μ M). Verificou-se

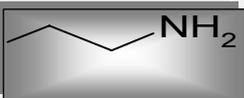
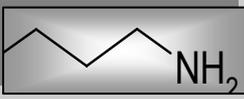
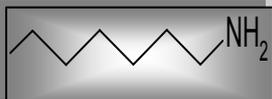
que na série de diaminoquinolinas os compostos (**1**, **2**, **3** e **4**) contendo grupos alcinos resultando nos respectivos derivados mono-alcinos (compostos **6**, **7**, **8** e **9**-tabela 5) e di-alcinos (compostos **10**, **11**, **12**-tabela 6) apresentavam um decréscimo na atividade leishmanicida. Isto comprova que em relação à estrutura atividade, observou-se que a presença do grupamento amino é importante na atividade leishmanicida, visto que a adição de grupos mono e di-alcinos levam à redução da atividade biológica.

Para promastigotas de *L. major*, em geral, compostos contendo o grupo amino (tabela 4) também mostrou melhor atividade do que as respectivas séries mono (tabela 5) e di-alcino (tabela 6), exceto o di-alcino **12**, com um CI_{50} de 1,80 μM .

Para promastigotas de *L. amazonensis*, os compostos diaminoquinolinas **1**, **2**, **3** e **4** ($CI_{50} > 87,00 \mu M$) não apresentaram atividade leishmanicida (tabela 4). Os mono-alcinos e **9** (tabela 5) apresentavam atividade nesta espécie (CI_{50} de 5,27 μM e 16,71 μM respectivamente).

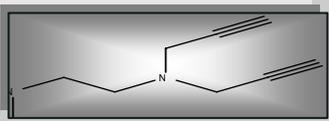
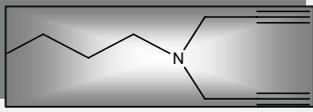
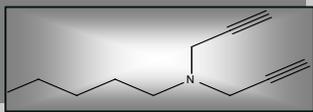
Em relação à *L. braziliensis*, não foi observada relação estrutura/atividade. O derivado mono-alcino **5** (tabela 5) apresentou o menor valor de CI_{50} (5,13 μM). Derivados di-alcinos (**10**, **11**, **12**) não foram avaliados nesta espécie de *Leishmania*.

Tabela 4 - Atividade de diaminoquinilonas em promastigotas de *Leishmania*.

CÓDIGO	ESTRUTURA QUIMICA	CI ₅₀ (μM)			
		<i>Leishmania</i>			
		<i>chagasi</i>	<i>major</i>	<i>braziliensis</i>	<i>amazonensis</i>
1 (2C)		7,09 (±0,01)	18,70 (±0,39)	>87,00	>87,00
2 (3C)		2,92 (±0,44)	24,83 (±1,08)	>87,00	>87,00
3 (4C)		0,16 (±0,06)	27,17 (±2,12)	>87,00	>87,00
4 (6C)		13,36 (±0,64)	27,80 (±1,25)	28,07 (±0,87)	>87,00
AmB*		1,90 (±0,25)	0,32 (±0,09)	0,30 (±0,09)	0,40 (±0,05)

*AmB= Anfotericina B (droga de referência)

Tabela 6 - Atividade de diamino-dialcinos quinolinas em promastigotas de *Leishmania*.

CÓDIGO	ESTRUTURA QUIMICA DI ALCINOS	CI ₅₀ μM			
		<i>Leishmania</i>			
		<i>chagasi</i>	<i>major</i>	<i>braziliensis</i>	<i>amazonensis</i>
10		>87,00	43,85 (±0,03)	NT*	>87,00
11		>87,00	20,70 (±0,57)	NT*	21,20 (±1,63)
12		>87,00	1,80 (±0,20)	NT*	6,40 (± 0,20)

(¹)L. c.= *L. chagasi*; (²)L. m.= *L. major*, (³)L. braz.= *L. braziliensis*; (⁴)L. ama.= *L. amazonensis*. *NT (Não Testada).

5.2 - Citotoxicidade dos compostos aminoquinolínicos em MØs peritoneais de camundongos Balb/c.

A citotoxicidade em células de mamíferos foi realizada em MØs peritoneais de camundongos Balb/c, após 48 horas da adição dos compostos e a viabilidade foi analisada pelo método do MTT. Como pode ser verificado na tabela 7, os derivados de diaminoquinolinas **1, 2, 3 e 4** apresentaram citotoxicidade significativa para as células de mamíferos, com DL₅₀ variando de 24,83 μM a 32,40 μM. Compostos contendo grupamentos mono e di-alcinos (**7, 9, 8, 6, 5, 10, 11, 12**) não foram citotóxicos (CI₅₀ acima de 100 μM).

Tabela 7: Citotoxicidade dos derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina em MØs peritoneais de camundongos Balb/c.

Composto	*DL ₅₀ (µM)
1	32,40 ± 0,04
2	30,84 ± 7,22
3	29,80 ± 7,59
4	24,83± 1,08
5	> 100,00
6	> 100,00
7	> 100,00
8	> 100,00
9	42,31± 1,15
10	> 100,00
11	> 100,00
12	>100,00

DL₅₀ (µM) - Dose letal do composto que mata 50% das células de mamíferos.

SESSÃO DOIS:

5.3 Análise da atividade do composto 5 em amastigotas de *L. amazonensis* e *L. major* e do mecanismo de ação do mesmo, através da avaliação da produção de NO e de TNF- α .

Para avaliação da citotoxicidade dos derivados de aminoquinolinas em amastigotas intracelulares de *Leishmania*, usou-se como parâmetros a efetiva atividade em formas promastigotas (tabelas 4-6) e citotoxicidade em células de mamíferos (tabela 7). Verificou-se que dentre os compostos testados, 3 e 5 demonstraram a melhor atividade antipromastigota nas várias espécies de *Leishmania* testadas, entretanto, este último foi muito citotóxico para os MØs. Assim, o composto 5, o derivado 4-Amino-7-cloro-*N*-(prop-2-inil)quinolina foi escolhido para os testes antiamastigotas de *Leishmania*.

5.4 Padronização do modelo de infecção de MØs peritoneais de camundongos Balb/c com promastigotas de *Leishmania*.

Preliminarmente aos testes de atividade antiamastigota de *Leishmania* com o composto 5, padronizou-se o modelo de infecção MØs/parasitos. Inicialmente, verificou-se que o trabalho com cepas de *Leishmania* com passagens sucessivas por culturas *in vitro* (*n* passagens) obtínhamos baixa taxa de infecção (< 30%) dos MØs peritoneais, com conseqüente redução do número de amastigotas intracelulares/100 MØs de maneira tempo dependentes (figura 9).

Posteriormente, verificou-se que, independente do número de passagens da cepa *in vitro* (cepa recém-isolada de camundongo ou com *n* passagens *in vitro*), o número de amastigotas intracelulares decrescia de maneira tempo dependente, mesmo na ausência de tratamento (dados não mostrados). Estudos prévios demonstraram a importância nas diferenças de temperaturas variando de 33°C a 37°C no processo de infecção e cultivo de amastigotas para diferentes espécies de *Leishmania* em MØs (ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994; QI *et al.*, 2004). Assim, analisou-se o processo de infecção de promastigotas de *L. amazonensis* nas temperaturas de 33°C e de 37°C e como pode ser verificado na figura 10, o número

de amastigotas/100 MØs foi superior na temperatura de 33°C (estatisticamente significativa, $p < 0,05$). Verificou-se que o número de amastigotas/100 MØs infectados à temperatura de 37°C decaía abruptamente: 24 horas (1.217 amastigotas), 48 horas (127 amastigotas) e 72 horas (14 amastigotas). Entretanto, quando o ensaio ocorreu à temperatura de 33°C, o número de amastigotas aumentou de maneira tempo-dependente: 24 horas (995 amastigotas), 48 horas (1.296 amastigotas) e 72 horas (1.741 amastigotas). Além disto, a taxa de infecção dos MØs foi de aproximadamente 90%.

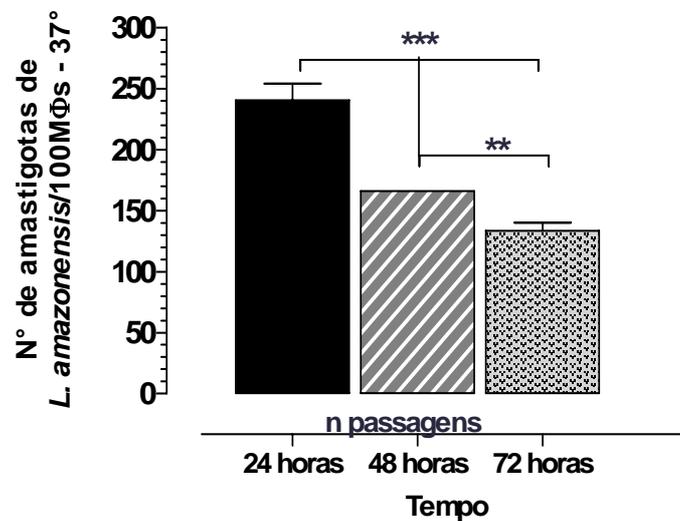


Figura 9: Número de amastigotas intracelulares após infecção dos MØs com promastigotas provenientes de n passagens *in vitro*. Os MØs foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (1:10) com n passagens em meio de cultivo. As diferenças entre os tempos foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) One Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni).

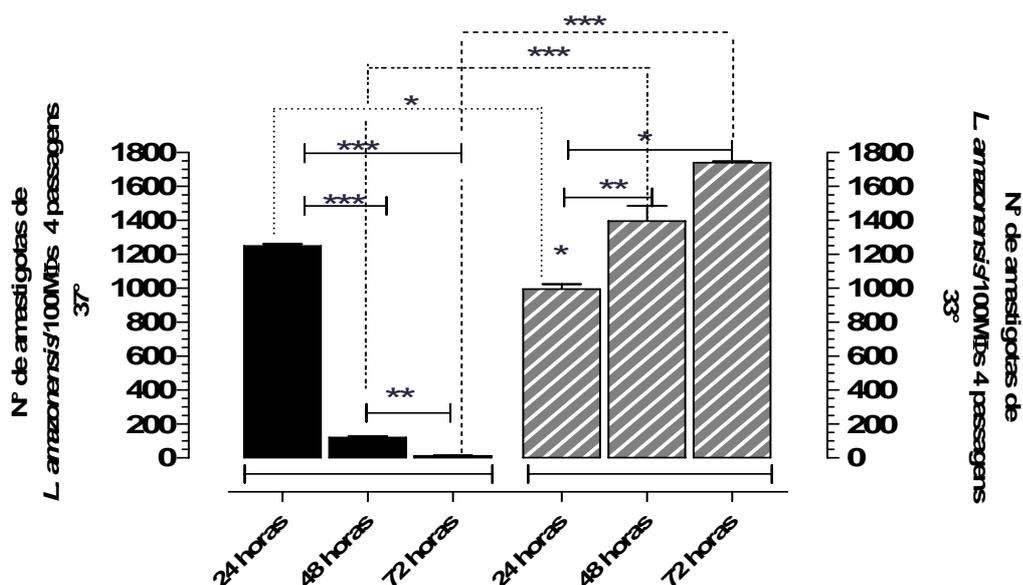


Figura 10: Comparação entre o número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* mantidas em diferentes temperaturas. Os MØs foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* com no máximo 4 passagens e mantidos a 37°C à esquerda e 33°C, à direita. Houve diferença estatística dentro dos grupos nos diferentes tempos. Teste One-Way análise de Variância linha contínua onde $p < 0,05$ (* ** ***). Houve diferença estatística significativa entre os dois grupos. One Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni) linha pontilhada.

A partir destes experimentos delineou-se os testes anti-amastigotas com o composto **5** utilizando cepas recém-isoladas de camundongos ($n=4$ passagens *in vitro*) e a infecção parasito/MØs foi mantida à temperatura de 33°C, durante todo o período.

5.5 Avaliação do efeito citotóxico do composto 5 em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major* em 24, 48 e 72 horas de tratamento.

5.5.1 *L. amazonensis*

Neste ensaio, estabeleceu-se duas condições: (1) tratamento prévio das células hospedeiras com o composto **5** e posterior interação de 3 horas das mesmas com promastigotas de *L. amazonensis* e (2) tratamento após interação célula-hospedeira/parasitos. Em todos os casos, houve a adição do composto **5** em diferentes concentrações (100 μM , 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM) e a atividade anti-amastigota foi analisada após 24, 48 e 72 horas de tratamento através da

contagem do número de parasitos intracelulares após coloração com Giemsa. O controle foi MØs sem tratamento.

Quando foi feito o pré-tratamento com o composto **5** das células hospedeiras e posteriormente feita a interação parasito/MØs não observou-se inibição da atividade anti-amastigota de *L. amazonensis* em nenhum tempo e concentrações quando comparados ao controle (sem tratamento), dados não mostrados. Entretanto, quando tratamos os MØs após a interação e interiorização das formas promastigotas, verificou-se expressiva atividade anti-amastigota, quando comparou-se com o controle (figuras 11 a 13).

Foi utilizado como controle positivo do tratamento, a anfotericina-B em diferentes concentrações, inibindo o crescimento das amastigotas intracelulas em 72 horas em dose dependente 1 ug/ml (94,77%); 0,5 ug/ml (99,31%); 0,1 ug/ml (94,11%); 0,05 ug/ml (86,78%) e 0,01 ug/ml (83,05%).

Analisando detalhadamente o efeito do tratamento do composto **5** após interação MØs-parasitas, verificamos que a carga global de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* reduz de maneira tempo e dose dependentes (figura 11). Em comparação com o controle, verificou-se que após 24 horas de tratamento houve inibição do crescimento das formas amastigotas nas concentrações de 100 μM (12,91%), 50 μM (0%), 25 μM (9,94%), 12,5 μM (12,70%), 6,25 μM (19,89%) e em 48 horas também houve inibição com valores entre 100 μM (57,55%), 50 μM (49,38%), 25 μM (36,49%), 12,5 μM (0%), 6,25 μM (0%). O pico de ação do composto foi atingido após 72 horas de tratamento, em que ocorreu inibição das formas amastigotas superior a 90% em todas as concentrações testadas: 100 μM (98,67%), 50 μM (98,58%), 25 μM (97,26%), 12,5 μM (98,67%), 6,25 μM (92,87%). Em todos os casos, a inibição global do número de amastigotas intracelulares foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$).

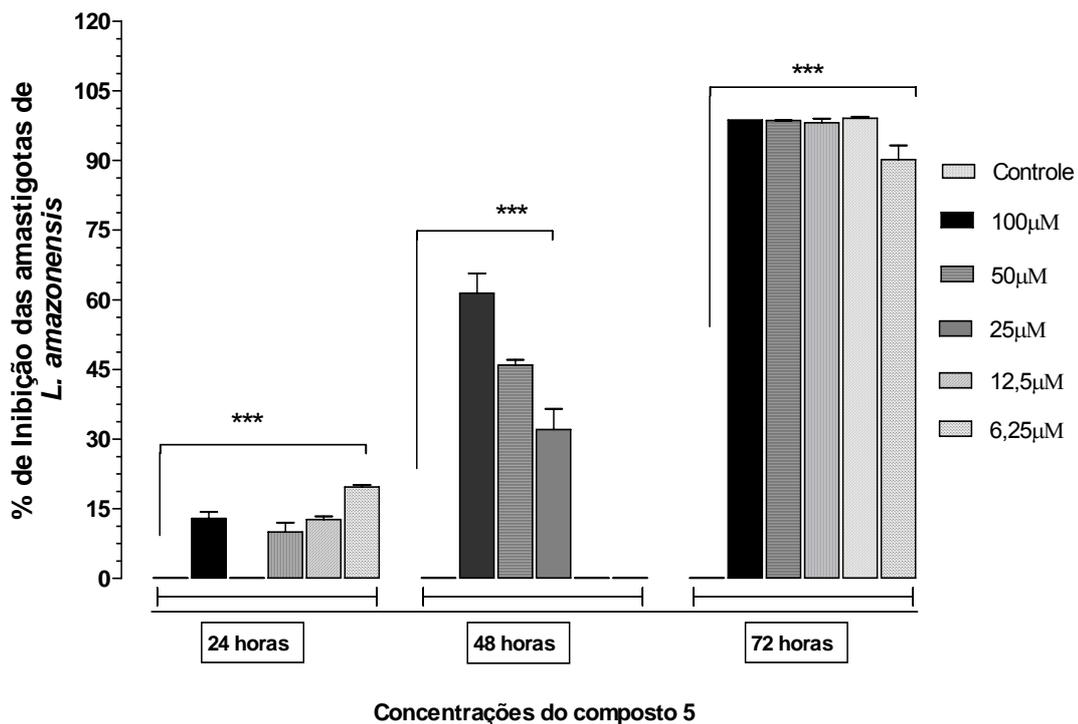


Figura 11: Inibição das formas amastigotas de *L. amazonensis* após tratamento com o composto **5**, em 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram estatisticamente significativos ($***p < 0,0001$) comparados com o grupo controle (ns = não significativo). One Way Análise de Variância (Teste Dunnett).

Observou-se que o composto **5** inibia a carga global de amastigotas intracelulares, resolveu-se verificar se o número de amastigotas/célula hospedeira também era reduzido (figura 12). Nos controles observou-se em 24 horas 9,93 amastigotas por MØ, 48 horas 13,96 amastigotas por macrófago e em 72 horas 17,35 amastigotas por macrófago. Após tratamento observou-se que o n° de amastigotas decaía em relação aos controles correspondentes aos tempos. Em 24 horas a 100 µM o número de amastigotas foi de (8,66), 50 µM (9,45), 25 µM (8,96), 12,5 µM (8,68), 6,25 µM (7,97). Em 48 horas a 100 µM o número de amastigotas foi (5,85), 50 µM (7,06), 25 µM (8,85), 12,5 µM (14,02), 6,25 µM (13,03). Em 72 horas a 100 µM o número de amastigotas foi (1,76), 50 µM (1,54), 25 µM (2,10), 12,5 µM (1,9), 6,25 µM (3,12).

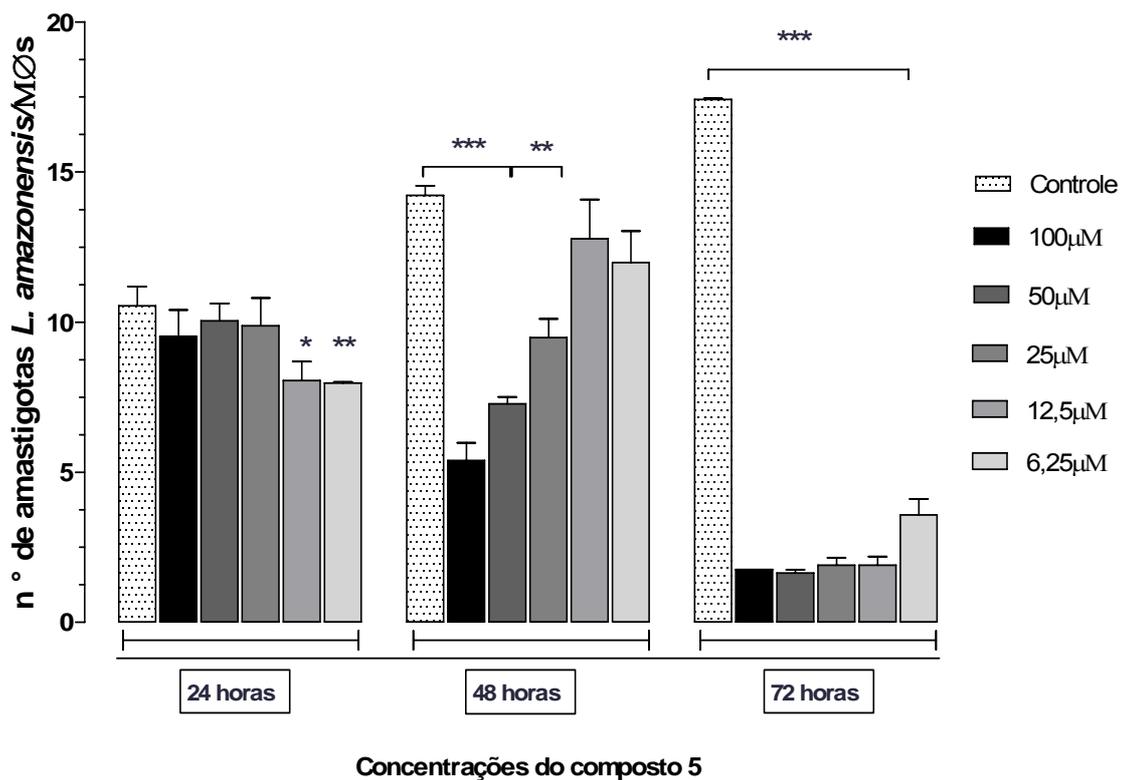


Figura 12: N° de amastigotas de *L. amazonensis*/macrófago após tratamento com o composto **5** em 24, 48 e 72 horas. Onde $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) são estatisticamente significantes. ns-não significativo. Teste One-Way-Análise de Variância (Teste Dunnett).

Analizou-se também a ação do tratamento com o composto **5** sobre as células infectadas e verificou-se que houve redução na porcentagem de células infectadas quando comparamos com os controles (figura 13). Após 24 horas de infecção, 97,44% dos MØs infectados apresentavam formas amastigotas de *L. amazonensis*; após 48 horas, 75,78% e em 72 horas 85,47%. Após o tratamento com o composto **5** a porcentagem de células infectadas reduziu: 24 horas a 100 μM a (75,77%), 50 μM (70,71%), 25 μM (74,07%), 12,5 μM (82,12%), 6,25 μM (73,58%). Em 48 horas a 100 μM (48,61%), 50 μM (57,33%), 25 μM (50,16%), 12,5 μM (80,59%), 6,25 μM (68,73%). Em 72 horas a 100 μM (2,53%), 50 μM (2,81%), 25 μM (4,39%), 12,5 μM (2,24%), 6,25 μM (7,13%).

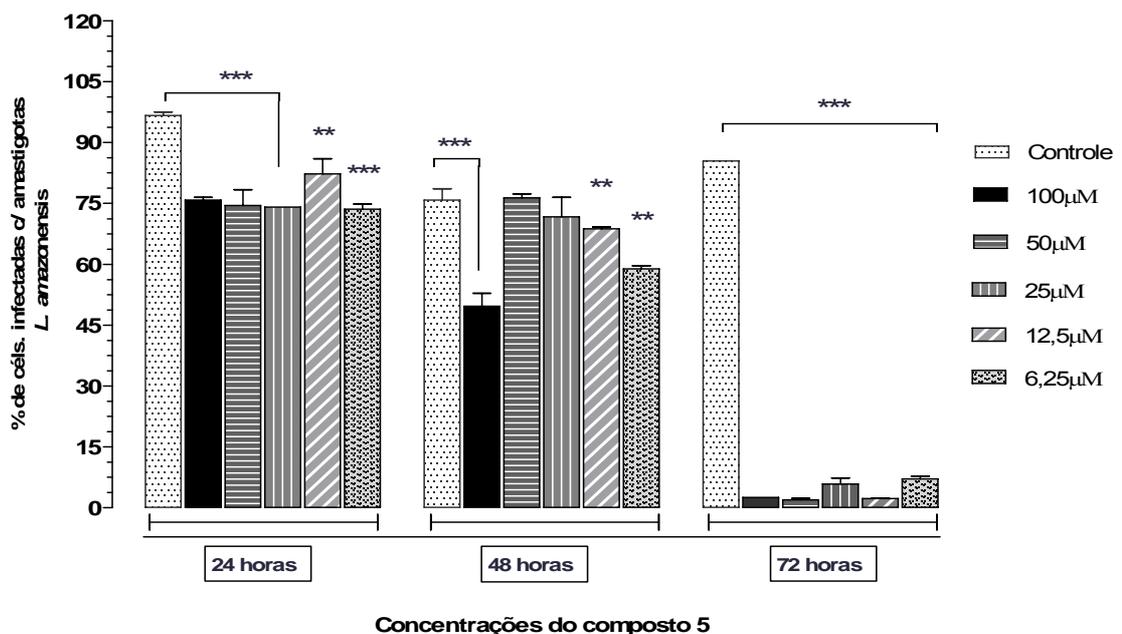


Figura 13: Porcentagem de células infectadas com amastigotas de *L. amazonensis* e tratadas com o composto **5** após 24, 48 e 72 horas. Houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, Onde $p < 0,01$ (**) e $p < 0,001$ (***) são estatisticamente significantes. ns-não significativo. Teste One-Way Análise de Variança (Teste Dunnett's).

Quando comparou-se a porcentagem de inibição do composto **5** nas formas promastigotas e nas formas amastigotas em diferentes concentrações (figura 14) observou-se principalmente que na menor concentração para promastigota 8,8 μM houve uma inibição de (63,68%) e para formas amastigotas na concentração de 6,25 μM houve uma inibição de (92,97%).

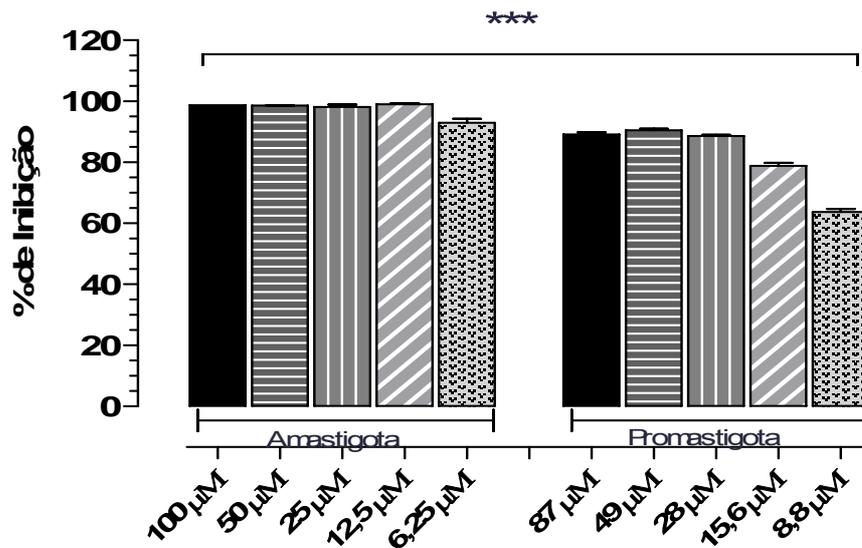


Figura 14: Porcentagem de inibição das formas amastigotas e promastigotas pós tratamento com diferentes concentrações do composto **5** após 72 horas. A diferença entre os dois grupos foi estatisticamente significativa. One Way Análise de Variância (pós teste de Tukey).

A figura 15 apresenta resultados representativos da avaliação microscópica dos experimentos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* tratados com o composto **5**. Nota-se a redução do número de amastigotas e de MØs infectados nos tratados (1-3 B), quando comparados aos respectivos controles (1-3 A).

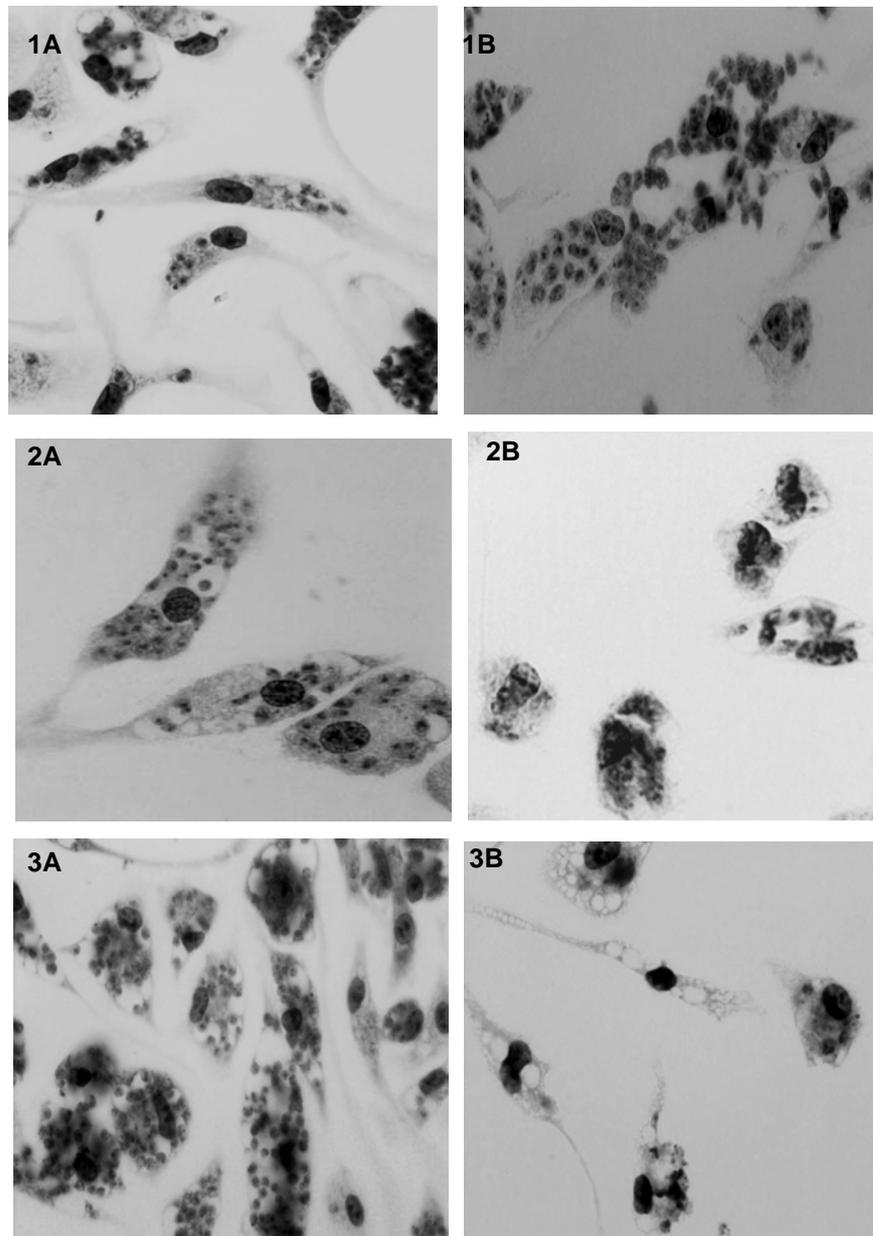


Figura 15: Resultados representativos da avaliação microscópica de MØs peritoneais de camundongos Balb/c infectados com *L. amazonensis* e corados pelo Giemsa. Controle de MØs não tratados, 24 horas (1A), 48 horas (2A) e 72 horas (3A) ou após tratamento com o composto **5** na concentração de 6,25 μ M em 24 horas (1B), 48 horas (2B) e 72 horas (3B). Microscopia óptica (1000X).

5.5.2 *L. major*

Para *L. major*, o composto **5** não demonstrou a mesma atividade que teve em *L. amazonensis*, como pode ser observado na tabela 8. No controle (sem tratamento), as células hospedeiras foram eficientemente infectadas com *L. major*: 24 horas, 556 amastigotas; 48 horas, 787 amastigotas e em 72 horas, 1039 amastigotas a cada 100 MØs infectados a 33°C. De acordo com a tabela 8, pode ser verificado que o tratamento com o composto **5** não inibiu a carga global de amastigotas intracelulares e nem a quantidade de MØs infectados. Além disto, não houve alteração quanto ao número de amastigotas/ MØs em comparação ao controle.

Tabela 8: Atividade leishmanicida do composto **5** em formas amastigotas de *L. major* após 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Tempo (hs)	% de inibição			% de MØs infectados			n° amastigotas/ MØs		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72
Controle	-	-	-	80,64	88,10	90,54	5,56	7,87	10,39
100 µM	24,36	37,03	22,85	79,05	77,51	91,74	4,20	4,95	8,01
50 µM	18,51	15,05	13,03	82,98	93,45	91,32	4,53	6,68	9,03
25 µM	9,98	3,93	15,05	79,68	93,45	92,16	5,16	7,32	8,82
12,5 µM	0	5,97	4,04	90,90	93,45	94,78	6,15	6,93	10,69
6,25 µM	0	0,69	2,1	84,74	83,33	98,5	6,50	7,76	9,95

5.6 Quantificação dos níveis de Óxido Nítrico (NO) em MØs infectados com *L. amazonensis* e *L. major* e tratados com o composto 5.

A atividade microbicida dos MØs infectados com *Leishmania* tem como um dos principais caminhos a ativação dos MØs via produção de NO. Assim, resolveu-se verificar se a atividade antiamastigota de *Leishmania* do composto 5 estava relacionada à produção de NO. Para isto, o NO foi dosado através da concentração de nitrito (NO^-_2), sub-produto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

O nitrito foi dosado nos sobrenadantes das culturas infectadas com *L. amazonensis* e *L. major* tratadas com o composto 5 ou não (controle), referentes aos experimentos anteriores. Foi escolhido o tempo de 48 horas, visto que este foi estabelecido após experimentos prévios os quais demonstraram ser neste período o pico máximo de produção de nitrito (dados não mostrados). Como estímulos para produção de NO, foram usados em todos os experimentos lipopolissacarídeo (LPS) + IFN- γ (controle positivo de produção de NO).

5.6.1 *L. amazonensis*

Na figura 16 observamos os controles utilizados durante o experimento. Como esperado, a ativação de MØs peritoneais de camundongos Balb/c com IFN- γ +LPS conduziu a uma produção de nitrito (27.402 μ M). Entretanto, quando as células foram infectadas com promastigotas de *L. amazonensis* na taxa de 1:5, 4 horas previamente a ativação, significativa redução na produção de nitrito foi observada em controle de MØs infectados com *L. amazonensis* e estimulados com IFN- γ +LPS (10.795 μ M). E ainda pode ser observada a produção de nitrito no controle de MØs (5,244 μ M) e controle de MØs infectados com *L. amazonensis* (0,244 μ M); a diferença entre ambos foi estatisticamente significativa.

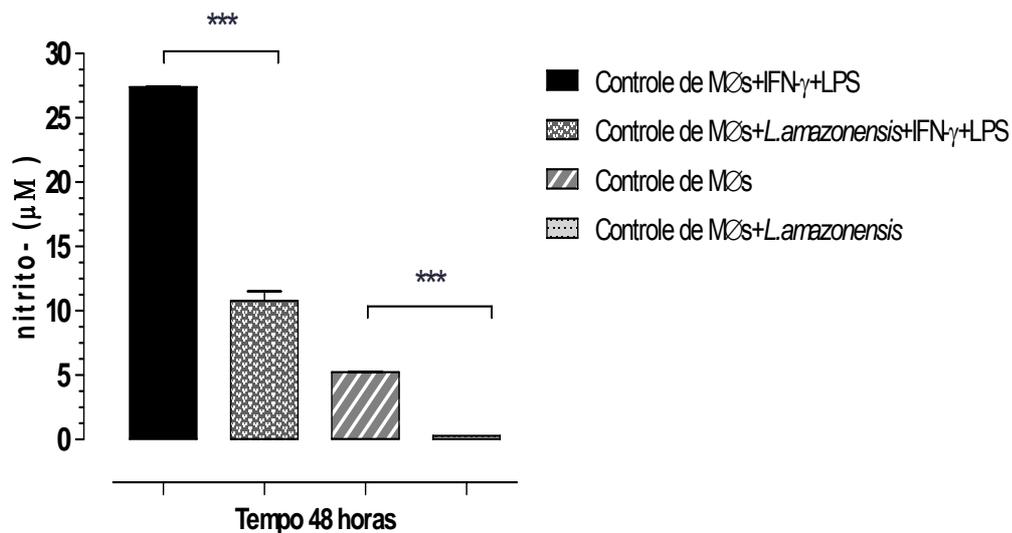


Figura 16: Controles dos níveis de NO por MØs peritoneais de camundongos Balb/c. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. amazonensis* na proporção de 1:5 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Os controles foram MØs não infectados estimulados e não estimulados. Então, 48 horas após o sobrenadante foi coletado e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. A produção de NO em controle de MØs + *L. amazonensis* + IFN- γ +LPS foi estatisticamente diferente em relação ao controle de MØs + IFN- γ +LPS. A produção de NO em controle de MØs + *L. amazonensis* foi estatisticamente diferente em relação ao controle de MØs. One-Way Análise de variância (pós teste Bonferroni).

Na figura 17 quantificamos os níveis de NO após tratamento com o composto **5** nos MØs peritoneais infectados com *L. amazonensis* ou não, estimulados com IFN- γ +LPS ou não. Como pode ser observado na figura 16A, quando tratamos os MØs, ocorreu inibição dos níveis de NO estatisticamente significativo ($p < 0.001$), quando comparamos com o controle de MØs (5,244 μ M). Entretanto, tratamento em MØs peritoneais infectados com *L. amazonensis* não houve interferência significativa nos níveis de NO (figura 16B). Nas figuras 17C e 17D, verificamos que o tratamento com o composto **5** inibiu de maneira significativa os níveis de NO, tanto nos MØs peritoneais estimulados com IFN- γ +LPS e infectados com *L. amazonensis* (figura 17C) quanto nos somente estimulados IFN- γ +LPS (figura 17D).

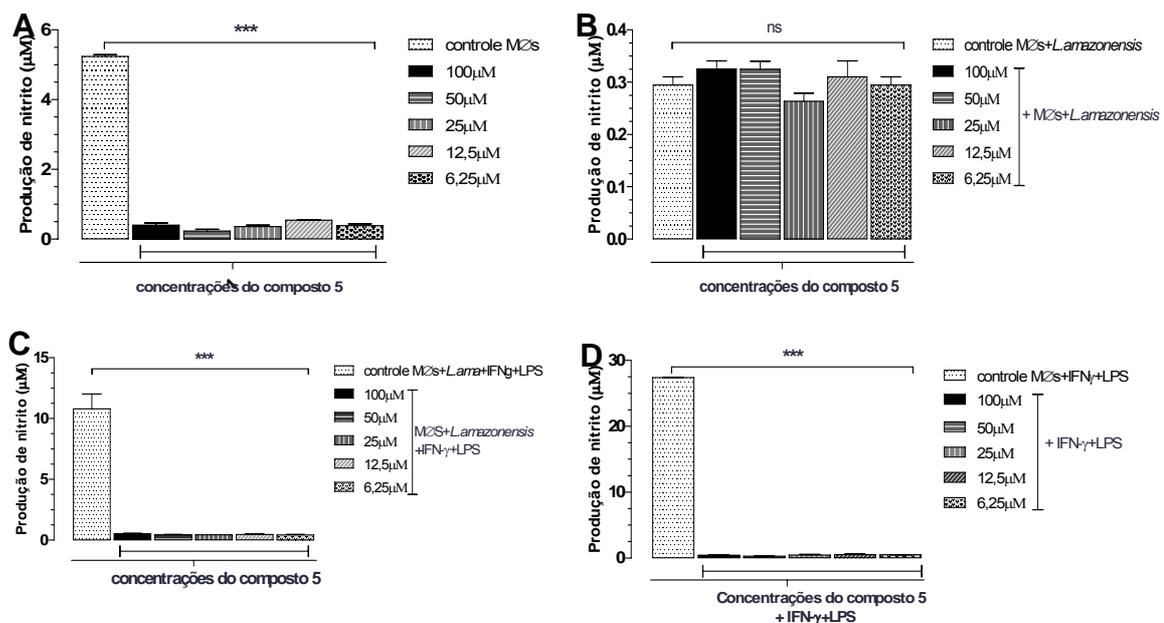


Figura 17: Quantificação dos níveis de NO por MØs peritoneais de camundongos Balb/c tratados com o composto **5**. (A), controle de MØs e MØs tratados com diferentes concentrações do composto **5**. (B), controle de MØs infectados com *L. amazonensis* e MØs infectados e tratados com diferentes concentrações do composto **5**. (C), controle de MØs previamente infectados 4 horas antes e estimulados com IFN- γ +LPS. (D), controle de MØs somente estimulados com IFN- γ +LPS e MØs tratados com diferentes concentrações do composto **5** estimulados IFN- γ +LPS. Então, 48 horas após o tratamento com o composto **5** os sobrenadantes foram coletados e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. A inibição dos níveis produção de NO no tratamento com diferentes concentrações do composto **5** foi estatisticamente significativa quando comparada aos controles nas figuras 16A, C, D ($p < 0,001$). Na figura 16B não houve uma diferença nos níveis de NO estatisticamente significativa ($p < 0,05$). ns-não significativo. One Way Análise de Variância (pós teste Dunnet).

5.6.2 *L. major*

Como pode ser verificado na figura 18, houve diferença nos níveis de NO estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparamos os níveis de NO com controle de MØs (1.466 μM) com MØs infectados com *L. major* (2.581 μM) Os controles positivos de produção de NO, com estímulo (MØs+LPS + IFN- γ) e MØs infectados com *L. major* + LPS + IFN- γ produziu 2,506 μM e 2,184 μM de de NO, respectivamente, entretanto não houve diferença estatística entre eles.

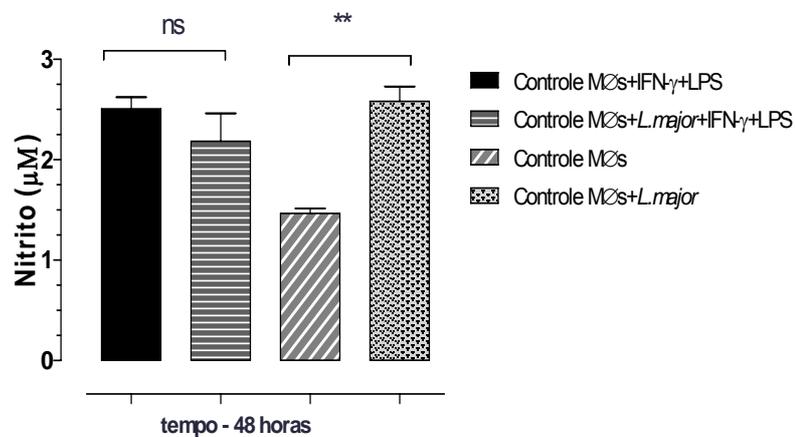


Figura 18: Controles dos níveis de NO por MØs peritoneais de camundongos Balb/c. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. major* na proporção de 1:10 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Os controles foram MØs não infectados estimulados e não estimulados. Então, 48 horas após o sobrenadante foi coletado e a concentração de NO foi mensurada pela reação de Griess. Os níveis de NO nas amostras estimuladas em relação ao controle não foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) e para produção de nitrito nas amostras não estimuladas em relação ao controle foi estatisticamente significativas. One Way Análise de variância (pós teste Bonferroni).

Na figura 19 quantificamos os níveis de NO em MØs peritoneais infectados com *L. major* após tratamento com o composto **5**, não houve diferença nos níveis de NO nas diferentes concentrações testadas em relação ao controle de MØs infectados com *L. major* (2.581 μ M)

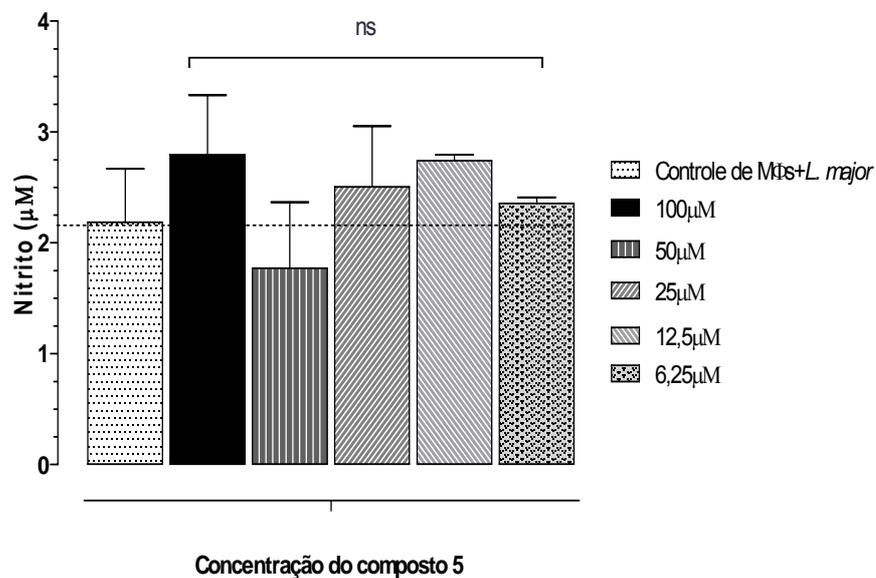


Figura 19: Quantificação dos níveis de NO por MØs infectados com *L. major* e tratados com o composto **5** em diferentes concentrações. MØs peritoneais (2×10^6 célula/ml) infectados com promastigotas de *L. major* (20×10^6 parasitos/ml) e tratados com o composto **5**. Os níveis de NO foi mensurado após 48 horas de infecção. Os níveis de NO em MØs tratados quando comparado com o controle MØs infectados não foi estatisticamente significativo. ns-não significativo. One way Análise de Variância (pós teste Dunnet's).

5.7 Análise dos níveis de TNF- α em MØs peritoneais infectados com *L. amazonensis* e *L. major* após tratamento com o composto 5.

Os níveis da citocina TNF- α presente nos sobrenadantes das culturas de MØs peritoneais infectados e tratados ou não com o composto 5, em diferentes concentrações, foi determinado pelo método imunoenzimático ELISA. A partir de testes iniciais no laboratório, verificamos que o pico de produção de TNF- α ocorria nas primeiras 24 horas (dados não mostrados). Assim, estabelecemos uma curva de produção da citocina TNF- α em diferentes tempos (12, 18 e 24 horas) e verificamos que não houve diferença significativa entre eles (figura 20). Estabelecemos como parâmetros para análise da produção de TNF- α de acordo com a curva o tempo de coleta de 24 horas.

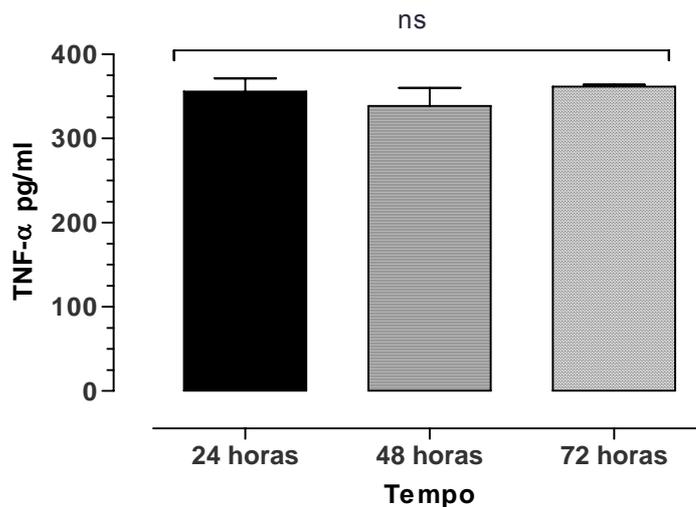


Figura 20: Níveis de TNF- α em diferentes tempos (12, 18 e 24 horas). Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos ($p < 0,05$) ns-não significativo. One Way Análise Variância (pós teste Bonferroni).

Na figura 21 observamos os controles usados no ensaio de avaliação do TNF- α . Observamos que houve diferença estatística significativa quando comparada com os controles estimulados (MØs + IFN- γ +LPS – 361.765 pg/ml) e controle MØs + *L. amazonensis* + IFN- γ +LPS – 482.028 pg/ml). Quando não houve estímulo, a produção de TNF- α foi menor (MØs - 49.886 pg/ml; MØs + *L. amazonensis* (96.709 pg/ml).

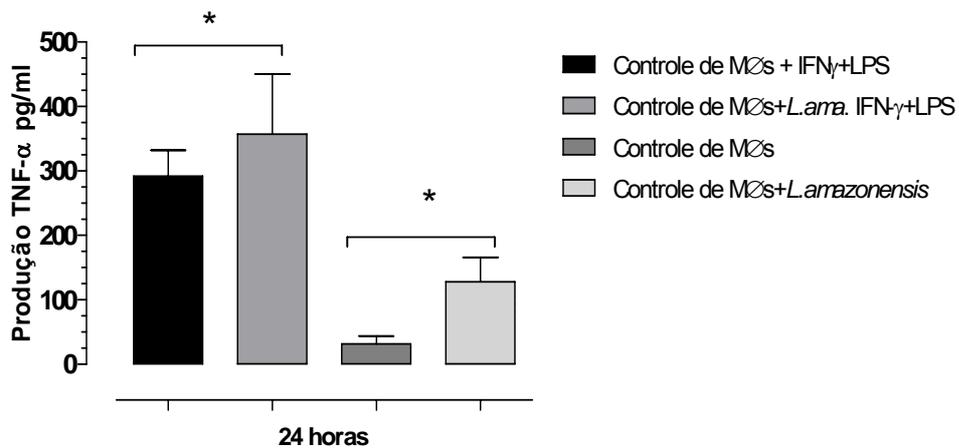


Figura 21: Níveis de TNF- α em MØs peritoneais de camundongos Balb/c nos grupos controles. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. amazonensis* na proporção de 1:5 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Após 24 horas houve a coleta dos sobrenadantes. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significativa entre os controles ($p < 0,05$). One Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni).

5.7.1 *L. amazonensis*

A produção de TNF- α foi mensurada através da coleta dos sobrenadantes das culturas de MØs peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados com o composto **5** em 24 horas após tratamento. Como pode ser verificado na figura 22A não houve diferença nos níveis TNF- α , em MØs tratados com o composto **5**. Figura 22B, houve aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) nos de TNF- α , quando tratamos com o composto **5** (MØs + *L. amazonensis* +composto **5**) nas diferentes concentrações testadas (100 μ M , 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M) quando comparamos com o controle MØs + *L. amazonensis* (96.709 pg/ml). MØs estimulados e tratados com diferentes concentrações do composto **5** apresentaram significativa produção de TNF- α (MØs + IFN- γ +LPS = 361.765 pg/ml). Interessantemente, MØs peritoneais tratados com o composto **5** e posteriormente estimulados com IFN- γ +LPS houve significativa produção de TNF- α (figura 22C). O mesmo foi observado para os MØs peritoneais infectados e tratados com o composto **5** e posteriormente estimulados com IFN- γ +LPS houve significativa produção de TNF- α (figura 22D).

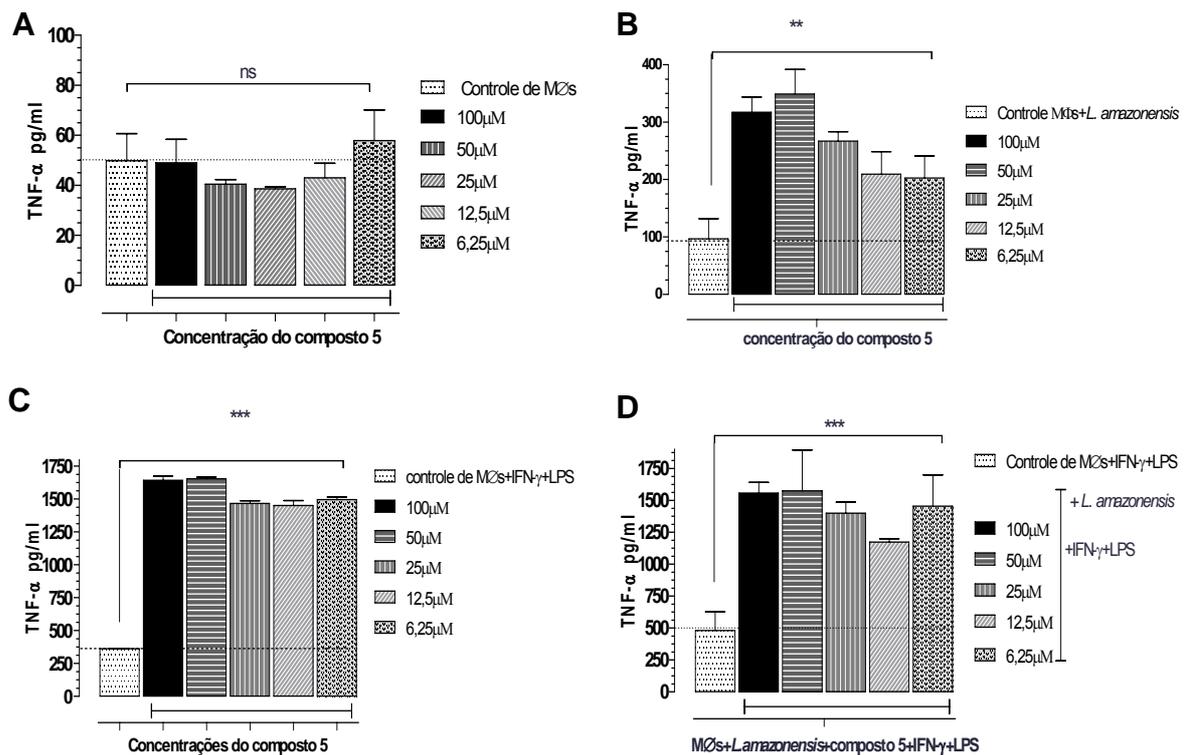


Figura 22: Quantificação dos níveis de TNF- α por M ϕ s peritoneais de camundongos Balb/c tratados com o composto 5. (A), controle de M ϕ s e M ϕ s tratados com diferentes concentrações do composto 5. (B), controle de M ϕ s infectados com *L. amazonensis* e M ϕ s infectados e tratados com diferentes concentrações do composto 5. (C), controle de M ϕ s previamente infectados 4 horas antes e estimulados com IFN- γ +LPS. (D), controle de M ϕ s somente estimulados com IFN- γ +LPS e M ϕ s tratados com diferentes concentrações do composto 5 estimulados IFN- γ +LPS. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Na figura 22A não houve diferença nos níveis de TNF- α comparado com o controle. Nas figuras 22 B,C,D houve aumento nos níveis de TNF- α no tratamento com diferentes concentrações do composto 5 estatisticamente significativa quando comparada aos controles. Análise One Way Análise de Variância (pós teste Dunnet's).

5.7.2 *L. major*

Na figura 23 observamos os controles usados no ensaio de avaliação dos níveis de TNF- α infectados ou não com *L. major*. Observamos que houve diferença estatística significativa quando comparada com os controles estimulados MØs + IFN- γ +LPS (361.765 pg/ml) e controle MØs + *L. major* + IFN- γ +LPS (482.028 pg/ml). Para células não estimuladas, os níveis de TNF- α foram (49.886 pg/ml) e MØs + *L. major* (252.153 pg/ml).

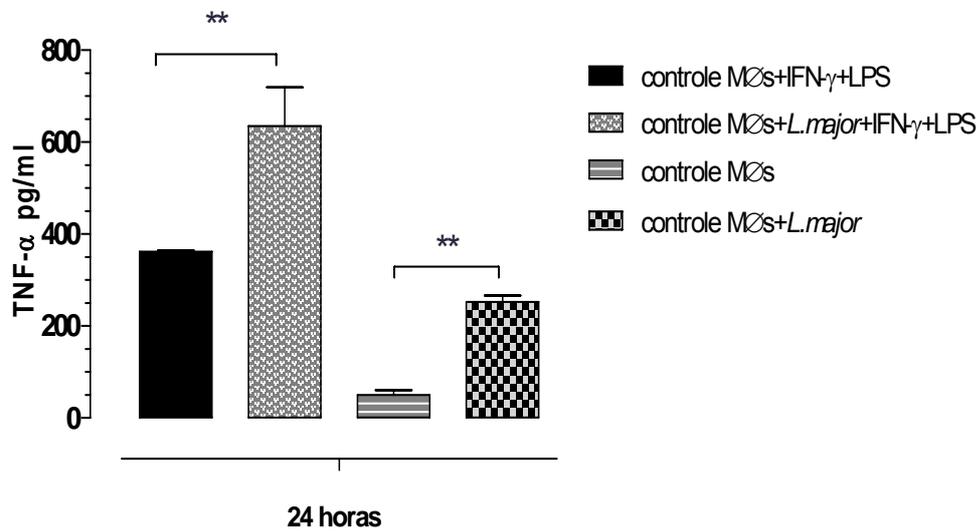


Figura 23: Níveis de TNF- α em MØs peritoneais de camundongos Balb/c nos grupos controles. As células foram infectadas previamente por 4 horas com *L. major* na proporção de 1:10 e após este tempo as células foram estimuladas com IFN- γ +LPS, ou não. Após 24 horas houve a coleta dos sobrenadantes. Os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. One Way Análise de Variância (pós teste Bonferroni).

Os níveis de TNF- α foram mensurados através da coleta dos sobrenadantes das culturas de MØs peritoneais infectados com *L. major* e tratados com o composto 5 em 24 horas após interação (figura 24). Estabelecemos como parâmetros para análise da produção de TNF- α de acordo com a curva o tempo de coleta de 24 horas. Para 100 μ M (168.886 pg/ml), 50 μ M (234.393 pg/ml), 25 μ M (252.153 pg/ml), 2,5 μ M (209.710 pg/ml), 6,25 μ M (206.250 pg/ml). Controle MØs + *L. major* (252.153 pg/ml)

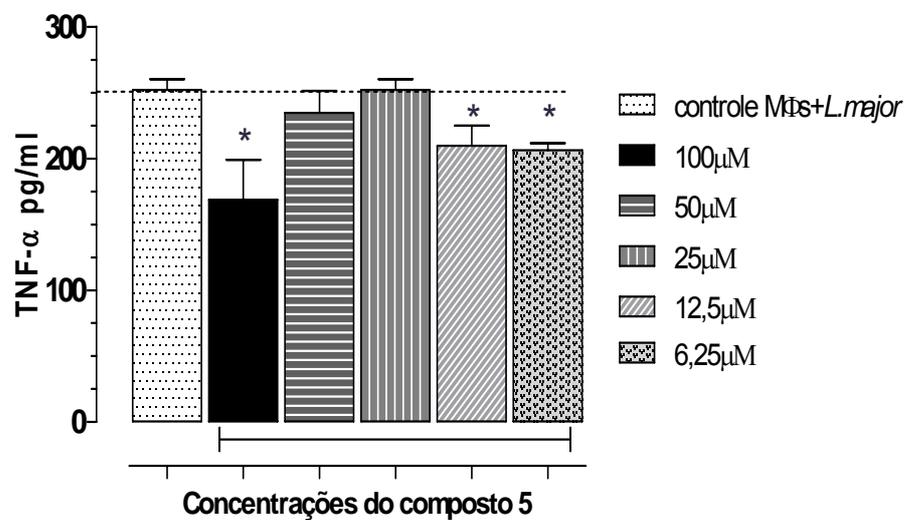


Figura 24: Níveis de TNF- α após tratamento com o composto 5. MØs peritoneais de camundongos Balb/c (2×10^6 /ml) foram infectados com *L. major* (20×10^6 /ml) e tratados com diferentes concentrações do composto 5. Após 24 os sobrenadantes das culturas foram coletados e os níveis de TNF- α foram mensurados por ELISA e os resultados foram expressos em pg/ml baseado na curva padrão determinada pela citocina recombinante. Houve diferença estatisticamente significativa quando comparados com o controle nas concentrações de 100 μ M, 12,5 μ M e 6,25 μ M ($p < 0,05$). Análise estatística One-Way Análise de Variância (pós teste Kruskal Wallis).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram testados 12 compostos derivados de aminoquinolinas, especificamente 4-amino-7-cloro-quinolina, em promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* (tabelas 4-6). Nossos resultados corroboram com dados obtidos de vários autores, os quais relatam as diferenças intrínsecas de sensibilidade entre diferentes espécies deste protozoário frente a vários compostos (ESCOBAR *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003; ROBERT *et al.*, 2003; MACHARIA *et al.*, 2004; CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006; SERENO *et al.*, 2007). Utilizamos quatro espécies de *Leishmania*, responsáveis por variadas manifestações clínicas que vão desde a simples forma cutânea à grave forma visceral. *L. major*, responsável por manifestações cutâneas; *L. braziliensis*, implicada nas manifestações cutânea simples e de mucosa; *L. amazonensis*, classicamente responsável pela forma cutânea-difusa e *L. chagasi*, pela leishmaniose visceral (ESCOBAR *et al.*, 2002; CROFT, SUNDAR, FAIRLAMB, 2006; CRUZ *et al.*, 2009). É interessante ressaltar que até mesmo a anfotericina B, droga controle usada neste trabalho, também demonstrou diferenças de atividade leishmanicida, com CI_{50} variando de 0,27 μM a 1,90 μM para promastigotas nas diferentes espécies testadas (tabela 4). Escobar e colaboradores (2002) demonstraram diferenças de sensibilidade analisando mitelfosina, primeira droga oral no tratamento das leishmanioses, e também edelfosina e anfotericina B em diferentes espécies de *Leishmania*. Estes autores verificaram que nas espécies testadas, a anfotericina B demonstrou variada sensibilidade, com CI_{50} de 0,037 μM a 0,27 μM . Além disto, observaram que as formas promastigotas e amastigotas de *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. major* possuem menor sensibilidade à mitelfosina e edelfosina do que *L. tropica*, *L. aetiopica*, *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. donovani*, sendo que *L. donovani* mostrou ser a espécie mais sensível às drogas analisadas.

Mais de 20 espécies de *Leishmania* são reconhecidas como infectantes para o homem em diversos países (CROFT, SEIFERT, YARDLEY, 2006; CRUZ *et al.*, 2009). Cada uma das espécies de *Leishmania* tem características bioquímicas e moleculares específicas nas quais podem refletir a sensibilidade das espécies a uma grande variedade de drogas (ESCOBAR *et al.*, 2002). As diferenças de

sensibilidades entre o gênero *Leishmania* acentuam a importância desta avaliação no tratamento das leishmanioses, pois somente a leishmaniose cutânea americana está associada a 14 espécies de *Leishmania* patogênicas para o homem com variações bioquímicas e moleculares (ESCOBAR *et al.*, 2002; BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

Na análise da relação estrutura/atividade dos compostos testados verificamos que: (1) os compostos mais ativos apresentam grupo amino livre e a troca de um dos hidrogênios por um grupo alcino (propargil) diminui a atividade leishmanicida, observada principalmente em promastigotas de *L. chagasi* e *L. major*. Assim, a série de diaminoquinolinas testadas (compostos **1**, **2**, **3**, **4**) apresentou melhor atividade antipromastigota de *Leishmania* sendo que o composto 3 obteve o menor Cl_{50} (0,16 μ M); (2) A troca do segundo hidrogênio pelo grupo propargil, diminuiu ainda mais a atividade biológica, salvo poucas exceções; (3) O aumento da cadeia carbônica entre os dois grupos aminos da série de diaminoquinolinas levando ao aumento da lipofilia, aumentou a atividade biológica, porém a atividade leishmanicida ideal foi obtida com quatro carbonos. Este fato foi mais evidente em *L. chagasi*, onde as variações de Cl_{50} foram mais relevantes, demonstrando que a atividade leishmanicida inicialmente aumentou com o número de átomos de carbono nos compostos (**1** $n=2$; **2** $n=3$; **3** $n=4$) e posteriormente a atividade caiu no composto (**4**, $n=6$), com Cl_{50} de 7,09 μ M, 2,92 μ M, 0,16 μ M e 13,36 μ M, respectivamente. Vários autores discordam quanto ao número ideal de carbonos na cadeia amina. Segundo Costa e colaboradores (2008) a lipofilia é uma característica a ser considerada no desenvolvimento de novos compostos antiparasitários, porque a cadeia hidrofóbica pode interagir com a membrana lipídica da célula alvo, a penetração do composto pode interferir com a via do metabolismo do parasito. Nakayama e colaboradores (2005) mencionam em seus estudos com derivados de quinolinas, que um ótimo número de carbonos para obter uma máxima atividade leishmanicida não deve exceder a 5 carbonos. Embora, Costa e colaboradores (2008) demonstraram em derivados de etilenodiaminas e propanoaminas que a atividade leishmanicida dependia do tamanho da cadeia de carbonos e os melhores resultados foram obtidos com 10 e 12 carbonos.

Em relação à citotoxicidade dos derivados de aminoquinolinas em macrófagos, células hospedeiras da *Leishmania* foram verificadas que dentre os 12 compostos analisados, todos os pertencentes à série de diaminos que possuem

grupo amino livre foram tóxicos (tabela 7). Foi interessante observar que, se por um lado, o grupamento amino livre era importante na atividade leishmanicida, o mesmo revelou citotoxicidade para as células de mamíferos, independente do número de carbonos.

Na segunda etapa deste trabalho, realizou-se testes *in vitro* anti-mastigotas de *Leishmania*, utilizando promastigotas em fase estacionária de crescimento para a infecção de macrófagos peritoneais de camundongos. Durante o cultivo *in vitro* das formas promastigotas de *Leishmania*, dois tipos principais ocorrem na cultura: os promastigotas procíclicos e os promastigotas metacíclicos (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998). Promastigotas procíclicos são formas mais alongadas, não infectivas para o hospedeiro mamífero e que replicam ativamente, sendo predominantes na fase exponencial de crescimento *in vitro*. *In vivo*, procíclicos são encontrados no intestino médio do vetor flebotomíneo, onde se multiplicam e se diferenciam para as formas infectivas metacíclicas. Promastigotas metacíclicas são definidas como formas pequenas, delgadas, com flagelo relativamente longo e que ocorrem em grande número em uma população de fase estacionária *in vitro*. *In vivo*, formas metacíclicas são encontradas no intestino anterior do flebotomíneo e são infectivas para o hospedeiro mamífero (CYSNE-FINKELSTEIN *et al.*, 1998). Segundo BATES (2007), na fase estacionária de crescimento *in vitro*, as formas promastigotas metacíclicas existem em maior proporção.

Além da necessidade do uso de promastigotas metacíclicas de *Leishmania* no processo de infecção, vários outros fatores podem interferir, entre eles, o tempo de manutenção da cultura *in vitro*, tempo de interação e número de promastigotas por célula hospedeira durante o processo e temperatura (BATES, 2007). Durante a padronização dos ensaios anti-mastigota de *Leishmania*, verificamos que apesar de utilizarmos promastigotas na fase estacionária de crescimento, nem sempre obtínhamos sucesso na infecção. Parte do insucesso foi proveniente do uso de promastigotas mantidos há muito tempo em cultura (*n* passagens) onde obtivemos uma taxa de infecção dos macrófagos inferior a 30%, o que é considerado para alguns autores como muito baixo. Segundo Buffet *et al.* (1995), quando o número de parasitos está restrito a poucos macrófagos infectados, uma quantificação óptica não é considerada real. Ayres e colaboradores (2007) e SILVA (2008), consideram uma boa porcentagem de infecção um índice que varia de 30-60%. Assim, quando usamos parasitos recém-isolados de camundongos (*n*= 4 passagens) obtivemos

uma excelente taxa de infecção em torno de 90%. Segundo Cysne-Finkelstein e colaboradores (1998), o número de passagens em cultura *in vitro* está diretamente relacionado ao processo de metaciclogênese de diferentes espécies de *Leishmania*, ou seja, quanto mais tempo de passagem *in vitro* menos formas promastigotas metacíclicas são encontradas no meio de cultivo. E ainda correlacionou o número de promastigotas metacíclicas com a habilidade de gerar, a partir desta cultura, uma alta porcentagem de amastigotas.

Além disto, verificamos que mesmo com o uso de parasitos recém isolados de camundongos, ocorreu um significativo decréscimo no número de amastigotas intracelulares em macrófagos infectados a 37°C sem nenhum tratamento específico (figura 10). Este problema foi contornado utilizando a temperatura de 33°C e nossos dados corroboram com aqueles previamente descritos (ZILBERSTEIN e SHAPIRA, 1994; CHANG *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2004; SILVA, 2008). Considerando-se a infecção humana por *Leishmania* dermatrópicas, verifica-se que as lesões se desenvolvem geralmente na pele, onde a temperatura corporal é inferior a 37°C, demonstrando que estes parasitos são termosensíveis. A utilização de termoterapia no tratamento de lesões de pacientes sem a utilização de fármacos leishmanicidas e a conseqüente cura clínica das lesões, corrobora esta hipótese (REITHINGER *et al.*, 2005; AMEEN, 2007; SILVA, 2008).

O derivado 4-Amino-7-cloro-*N*-(prop-2-inil)quinolina (composto **5**), demonstrou melhor atividade em formas promastigotas de *Leishmania* e baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Por isto, foi escolhido e testado em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major*. O composto **5** mostrou significativa atividade em amastigotas de *L. amazonensis* de maneira dose e tempo dependentes, alcançando em 72 horas de tratamento inibição da carga global das formas amastigotas superior a 90%, para todas as concentrações testadas (figura 11). Em adição, inibiu o número de amastigotas por macrófago e a porcentagem de células infectadas também de maneira dose e tempo dependentes (figuras 11, 12 e 13). Este efeito anti-amastigota do composto somente foi observado quando os macrófagos foram infectados e posteriormente tratados. O tratamento prévio dos macrófagos e posterior infecção não demonstraram atividade leishmanicida sugerindo que o composto deve atuar diretamente sobre o parasito (dados não mostrados).

Para amastigotas de *L. major* o composto **5** não demonstrou a mesma atividade leishmanicida observada com *L. amazonensis*, obtendo um pico máximo de porcentagem de inibição abaixo dos 37% em 48 horas a 100 μM (tabela 8). Estes dados ressaltam intrínsecas variações de sensibilidade às drogas entre formas amastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*.

Em formas promastigotas de *L. amazonensis*, o CI_{50} do composto **5** foi 5,13 μM e foi interessante notar que na menor concentração utilizada nos testes anti-amastigotas (6,25 μM), observamos 90% de inibição dos amastigotas intracelulares (figura 14), sugerindo que o composto atuou de maneira mais efetiva nas formas intracelulares de *L. amazonensis*. Este efeito pode ser devido a vários fatores: (1) diferenças metabólicas e bioquímicas entre os dois estágios de *Leishmania*, resultando no aumento da sensibilidade em formas amastigotas ou maior seletividade do composto a estas formas (PONTE-SUCRE *et al.*, 2007); (2) o fluxo do composto pode ter sido favorecido nos macrófagos, aumentando a concentração intracelular do mesmo em níveis de vacúolo parasitóforo e (3), o composto pode ter sido biotransformado dentro dos macrófagos originando um composto ainda mais ativo (NAKAYAMA *et al.*, 2007). Um dos mecanismos de ação proposto para a atividade leishmanicida dos antimoniais pentavalentes é de que o mesmo atue como pró-droga, sendo posteriormente biotransformado (FRÉZARD *et al.*, 2009).

É bem documentado que macrófagos são as células alvo na terapia leishmanicida visto que são essenciais na eliminação de parasitos intracelulares (MUKBEL *et al.*, 2007; KRAM *et al.*, 2008; PALIT *et al.*, 2008). A persistência de *Leishmania sp.* dentro dos macrófagos é determinada pelo balanço na habilidade da resposta imune ser suficientemente ativada pelos macrófagos infectados versus a habilidade do parasito resistir aos mecanismos citotóxicos dos macrófagos ativados (BALESTIERI *et al.*, 2002; MUKBEL *et al.*, 2007). Consequentemente, macrófagos constituem ambos hospedeiros e células efetoras em infecções causadas por *Leishmania sp.* (FERREIRA *et al.*, 2008; KRAM *et al.*, 2008). Como célula efetora, estas determinam um papel importante no controle dos parasitos intracelulares via produção de citocinas e de metabólitos reativos do nitrogênio e oxigênio (PONTE-SUCRE *et al.*, 2007). O NO é um dos principais intermediários reativos do nitrogênio e sua produção é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a

qual é induzida pela ativação *in vitro* através de estímulos como o IFN- γ , TNF- α e LPS, ou ambas citocinas (BALESTIERI *et al.*, 2002, QI *et al.*, 2004; WALLACE, 2005; WANESSEN *et al.*, 2007). Estudos prévios em modelos experimentais demonstram que o NO induz morte celular programada ou apoptose em amastigotas intracelulares de macrófagos infectados, constituindo um dos mecanismos de ação do NO (ZANGGER, MONTRAM, FASEL, 2002). Dependendo da espécie de *Leishmania* a ser considerada os mecanismos microbicidas inatos podem ser suficientes para controlar a infecção ou então suplementados com outros mecanismos da imunidade adquirida e também por quimioterapia (HOLZMMULLER, BRÁS-GONÇALVES, LESMERE, 2006).

Observou-se que durante a infecção de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e estimulados com IFN- γ +LPS ou não, os níveis de NO estavam reduzidos significativamente quando comparados aos respectivos controles (figura 16). Nossos resultados corroboram com dados prévios que demonstram que a infecção por *L. amazonensis* inibi a produção de NO tanto em células estimuladas quanto não estimuladas (BALESTIERI *et al.*, 2002; QI *et al.*, 2002; JI, SUN, SOONG, 2003). Balestieri e colaboradores (2002) e Genestra e colaboradores (2006), sugerem que a inibição da produção de NO estaria relacionada a mecanismos de evasão de *L. amazonensis*. Genestra e colaboradores (2006) e Kima (2007) sugerem que os mecanismos pelos quais *L. amazonensis* pode modular a produção de NO estariam relacionados à redução da atividade da iNOS, ou pela alteração das vias de sinalização que induzem a produção de NO, que estariam relacionadas a fosforilação da tirosina em macrófagos peritoneais infectados. Este efeito é independente das citocinas IL-4, IL-10 ou TNF- α , contudo, é um evento pós-transcricional ao mRNA da iNOS, onde os níveis não foram reduzidos, podendo assim serem revertidos na presença de IFN- γ (PEREIRA e ALVES, 2008).

Segundo Bogdan (2008), a produção de NO é a via efetora na eliminação das amastigotas de *L. major* em todos os modelos de infecção, apesar de considerar que o NO não deve ser necessariamente suficiente para controlar a infecção em certas cepas de *L. major*. Em nossos experimentos observamos que houve aumento nos níveis de NO em macrófagos infectados com *L. major* sem tratamento quando comparados com o controle (figura 18).

Quando correlacionou-se os níveis de NO após o tratamento com o composto **5** em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (figura 17B) ou *L. major* (figura 19) com as atividades antiamastigotas, as quais resultaram na morte e sobrevivência dos amastigotas respectivamente, verificamos que não houve significativa alteração nos níveis de NO. Sugerimos então que o composto **5** possa estar atuando por outra via microbicida além da via do NO, por exemplo, através de espécies reativas do oxigênio, também conhecido como ROS (HOLZMULLER, BRÁZ-GONÇALVES, LESMERE, 2006; WANASSEN *et al.*, 2007). Outra hipótese para explicar a atividade antiamastigota do composto **5** seria o efeito direto sobre os parasitos intracelulares. Estudos desenvolvidos por Tempone e colaboradores (2005) e Sucre e colaboradores (2007) também demonstraram que alguns derivados de quinolina apresentaram atividade antiamastigota de *Leishmania* efetiva e esta ocorria independente da produção de NO.

O composto **5** não alterou os níveis de NO em macrófagos infectados, independente da espécie de *Leishmania* envolvida. Entretanto, os níveis de NO foram alterados durante o tratamento inibindo claramente a produção desta molécula (células não infectadas e tratadas; células infectadas com *L. amazonensis*, tratadas e estimuladas; células estimuladas e tratadas - figuras 17A, 17C, 17D, respectivamente), demonstrando o papel imunomodulador deste composto.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos ativadas, linfócitos ou monócitos e está intimamente relacionada a processos inflamatórios. Além disto, o TNF- α pode promover a quimiotaxia de células inflamatórias no sítio da infecção. O aumento da liberação de TNF- α é um marcador de ativação de macrófagos e necessariamente está envolvido na morte de *Leishmania sp.* e outros patógenos, mediada pelo NO (KOLODZIEJ e KIDERLEN, 2005).

Em relação à participação do TNF- α na infecção por *L. amazonensis* e *L. major*, verificamos que o parasito induziu a produção desta citocina pró-inflamatória por macrófagos peritoneais infectados (figuras 21 e 23). A produção desta citocina em macrófagos infectados com *Leishmania* é contraditória. Chakour e colaboradores (2003) e Gomes e colaboradores (2003) quantificaram os níveis de TNF- α em macrófagos infectados por estas espécies de *Leishmania* e sugeriram que o papel do TNF- α é mínimo no controle da infecção. Wanasen e colaboradores (2007)

demonstraram que infecção *in vitro* de macrófagos por *L. amazonensis* não produziu TNF- α , entretanto macrófagos infectados com *L. major* produziram TNF- α . Segundo Balestieri e colaboradores (2002), macrófagos derivados da medula óssea e infectados *in vitro* com *L. major* não produzem TNF- α .

A correlação dos níveis de TNF- α após o tratamento com o composto **5** em macrófagos infectados com *L. amazonensis* (figura 22B) ou *L. major* (figura 24) com as atividades anti-amastigotas, nas quais resultaram em sucesso ou insucesso no controle das amastigotas, respectivamente, demonstram que: no primeiro caso ocorreu aumento significativo nos níveis desta citocina, enquanto que no segundo caso, houve inibição. Provavelmente o derivado de quinolina desempenha um papel importante no mecanismo imunorregulatório do TNF- α e o consequente aumento nos níveis de TNF- α favoreceu a redução da infecção por *L. amazonensis in vitro*. Ou, alternativamente e/ou simultaneamente, altos níveis de TNF- α imunomodularam positivamente a ação microbicida do composto.

Quando analisou-se os níveis de TNF- α em macrófagos tratados com o composto **5**, verificamos que houve detecção desta citocina na ausência de estímulo por IFN- γ +LPS, mas sem diferença significativa quando comparada ao controle (figura 21A). Nakayama e colaboradores (2005) e Palit e colaboradores (2008) concluíram em seus estudos que poucas quinolinas são capazes de induzir *in vitro* e *in vivo* a produção de citocinas tais como IFN- γ e outras. Quando os macrófagos estavam estimulados por IFN- γ +LPS, houve significativa produção de TNF- α (figuras 22C). Kolodziej e Kiderlen (2005) verificaram que a atividade leishmanicida de polifenóis estava relacionada à alterações nos níveis de NO e de citocinas em macrófagos ativados, mas não em macrófagos não infectados e sugerem que este efeito poderia ser benéfico para o hospedeiro, já que o sistema imunológico não é permanentemente ativado, mas somente sensibilizado a reagir efetivamente quando necessário. Estes dados reforçam o conceito de que o estado imune do hospedeiro pode afetar a eficácia da droga (MUNIZ-JUNQUEIRA e PAULA-COELHO, 2008).

A ativação de macrófagos usualmente é um evento polifenotípico conduzindo a um aumento de funções efetoras e regulatórias (KOLODOZIEJ E KIDERLEN, 2005). A liberação precoce do TNF- α é essencial na cascata de sinalização que conduz a produção do NO. Foi interessante verificar que o tratamento com o composto **5** de macrófagos peritoneais infectados com *L.*

amazonensis não influenciou diretamente na produção de NO, entretanto, teve um efeito significativo no aumento da produção de TNF- α . O conjunto de dados nos permitiu formular várias hipóteses sobre o mecanismo de ação leishmanicida deste composto: além do efeito direto sobre o parasito, pode haver a modulação da citocina pró-inflamatória TNF- α . O composto induz a produção de TNF- α em células infectadas e esta citocina se liga diretamente aos receptores de morte no parasito, induzindo-os a apoptose (CARSTEN, LUDER, LOPES, 2001). Além disto, a citocina TNF- α ou o próprio composto poderia também estar atuando como indutor de outros mecanismos microbicidas além do NO, que não mensurados nestes estudos, por exemplo, ROS (MUKBEL *et al.*, 2007). O efeito direto do composto **5** nas formas amastigotas de *L. amazonensis* pode ser também indutor de apoptose levando-se em conta que as moléculas do composto pode servir como ligantes para os receptores de morte TNF- α (TNFR1) ou Fas (CD95). Sucre e colaboradores (2007) sugeriram a morte por apoptose como possível mecanismo de ação para os compostos derivados de quinolinas. Kolodoziej e Kiderlen (2005) e Kram e colaboradores (2008) sugerem que uma droga ideal deveria ter ambos os efeitos leishmanicida direto e seletivo bem como a habilidade para ativar o sistema imune.

7 CONCLUSÕES

⇒ Foram testados 12 derivados de 4-amino-7-cloro-quinolina e alguns deles demonstraram notável atividade em formas promastigotas de *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. major*, corroborando com dados da literatura sobre a atividade leishmanicida de derivados de quinolinas;

⇒ Foi verificada importante relação estrutura/atividade, observada principalmente com *L. chagasi*, onde houve grande variação entre os CI_{50} : os compostos mais ativos apresentam grupo amino livre e a troca de um dos hidrogênios por um grupo propargil diminui a atividade leishmanicida; a troca do segundo hidrogênio pelo grupo propargil, diminui ainda mais a atividade biológica; o aumento da cadeia carbônica entre os dois grupos aminos levando ao aumento da lipofilia, aumentando a atividade biológica. A atividade leishmanicida ideal foi obtida com quatro carbonos.

⇒ O grupamento amino, importante na atividade leishmanicida, revelou citotoxicidade para as células de mamíferos, independente do número de carbonos.

⇒ Entre os 12 derivados de aminoquinolinas, o composto **5** (4-Amino-7-cloro-N-(prop-2-inil)quinolina, demonstrou melhor atividade em formas promastigotas de *Leishmania*, baixa citotoxicidade em células de mamíferos. Baseado nestes resultados este foi escolhido para testes em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e *L. major*, demonstrando:

- (1) Superior atividade nas formas intracelulares de *L. amazonensis* quando comparadas às formas promastigotas, reforçando diferenças metabólicas e bioquímicas entre os dois estágios de *Leishmania*.
- (2) Efetiva atividade em amastigotas de *L. amazonensis*, contrário ao observado na infecção por *L. major*, sugerindo intrínsecas variações de sensibilidade às drogas entre formas semelhantes de diferentes espécies de *Leishmania*.
- (3) Em relação ao mecanismo de ação anti-amastigota do composto **5** sugeriu-se: além do efeito leishmanicida direto sobre o parasito também deve ocorrer ativação de funções microbicidas dos macrófagos via citocina TNF- α , de maneira independente de NO.

⇒ O composto **5** possui ação imunomodulatória sobre os níveis de NO e de TNF- α em macrófagos peritoneais de camundongos, visto que inibiu a produção de

NO em macrófagos estimulados ou não; não interferiu nos níveis de TNF- α em macrófagos sem estímulos, entretanto levou a um importante aumento dos níveis quando estes estão estimulados.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho demonstrou que: nosso objetivo de obter derivados de aminoquinolinas com atividade leishmanicida foi alcançado, conduzindo a várias moléculas com atividade biológica em diferentes espécies de *Leishmania*. Além disto, observações preliminares em relação à estrutura atividade revelaram diferentes perfis entre as espécies de *Leishmania*, nas quais determinaram a importância dos conjugados diaminas/quinolinas e dialcinos/quinolinas na atividade leishmanicida e seletividade em células de mamíferos. Resultados obtidos com o derivado 4-Amino-7-cloro-N-(prop-2-inil)quinolina forneceu dados para melhor entendimento sobre o mecanismo de ação das aminoquinolinas sobre *Leishmania*. Este estudo abre perspectivas para utilização destas moléculas como drogas anti-protozoários ou modelo estrutural para otimização da síntese de outras moléculas.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h) 1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, **99(1)**: 7-2, 2005.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**, **112(pt18)**: p. 2993-3002, 1999.

ALMEIDA, M. C.; VILHENA, V.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: Analysis of its first steps. A review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **98 (7)**: 861-870, 2003.

ALVES, L. V.; CAVALHEIRO M. M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON. L. *In vitro* antiproliferative effects of several diaryl derivatives on *Leishmania* spp. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, **26 (4)**: 453-456, 2003.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; NETO, A. V.; NICODEMO, C. A. Mucosal leishmaniasis current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, **105(1)**: 1-9, 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. **Expert Opinion Pharmacotherapy**, **8(16)**: 2689-2699, 2007.

ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal Parasitology**, **30 (12-13)**: 1269-1281, 2000.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memories Institut Oswaldo Cruz**, **102 (2)**: 215-220, 2007.

BAILEY, M.; LOCKWOOD, D. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, **25(2)**: 203-211, 2007.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; COSTA, V. M. A. C.; BARRA-NETTO, M.; ABRAHAMSOHN, I. A. *Leishmania* (L.) *amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and infection**, **4(1)**: 23-29, 2002.

BASANO, S. A.; & CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira Epidemiologia**, **7(3)**: 328-337, 2004.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **International Journal for Parasitology**, **37(10)**: 1097-1106, 2007.

BERMAN, J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. **Indian Journal Medical Research**, **123(3)**: 289-294, 2006.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PloS Neglected Tropical Disease**, **2(10)**: 310-313, 2008.

BOGDAN, C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. **Cellular Microbiology**, **10(6)**: 1221-1234, 2008.

BUFFET, P. A., SULAHIAN, A., GARIN, Y. J. F., NASSAR, N., DEROUIN, F. Culture microtitration: a sensitive method for quantifying *Leishmania infantum* in tissues of infected mice. **Antimicrobial agents agents and chemotherapy**, **39 (9)**: 2167-2168.

BURCHMORE, R. J. S; BARRET, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. **International Journal for Parasitology**, **31(12)**: 1311-1320, 2001.

CARSTEN, G. K.; LUDER, U. G., LOPES, M. F. Intracellular protozoan parasites and apoptosis: diverse strategies to modulate parasite-host interactions. **Trends in Parasitology**, **17 (10)**: 480-487, 2001.

CHANG, K. P.; REED, S.G.; MCGWIRE, B. S.; SOONG, L. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. **Acta tropica**, **85(3)**: 375-390, 2003.

CHAKOUR, R.; GULER, R.; BUGNON, M.; ALLENBACH, GARCIA, I.; MAUE, J.; LOUIS, J.; TACCHINI-COTTIER, F. Both the fas ligand and inducible nitric oxide synthase are needed for control of parasite replication within lesions in mice infected with *Leishmania major* whereas the contribution of tumor necrosis factor is minimal. **Infection and Immunity**, **71(9)**: 5287-5295, 2003.

CYSNE-FINKELSTEIN, L.; TEMPORAL, R. M.; ALVES, F. A.; LEON, L. L. *Leishmania amazonensis*: Long-term cultivation of axenic amastigotes is associated to metacyclogenesis of promastigotes. **Experimental Parasitology**, **89(1)**: 58-62, 1998.

COSTA, C. F.; COIMBRA, E. S.; BRAGA, F. G. REIS, R. C. N.; SILVA, A. D.; ALMEIDA, M. V. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **63(1)**: 40-42, 2008.

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

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

CRUZ, A. K.; DE TOLEDO, J. S.; FALADE, M.; TERRÃO, M. C.; KAMCHONWONGPAISAN, S.; UTHAIPIBULL, C. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. **Current Drug Targets**, **10(3)**: 178-92, 2009.

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

DEANE, L.M.; GRIMALDI, G.Jr. Leishmaniasis in Brazil. In: Chang and Bray (eds) *Leishmaniasis*. Elsevier Science Publisher. pp247, 1985.

DINIZ, A. G. Resistência de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* ao óxido nítrico e correlação com a doença. Tese - Universidade Federal da Bahia. 1-94, 2004.

DUTTA, A.; MANDAL, G.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate a potencial herbal therapy in leishmaniasis. **Glycoconjugate Journal**, **24(1)**: 81-86, 2007.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S. L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (Miltefosine), ET-18-OCH₃ (Edelfosine) and Amphotericin B. **Acta Tropica**, **81(2)**:151–157, 2002.

FERREIRA, A. S.; SOUZA, M. A.; BARBOSA, N. R.; SILVA, S. S. *Leishmania amazonensis*: Xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of

macrophage nitric oxide production. **Experimental Parasitology**, **119 (1)**: 74-79, 2008.

FIDALGO, L. M.; ALVAREZ, M.; MARGARITA, A.; GEIGEL, L. F.; PINEIRO, P, P.; NAVARRO, M. S.; CABRERA, H. R. Effect of thiadiazine derivatives on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **99(3)**: 329-330, 2004.

FORTÉA, J. O.; PRINA, E.; DE LA LLAVE, E.; LECOEUR, H.; LANG, T.; MILON, G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, **219**: 66-74, 2007.

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

GARG, R.; DUBE, A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian Journal Medical Research**, **123 (3)**: 439-454, 2006.

GENESTRA, M.; SOUZA, W. J. S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; LEON, L. L. Comparative analysis of the nitric oxide production by *Leishmania sp.* **Medical Microbiology Immunology**, **192(4)**: 217-223, 2003.

GENESTRA, M.; SOUZA, W. J. S.; GUEDES-SILVA, D.; MACHADO, G. M. C.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; BEZERRA, F. M.; LEON, L. L. Nitric oxide biosynthesis by *Leishmania amazonensis* promastigotes containing a high percentage of metacyclic forms. **Archives Microbiology**, **185(5)**: 348-354, 2006.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **36(1)**: 71-80, 2003.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, **126**: 131-138.

GUPTA, N.; GOYAL, N.; RASTOGI. In vitro cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, **17 (3)**: 150-153, 2001.

GRIMALDI, G. Jr.; TESH, R. B. Leishmaniasis of New World: Current concepts and implication for future research. **Clinical Microbiology Review**, **6**: 230-250, 1993.

HOLZMULLER, R.; BRÁS-GONÇALVES, A.; LEMESRE, J. L. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxide-mediated programmed cell death in *Leishmania*. **Parasitology**, **132**: S19-S32, 2006.

JESUS, A. R.; LUNA, T.; ALMEIDA, R. P.; MACHADO, P. R. L.; CARVALHO, E. M. Pentoxifylline down modulate in vitro T cell responses and attenuate pathology in *Leishmania* and HTLV-1 infections. **International Immunopharmacology**, v. 8, p.1344–1353, 2008.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, **71(8)**: 4278-4288, 2003.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, **37(10)**: 1087-1096, 2007.

KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannis and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, **66(17)**: 2056-2071, 2005.

KRAM, D.; THALE, C.; KOŁODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Intracellular parasite kill: Flow cytometry and NO detection for rapid discrimination between anti-leishmanial activity and macrophage activation. **Journal of Immunological Methods**, **333(1-2)**: 79-88, 2008.

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

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C.; The innate immune response against *Leishmania* parasites. **Journal Immunobiology**, **213(3-4)**: 377-387, 2008.

MACHARIA, J.C.; BOURDICHON, A.J.; GICHERU, M.M. Efficacy of trypan® : a diminazene based drug as antileishmanial agent. **Acta Tropica**, **92(3)**: 267-272, 2004.

MAYENCE, A.; EYNDE, J. J. V. ; LECOUR JR. L. ; WALKER, L. A. TEKWANI, B.; HUANG, T. L. Piperazine-linked bisbenzamidines a novel class of antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **39(6)**: 547–553, 2004.

MAYRINK, W.; BOTELHO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. A.; BATISTA, S. A.; LIMA, A. O.; GENARO, O.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; MICHALICK, M. S. M.; WILLIAMS, P.; DIAS, M.; CAIAFA, W. T.; NASCIMENTO, E.; MACHADO-COELHO, G. L. L. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for american cutaneous leishmaniasis treatment. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, **39(1)**: 14-21, 2006.

MISHRA, B.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, **14(10)**: 1153-1169, 2007.

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

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

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

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonite directly increase phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increase nitric oxide production by phagocytes of healthy individual, in vitro. **International Immunopharmacological**, **8(12)**: 1633-1638, 2008.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in *Leishmaniasis*. **Lancet**, **366**: 1561-1577, 2005.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction a metabolic perspective. **Cellular Microbiology**, **10 (2)**: 301-308, 2008.

NAKAYAMA, H.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; ORTIZ, S. T.; SCHININI, A.; SERNA, E.; ARIAS, A. R.; FAKHFAKH, M. A.; FRANCK, X.; FIGADERE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Efficacy of orally administered 2-substituted quinolines in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49 (12)**: 4950-4956, 2005.

NAKAYAMA, H.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FRANCK, X.; FIGADERE, B.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A.; LOISEAU, P. M. *In vitro* and *in vivo*

antileishmanial efficacy of a new nitrilquinoline against *Leishmania donovani*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **61(2-3)**: 186-188, 2007.

NANAYAKKARA, N. P. D.; AGER, A. L.JR.; BARTLETT, M. S.; YARDLEY, V. Y.; CROFT, S. L.; KHAN, I. A.; MACCHESNEKY, J. D.; WALKER, L. A. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3,4-dichlorophenoxy]quinoline succinate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **52 (6)**: 2130-2137, 2008.

OLIVEIRA, C. I.; NETTO, M. B. O modelo experimental nas infecções causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. **Gazeta Médica da Bahia**, **75 (1)**: 35-45, 2005.

OLMO, E. D.; ALVES, M. A.; LOPEZ, J.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G.; ARIAS, R. A.; FELICIANO, A. S. Leishmanicidal activity of some aliphatic diamines and aminoalcohols. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, **12(4)**: 659-662, 2002.

PALIT, P.; PAIRA, P.; HAZRA, A.; BANERJEE, S. ; GUPTA, A. ; DASTIDAR, S. G. ; MONDAL, N. B. Phase transfer catalyzed synthesis of bis-quinolines : Antileishmanial activity in experimental visceral *Leishmaniasis* and *in vitro* antibacterial evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **44(2)**: 845-853, 2008.

PANARO, M. A.; ACQUAFREDDA, A.; LISI, S.; LOFRUMENTO, D. D.; TROTTA, I.; SATALINO, R.; SACCIA, M.; MITOLO, V. BRANDONISIO, O. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in *Leishmania infantum* infected human macrophages stimulated with interferon- γ and a bacterial lipopolysaccharide. **International Journal Clinical & Laboratory Research**, **29(3)**: 122-127, 1999.

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

PEARSON, R.D. Pathology of Leishmaniasis. In: **Immunology and molecular Biology of Parasitic Infections**. Blackwell scientific Publications Inc., Boston, pp71, 1993.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, **158(4)**: 239-255, 2008.

PONTE-SUCRE, A.; FABER, J. H.; GULDER, T.; KAIHAHN, I.; PEDERSEN, S. E.; SCHULTHEIS, M.; BRINGMANN, G.; MOLL, H. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **51(1)**: 188-194, 2007.

PONTIN, K. Determinação da atividade biológica de bioterápico e extrato de própolis "in vitro" e "in vivo" na infecção experimental determinada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Campinas, 2005.

QI, H.; JI, J.; WANASEN, N.; SOONG, L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, **72(2)**: 988-995, 2004.

RIÇA-CAPELA, M. J.; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M. C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitology Research**, **89(3)**: 163-169, 2003.

REAL, F.; POUCHELET, M.; RABINOVITCH, M.; *Leishmania (L.) amazonensis*: Fusion between parasitophorous vacuoles in infected bone marrow derived mouse macrophages. **Experimental Parasitology**, **119(1)**: 15-23, 2008.

REITHINGER, R.; MOHSEN, M.; WAHID, M.; BISMULLAH, M.; QUINNEL, R. J.; DAVIES, C. R.; KOLACZINSKI, J.; DAVID, J. R. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan, a randomized, controlled trial. **Clinical Infectious Disease**, **40(8)**: 1148-1155, 2005.

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

ROBERT, J.M.H.; SABOURIN, C.; ALVAREZ, N.; ROBERT-PIESSARD, S. ; LE BAULT, G.; LE PAPE, P.. Synthesis and antileishmanial activity of new imidazolium-2-one derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, **38**: 711-718, 2003.

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

RODRIGUES, F. H. Efeito do imidocarb e do levamisol sobre a infecção experimental de camundongos BALB/c por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, MG. p. 1-8, 2005.

RODRIGUES, F. H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; GOMES, M. A.; BELETTI, M. E.; ROCHA, A.; GUIMARÃES, A. H.; CANDELORO, I.; DE SOUZA, M. A. Effect of imidocarb and levamisole on the experimental infection of Balb/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal Veterinary Parasitology**, **139(1-3)**: 37-46, 2006.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, **2**: 845-858, 2002.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, **25(8)**: 383-391, 2009.

SANTOS, O. D.; 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. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, **103**: 1-10, 2008.

SARAIVA E. M.; PINTO-DA-SILVA, L. H.; WANDERLY, J. L. M.; BONOMO, A. C.; BARCINSKI, M. A.; MOREIRA, M. E. Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. **Experimental Parasitology**, **110(1)**: 39-47, 2005.

SARKAR, A.; SEN, R.; SAHA, P.; GANGULY, S.; MANDAL, G.; CHATTERJEE, M.; An ethanolic extract of leaves of piper betle (paan) linn mediates its antileishmanial activity via apoptosis. **Parasitology Research**, **12(6)**: 1249-1255, 2008.

SERENO, D; HOLZMULLER, P.; LESMERE, J. L. Efficacy of second line drugs on antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Acta Tropica**, **74(1)**: 25-31, 2000.

SERENO, D; SILVA, CORDEIRO; MATHIEU-DAUDE, F.; QUAISSI, A.; Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitology International**, **56**: 3-7, 2007.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal Vector Borne Disease**, **45(4)**: 255-272, 2008.

SHAW, J. The leishmaniasis – survival and expansion in a changing world a mini review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **102(5)**: 541-547, 2007.

SHUKLA, K. A.; SINGH, B. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. **Journal Applied Biochemistry Biotechnology**. 1-11, 2009.

SILVA, D. G. Padronização de amastigotas axênicos e intracelulares de *Leishmania* spp. e análise leishmanicida de chacolnas. Tese Universidade Federal de Santa Catarina, 1-120, 2008.

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

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, **40(2)**: 139-149, 2004.

STEBUT, E. V. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. **European Journal Dermatology**, **17(2)**: 115-122, 2007.

TEIXEIRA, M. J.; TEIXEIRA, R. C.; ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, **22(1)**: 32-40, 2006.

TEIXEIRA, E. M.; CARVALHO, A. S.; COSTA, J. CS.; DUARTE, S. L.; MENDONÇA, J. S.; BOECHAT, N.; RABELLO, A. In vitro and in vivo activity of meglumine antimoniate produced at Farmanguinhos-Fiocruz, Brazil, against *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*, *L. (L.) chagasi* and *L. (Viannia) braziliensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, **103 (4)**: 358-362, 2008.

TEKWANI, B. L.; WALKER, L. A. 8-aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. **Current Opinion in Infectious Diseases**, **19(6)**: 623–631, 2006.

TEMPONE, G. A.; SILVA, A. C. M. P.; BRANDT, C. A.; MARTINEZ, F. S.; BORBOREMA, S. E. T.; SILVEIRA, M. A. B.; ANDRADE, H. F. JR. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, **49 (3)**: 1076-1080, 2005.

TEMPONE, G. A.; BORBOREMA, S. E.; ANDRADE, H. F. JR.; DE AMORIM GUALDA, N. C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, **12(5)**: 3820390, 2005.

WALLACE, J. 2005. Nitric oxide as a regulator of inflammatory process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 100: 5-9.

WANASEN, N.; MACLEOD, C. L.; ELLIES, L. G.; SOONG, L. L-Arginine and Cationic amino acid transporter 2B regulate growth and survival of *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages. **Infection and Immunity**, **75 (6)**: 2802-2810, 2007.

WANASEN, N.; SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *leishmania* infection. **Immunology Research**, **41**:.15–25, 2008.

VIEIRA, N. C.; HENRNKENCHT, C.; VACUS, J.; FOURNET, A.; BORIES, C.; FIGADERE, B.; ESPINDOLA, L. S.; LOISEAU, P. M. Selection of the most promising 2-substituted quinoline as antileishmanial candidate for clinical trials. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, **62(10)**: 684-689, 2008.

ZANGGER, H.; MOTTRAM, J.C.; FASEL, N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? **Cell Death and Differentiation**, **9**: 1126-1139, 2002.

ZILBERSTEIN ,D.; SHAPIRA, M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Journal Annual Reviews Microbiology**, **48**: 449-470, 1994.