

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

FERNANDA GAMBOGI BRAGA

**ATIVIDADES DE DERIVADOS PURÍNICOS SOBRE
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *LEISHMANIA CHAGASI***

Juiz de Fora

2008

FERNANDA GAMBOGI BRAGA

**ATIVIDADES DE DERIVADOS PURÍNICOS SOBRE
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *LEISHMANIA CHAGASI***

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas na área de concentração de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Adilson David da Silva
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra

Juiz de Fora
2008

Braga, Fernanda Gambogi

Atividades de derivados purínicos em *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi* / Fernanda Gambogi Braga; orientador: Adilson David de Silva; co-orientador: Elaine Soares Coimbra. -- 2008.

102 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2008.

1. Biotecnologia. 2. Antiparasitários. I. Silva, Adilson David de. II. Coimbra, Elaine Soares. III. Título.

CDU: 57.08

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA, GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

Esta dissertação intitulada:

**ATIVIDADES DE DERIVADOS PURÍNICOS SOBRE
LEISHMANIA AMAZONENSIS E *LEISHMANIA CHAGASI***

apresentada por:

FERNANDA GAMBOGI BRAGA

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Adilson David da Silva – Universidade Federal de Juiz de Fora

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

Prof^a. Dr^a Maria Aparecida de Souza – Universidade Federal de Uberlândia

Prof^a. Dr^a Clarice Abramo – Universidade Federal de Juiz de Fora

Dissertação defendida em 12 fevereiro de 2008.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia, no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Elaine Soares Coimbra e do Prof. Dr. Adilson David da Silva, com o patrocínio financeiro da UFJF e da FAPEMIG.

Dedico este trabalho ao meu marido, Giovanni pelo companheirismo, compreensão, paciência e exemplo de dedicação ao ensino e pesquisa. Aos meus pais, Célio e Vânia que sempre me apoiaram e incentivaram a lutar pelos meus ideais e aos meus irmãos, Karina, Guilherme e Gustavo por tornarem a minha vida tão emocionante.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pela força concedida por mais essa etapa na vida.

Aos meus pais, Célio Antônio de Oliveira Braga e Vânia Lúcia Gambogi Braga pelo apoio, carinho e pelas orações, pois vocês são a base da minha vida e os meus ídolos.

Ao meu marido, Giovanni Wilson Amarante, sempre companheiro, amigo paciente, enfim, não há palavras para explicar o quanto você é importante em minha vida.

Ao meu orientador Adilson, pelo apoio e incentivo.

À minha eterna Mestre Elaine Soares Coimbra pela orientação, confiança, paciência, e principalmente pela amizade, conselhos e pela moradia. Você foi a minha verdadeira mãe científica.

Aos meus amigos do laboratório de Parasitologia, Carol, Wilson Jr. e Cristina por me auxiliarem em tudo que precisei. Vocês fazem parte deste momento tão importante em minha vida. À Ivone e Nicolli pelos bons momentos e pela convivência.

Aos professores do Setor de Parasitologia, Clarice, Pedro Paulo e Ana Márcia, pelo apoio e por fazer do ano em que fui professora, um ano tão inesquecível em toda a minha vida. Essa fase da minha vida foi um aprendizado eterno.

Às minhas amigas Ana Márcia e Rachel pelas nossas conversas, conselhos e a Rachel e ao Walter pela moradia.

À Maria Aparecida de Souza (Cida) por ser uma mãe científica temporária mesmo com muitos trabalhos a fazer durante o período que permaneceu no Laboratório de Imunologia da UFJF, sanou todas as dúvidas que em minha cabeça surgiram.

À Ana Paula Ferreira e ao Henrique Couto Teixeira por permitirem que eu pudesse utilizar o laboratório de Imunologia sempre que necessário.

Aos meus companheiros do laboratório de Imunologia, Suelen, Carol, Michele e Luciano pelos bons momentos compartilhados, e principalmente ao Caio e ao Francisco (Chico) por me auxiliarem quando precisei.

Às minhas eternas amigas Isabella, Suelen e Adalgisa pela amizade, carinho e companherismo, e principalmente a Isabella por me acomodar em “suas casas”, mesmo em períodos de turbulência.

À todos que colaboraram na realização deste trabalho o meu MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por diferentes espécies do gênero *Leishmania* que afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. As manifestações clínicas podem variar desde simples lesões cutâneas à leishmaniose visceral que pode ser fatal. A quimioterapia convencional baseia-se em múltiplas injeções parenterais com antimoniais pentavalentes que são consideravelmente tóxicos e propensos a induzir resistência. Medicamentos de segunda linha, como Anfotericina B e suas formulações lipídicas, ou são demasiadamente caros para uso rotineiro nos países em desenvolvimento ou são tóxicos. Considerando que a busca de drogas mais eficazes contra *Leishmania* tornou-se extremamente necessária, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de novos derivados da purina. Essas substâncias foram testadas contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* e amastigotas de *L. amazonensis*, através do método colorimétrico do MTT e contagem dos parasitos. Foi também analisada a produção de NO pelas formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e pelos macrófagos, medido espectrofotometricamente. Dentre os 13 derivados de purina testados, quatro, 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina, ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético, sal de flúor de 7,8-diidro-(1,4)tiazepino(3,2,4-hi)purina e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio)purina, inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀ de 50, 39, 28 e 50 µM, respectivamente). Somente o sal de 8,9-diidro-7H-(1,4) tiazepino(3,2,4-hi) purinil flúor inibiu o crescimento das formas promastigotas de *L. chagasi* (IC₅₀ de 28 µM). O ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético apresentou a melhor atividade anti-amastigota e reduziu cerca de 50% do número de amastigotas intracelulares após 48h de tratamento. Os derivados purínicos, em geral, reduziram a produção de NO em promastigotas de *Leishmania* e em macrófagos, mas no processo de interação parasito/célula hospedeira não houveram alterações significativas na produção de NO. Também foi testada a citotoxicidade contra células mamíferas para todos os compostos que apresentaram efeito leishmanicida, mas nenhuma substância apresentou efeito significativo. Os resultados contribuíram para o avanço na investigação de novas drogas anti-leishmania, e sugerem que ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético tem um potencial leishmanicida promissor.

Palavras-chave: *Leishmania*, derivados purínicos, NO, atividade antiparasitária.

ABSTRACT

Leishmaniasis are a group of diseases caused by different species of the protozoan parasite *Leishmania*, which affect more than 12 million people worldwide. The clinical manifestations may range from single cutaneous lesions to fatal visceral leishmaniasis. Conventional chemotherapy relies on multiple parenteral injections with pentavalent antimonials that are considerably toxic and prone to induce resistance. Second-line drugs, such as amphotericin B and its lipid formulations, are either too toxic or expensive for routine use in developing countries. Considering it, the search for more effective drugs against *Leishmania* became extremely necessary. In order to find new drugs against leishmaniasis this work checked the *in vitro* effect of purine derivatives. These substances were assayed against *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigotes and amastigotes of *L. amazonensis* through the colorimetric method of MTT and counting of parasites. It also examined the production of NO the promastigote forms and amastigote forms of *Leishmania* sp and the macrophages measured spectrophotometrically. Among the 13 derivatives of purine assayed four substances: 6-(3-chloropropylthio)-9H-purine, 2-(9H-purin-6-ylthio)acetic acid, salt of fluor of 7,8-dihydro-[1,4]thiazepino[3,2,4-hi]purine and 6-(3'-(thioethylamine) propylthio)purine, inhibited the growth of promastigote forms of *L. amazonensis* (IC₅₀ values of 50, 39, 28 and 50 μM, respectively). Only the salt of fluor of the 8,9-dihydro-7H-[1,4]thiazepino[3,2,4-hi]purine, inhibited the growth of promastigotes of *L. chagasi* (IC₅₀ value of 28μM). The 2-(9H-purin-6-ylthio)acetic acid presented the best anti-amastigotes activity and this substance reduced approximately 50% of the number of intracellular amastigotes after 48h of treatment. In general the derivatives of purine reduced the production of NO in promastigotes of *Leishmania* and macrophages but in the process of interaction parasite/host cell there were no significant changes in the production of NO. We also had tested cytotoxicity against mammalian cells for all the compounds that present leishmanicidal effect but none of the substances were found to have significant toxicity effect. The results contributed for advance in the research for new anti-leishmania drugs and suggest that 2-(9H-purin-6-ylthio)acetic acid has promising antileishmanial potencial.

Keywords: *Leishmania*, purine derivatives, NO, antiparasitic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ilustração do ciclo de vida da leishmania no inseto vetor.....	11
Figura 2	Ciclo biológico da <i>Leishmania sp</i>	13
Figura 3	Estrutura química dos fármacos.....	32
Figura 4	Estrutura química dos derivados purínicos analisados	38
Figura 5	Número de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> /100 células da linhagem J774A.1 infectadas após 24 e 48 de incubação com BROMECA (A), BROMER (B), ART F (C), ART S (D).....	48
Figura 6	Interação de 24 horas de <i>L. amazonensis</i> /J774A.1: A-controle; B- BROMER 39 μ M ; C- BROMER 78 μ M. As setas mostram o parasito.....	50
Figura 7	Produção de NO pelas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> Após 24, 48 e 72 horas de incubação com BROMECA (A) e BROMER (B).....	55
Figura 8	Produção de NO pelas formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> após 24, 48 e 72 horas de incubação com ART F (A) e ART S (B)...	56
Figura 9	Produção de NO pelas formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> após 24, 48 e 72 horas de incubação com BROMECA (A) e BROMER (B).....	58
Figura 10	Produção de NO pelas formas promastigotas de <i>L. chagasi</i> após 24, 48 e 72 horas de incubação com ART F (A) e ART S (B).	59
Figura 11	Produção de NO pelas células da linhagem J774A.1 e macrófagos parasitados por <i>L. amazonensis</i> após 24 e 48 horas de incubação com os seguintes derivados purínicos (DP) BROMECA (A), BROMER (B) e ART S (C).	62
Figura 12	Produção de NO pelos macrófagos inflamatórios de camundongos balb/c e macrófagos parasitados por <i>L. amazonensis</i> após 24 e 48 horas de incubação com os seguintes derivados purínicos (DP) BROMECA (A), BROMER (B) e ART S (C).	63

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> e suas manifestações clínicas.	23
Tabela 1	Avaliação do efeito antiparasitário de derivados de purina em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	46
Tabela 2	Porcentagem de inibição de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> por célula J774A.1 infectada.	49
Tabela 3	Porcentagem de citotoxicidade dos derivados purínicos em macrófagos inflamatórios de camundongos e células J774A.1.....	52

ABREVIATURAS, SIGLAS E CÓDIGOS

LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
LDPC	Leishmaniose dérmica pós-calazar
AIDS/SIDA	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
SFB	Soro fetal bovino
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimethyl-tiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólico
PBS	Salina tamponada com Fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração molar que inibe 50% do crescimento celular
NO	Óxido nítrico
RIN	Reativos intermediários de nitrogênio
RIO	Reativos intermediários de oxigênio
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
IFN- γ	Interferon gama
BROMECC	6-(3-cloropropiltio)-9H-purina
BROMER	Ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético
ART F	Sal de flúor de 7,8-diidro-(1,4)tiazepino(3,2,4-hi)purina
ART S	6-(3'-(tioetilamina)propiltio)purina
DP	Derivado purínico
DO	Densidade ótica
NC	Substância não citotóxica na determinada concentração
mRNA	RNA mensageiro
IL-12	Interleucina 12
NOS	Óxido nítrico sintase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutiva

Sumário

1.INTRODUÇÃO	1
1.2. O GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> E O PARASITO	6
1.2. CICLO BIOLÓGICO.....	12
1.3. PATOGENIA.....	14
1.3.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	14
1.3.1.1 LEISHMANIOSE CUTÂNEA	16
1.3.1.2 LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA	18
1.3.1.3 LEISHMANIOSE CUTANEOMUCOSA.....	18
1.3.1.4 RECIDIVAS DAS LEISHMANIOSES	19
1.3.2. LEISHMANIOSE VISCERAL OU CALAZAR	19
1.3.3. LEISHMANIOSE DÉRMICA PÓS-CALAZAR.....	21
1.4. TRATAMENTO	24
1.4.1. ANTIMONIAIS PENTAVALENTES.....	24
1.4.2. PENTAMIDINA.....	25
1.4.3. ANFOTERICINA B.....	26
1.4.4. PAROMOMICINA	27
1.4.5. OUTROS MEDICAMENTOS.....	28
1.4.6. IMUNOTERAPIA.....	30
1.5. DERIVADOS PURÍNICOS	33
2.OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVO GERAL	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1. PARASITOS	37
3.2. MOLÉCULAS UTILIZADAS.....	37
3.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i>	39
3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	39
3.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO SOB MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1	40

3.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. CHAGASI</i>	41
3.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 PARASITADOS POR <i>L. AMAZONENSIS</i>	42
3.8. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1.....	43
4.RESULTADOS.....	45
4.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS DE PURINA SOBRE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. CHAGASI</i>.....	45
4.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS DE PURINA EM AMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> OBTIDAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1.....	47
4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C	51
4.4. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> TRATADAS COM OS DERIVADOS PURÍNICOS	53
4.5. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. CHAGASI</i> TRATADAS COM OS DERIVADOS PURÍNICOS	57
4.6. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C PARASITADOS OU NÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i>.....	60
5.DISSCUSSÃO	65
5.1. CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS DE PURINA EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i> SP	64
5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. CHAGASI</i> E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C PARASITADOS OU NÃO POR <i>L. AMAZONENSIS</i>	68
6.CONCLUSÕES	72
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8.ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico que acometem o homem e diversas espécies de animais domésticos e silvestres, sendo causadas por protozoários flagelados do gênero *Leishmania*.

A patogênese das leishmanioses, suas manifestações clínicas e o curso da infecção são dependentes de complexas interações entre a virulência característica das diferentes espécies de gênero e a resposta imunológica mediada por células do hospedeiro (GRIMALDI e TESH, 1993; ASHFORD e BATES, 1998; MURRAY *et al.*, 2005). No hospedeiro vertebrado, uma das características marcantes do gênero *Leishmania* é a variedade de manifestações clínicas que podem ser agrupadas em dois grupos: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. Esta primeira inclui um espectro da doença geralmente referida pelas suas características clínicas e patológicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose cutaneomucosa e leishmaniose cutâneo-difusa (LAINSON e SHAW, 1992; ASHFORD e BATES, 1998). A leishmaniose dérmica pós-calazar é, normalmente, uma seqüela da leishmaniose visceral e esta última pode levar à morte, principalmente quando não tratada (ASHFORD, 2000; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a prevalência das leishmanioses ultrapassa 12 milhões de casos em 88 países tropicais e subtropicais, sendo 72 países desenvolvidos e 13 países em desenvolvimento, além disso, 350 milhões de pessoas encontram-se em áreas de risco (WHO, 2000). Dos dois milhões de novos casos de leishmanioses que são estimados anualmente, apenas 600 mil são declarados. A notificação dos casos é obrigatória em apenas 32 dos 88 países onde as leishmanioses são prevalentes. Esses índices e as patologias causadas pela doença levaram a OMS a incluir esta doença entre as seis mais importantes do mundo (NEVES *et al.*, 2005; WHO, 2000).

As leishmanioses possuem ampla distribuição geográfica incluindo regiões tropicais, subtropicais e certas zonas temperadas, sendo considerada endêmica em parte da Ásia, Índia, América Central e do Sul, Baixo Mediterrâneo e alguns países da Europa (LAINSON e SHAW, 1992).

No Brasil, as doenças estão distribuídas por todas as regiões geográficas e encontra-se em fase de expansão. Ao analisar-se a evolução da leishmaniose tegumentar americana (LTA), observa-se uma expansão geográfica no início da década de 80, quando foram registrados casos em 19 unidades federadas e, em 2003, todos os estados registraram autoctonia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). O aumento da incidência da doença associada a altas taxas de mortalidade e a expansão de formas de leishmanioses para novas áreas geográficas, constitui um sério problema de saúde pública (BRANDÃO-FILHO e SHAW, 1994).

Nos últimos anos, muitos estados brasileiros têm sido alvos de crescentes movimentos migratórios, ligados ao assentamento de famílias para projetos agropecuários ou adeptos ao ecoturismo. Tais atividades expõem esses grupos a ambientes pouco conhecidos e susceptíveis à zoonoses mantidas em ambientes silvestres (ARRUDA, 2004). Além disto, de acordo com Brandão-filho e Shaw (1994), um outro fator que está influenciando na expansão das leishmanioses é a urbanização dessas doenças, o que já foi observado para a leishmaniose cutânea, em Manaus (AM) e Belo Horizonte (MG) e para a leishmaniose visceral em São Luís (MA), Terezina (PI) e Natal (RN).

A primeira referência de LTA no Brasil encontra-se no documento da Pastoral Religiosa Político-Geográfica de 1827, citado no livro de Tello intitulado “Antiguidad de la Syphilis en el Peru”, onde é relatada a viagem de Frei Dom Hipólito Sanches de Fayas y Quiros de Tabatinga (AM) até o Peru, percorrendo as regiões do vale amazônico (BASANO e CAMARGO, 2004).

No Brasil, em 1855, Cerqueira observou a existência da moléstia da pele, identificando-a clinicamente como botão de Biskra. Em 1895, na Itália, Breda descreveu a moléstia em italianos provenientes de São Paulo (BASANO & CAMARGO, 2004). Em fins do século XVIII e início do século XIX, Borovsky (1898) e Leishman (1903) detectaram amastigotas de *Leishmania* em pacientes com lesão cutânea e calazar no Turcomenistão e Índia, respectivamente (LAINSON e SHAW, 1992). As observações anteriores relatadas consistiam apenas em descrições sobre o espectro clínico da doença no homem, entretanto, verificou-se que os hospedeiros vertebrados incluem uma variedade de espécies de mamíferos que epidemiologicamente comportam-se como reservatórios, sendo os humanos geralmente considerados como hospedeiros acidentais (HANDMAN, 2001a).

A natureza leishmaniótica das lesões cutâneas e nasofaríngeas só foi confirmada, pela primeira vez no Brasil, em 1909, por Lindenberg, que encontrou formas de *Leishmania*, idênticas à *L. tropica* da leishmaniose do Velho Mundo, em lesões cutâneas de indivíduos que trabalhavam nas matas do interior do Estado de São Paulo. Gaspar Vianna, por considerar o parasito diferente da *L. tropica*, o batizou de *L. braziliensis*, ficando assim denominado o agente etiológico da “úlcera de Bauru”, “ferida brava” ou “nariz de tapir” (LAINSON e SHAW, 1992; BASANO e CAMARGO, 2004). Já a suspeita de leishmaniose visceral nas Américas ocorreu em 1913 quando Migone examinou um paciente febril que retornou para o Paraguai depois de trabalhar na construção da ferrovia São Paulo-Corumbá (LAINSON e SHAW, 1992).

Em 1920, no Brasil, Cerqueira e Beaurepaire-Aragão relataram evidência da transmissão envolvendo os flebotomíneos. Estes hospedeiros invertebrados da leishmaniose são pequenos insetos hematófagos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* para leishmanioses do Novo Mundo e o gênero *Phlebotomus* para leishmanioses do Velho Mundo (ASHFORD e BATES, 1998).

Até a década de setenta, todos os casos de LTA ocorridos no país eram atribuídos a *L. braziliensis*. Com o aprimoramento de técnicas moleculares e a intensificação dos estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas e a LTA está associada, atualmente, a 14 espécies de *Leishmania* consideradas infectantes para o hospedeiro humano (BASANO e CAMARGO, 2004; SILVEIRA, LAINSON e CORBETT, 2004; BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

As leishmanioses se caracterizam pelo parasitismo intracelular do sistema fagocitário mononuclear, a partir da picada do vetor flebotomíneo infectado com as formas promastigotas de *Leishmania*. Estas são fagocitadas por macrófagos ou células dendríticas e transformam em amastigotas, dividem no vacúolo parasitóforo, sendo encontradas em outros macrófagos ou em tecidos distantes após disseminação (LAINSON e SHAW, 1992; DESJEUX, 2001; BATES, 2007).

Uma preocupação é a sobreposição da distribuição geográfica das leishmanioses e pacientes infectados com o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), tornando a *Leishmania* um organismo oportunista (WOLDAY *et al.*, 1999; RABELO *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2006). A maioria dos casos de co-infecção registrados na América do Sul acontece no Brasil e essa dupla infecção produz

efeito somatório na deficiência da resposta imune uma vez que *Leishmania* e HIV destroem células do sistema imune, aumentando exponencialmente a intensidade e conseqüências das doenças (WOLDAY *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 2006). Por isso, na Europa usuários de drogas intravenosas têm sido identificados como uma população em risco (TDR STRATEGICS, 2002).

O diagnóstico laboratorial baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos em esfregaço das lesões após a coloração de Giemsa. Utiliza-se para a coleta do material a escarificação do bordo da lesão, biópsia do bordo com impressão por aposição em lâmina de vidro e/ou punção aspirativa da lesão (BASANO e CAMARGO, 2004; BRUSTOLONI *et al.*, 2007). Pode-se realizar o diagnóstico de forma indireta, através da mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito (intradermorreação de Montenegro), que deve ser medida em 48 a 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endurecimento maior que 5mm. Outros exames podem ser realizados, tais como: histopatológico (coloração pela hematoxilina-eosina e uso de anticorpos marcados com imunoperoxidase para detecção do parasito), cultivo *in vitro*, *in vivo* (hamster dourado), sorologia (imunofluorescência, ELISA e aglutinação direta) e PCR (reação da polimerase em cadeia), com resultados em geral satisfatórios, porém de pouco valor na prática diagnóstica em áreas endêmicas. Na prática, a conduta mais utilizada é a pesquisa direta de parasitos e a intradermorreação, aliadas ao aspecto clínico da lesão e ao antecedente epidemiológico (BASANO e CAMARGO, 2004; BRUSTOLONI *et al.*, 2007).

A escolha do tratamento depende da espécie do parasito, da sensibilidade aos fármacos, do tipo e estágio da doença e do estado imunológico do paciente. Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos indicados para o tratamento de todas as leishmanioses, sendo que nos casos de falha aos tratamentos com os antimoniais pentavalentes, os fármacos utilizados como segunda escolha no tratamento das leishmanioses são a anfotericina B e a pentamidina. No entanto, o uso dessas drogas deve ser feito sob vigilância, em serviços especializados e com o paciente hospitalizado (MS/Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998). No Brasil, o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde (MS/Guia de Vigilância Epidemiológica, 1998; MS/FUNASA, 2002) baseia-se, principalmente, no antimonial pentavalente (Glucantime), entretanto, todos os medicamentos utilizados na terapia possuem muitos efeitos colaterais devido a sua toxicidade.

A eliminação de reservatórios e a campanha antivetorial são medidas de controle que poderiam proteger os indivíduos de áreas com risco de infecção. Entretanto o desenvolvimento econômico, as mudanças comportamentais dos indivíduos e do meio ambiente aumentam a exposição aos vetores. Alguns exemplos desses fatores são as novas colonizações, a invasão das florestas primárias, o desmatamento, a migração maciça da área rural para áreas urbanas, urbanização rápida e mal planejada, construção de represas e novas tramas de irrigação (TDR STRATEGICS, 2002).

As medidas profiláticas nas leishmanioses são de aplicação limitada por diversos motivos, entre os quais podemos destacar (a) a variedade de vetores e reservatórios que mantêm o ciclo de transmissão, mesmo na ausência de infecção humana, (b) dificuldade no controle vetorial, (c) falta de medicamentos eficazes e (d) dificuldade no diagnóstico das leishmanioses que podem ser confundidas com muitas doenças tropicais (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; TDR STRATEGICS, 2002). Em relação aos reservatórios, o cão é considerado como o principal reservatório doméstico (GRADONI, 2001; RAB, FRAME e EVANS, 1995; ROBERTSON *et al.*, 2000). Fatores individuais, tais como subnutrição e imunossupressão, possuem um papel muito importante nas leishmanioses (TDR STRATEGICS, 2002).

1.1. O GÊNERO *LEISHMANIA* E O PARASITO

O primeiro a observar o parasito do gênero *Leishmania* foi Cunningham (1885), na Índia, em casos de leishmaniose visceral (BASANO e CAMARGO, 2004). O gênero *Leishmania* é constituído por protozoários flagelados unicelulares, digenéticos (heteroxenos) transmitidos ao hospedeiro mamífero pela picada do inseto vetor flebotomíneo. Os protozoários do gênero *Leishmania*, assim como os outros tripanossomatídeos da ordem Kinetoplastida, apresentam um DNA extranuclear em uma organela mitocondrial, o cinetoplasto (ASHFORD e BATES, 1998; UBOLDI *et al.*, 2006).

Esses parasitos possuem a seguinte disposição taxonômica segundo Lainson e Shaw (1992):

REINO: Protista Haeckel, 1866

SUB-REINO: Protozoa Goldfuss, 1817

FILO: Sarcomastigophora Honigberg e Balamuth, 1963

SUB-FILO: Mastigophora Desing, 1866

CLASSE: Zoomastigophorea Calkins, 1909

ORDEM: Kinetoplastida Honigberg, 1963, *emend.* Vickerman, 1976

SUB-ORDEM: Tripanosomatina Kent, 1880

FAMÍLIA: Tripanosomatidae Doflein, 1901, *emend.* Grobben, 1905

GÊNERO: *Leishmania* Ross, 1903

Existem três grupos de *Leishmania* que são classificados em diferentes subgêneros, *Leishmania* (*Leishmania*), *Leishmania* (*Viannia*) e *Leishmania* (*Sauroleishmania*). Essa variação depende dos hospedeiros e de qual parte do intestino do flebotomíneo foi colonizada pelos parasitos, sendo suportada pelas análises filogenéticas de seqüências de DNA (SAF'JANOVA, 1982; LAINSON e SHAW, 1987; BATES, 2007).

- ***Leishmania* (*Leishmania*)** Saf'janova (1982)

As fêmeas dos flebotomíneos adquirem os parasitos quando se alimentam do sangue de hospedeiros infectados. Os flebotomíneos fazem feridas na pele com as suas partes bucais soltando os macrófagos e/ou as formas amastigotas que estão

presentes nos macrófagos da pele e subsequentemente esses parasitos vão para o intestino do vetor, onde se transformam em promastigotas. Estas colonizam o intestino médio dos flebotomíneos, posteriormente alcançam a válvula estomacal e durante uma segunda alimentação sangüínea realizada pelo vetor os parasitos são depositados na pele de novos hospedeiros (BATES, 2007). Nesse subgênero estão englobados todas as espécies do velho mundo e alguns membros do complexo mexicana (LAINSON e SHAW, 1992; COX, 1998).

- ***Leishmania (Viannia)*** Lainson e Shaw (1987)

Estes parasitos são encontrados somente no Novo Mundo e os seus vetores pertencem a todas as espécies de *Lutzomyia*. Os eventos iniciais desses parasitos nos seus vetores são semelhantes àqueles descritos para o subgênero *Leishmania*. A diferença encontra-se na localização dos parasitos no vetor, onde a maioria dos parasitos pode ser encontrada na região pilórica do intestino posterior, mas, provavelmente, uma população menor está presente na parte anterior do intestino médio. O final do desenvolvimento do subgênero *Viannia*, onde estão inclusos membros do complexo *braziliensis* (COX, 1998) é similar ao subgênero *Leishmania* (BATES, 2007).

- ***Leishmania (Sauroleishmania)***

É um grupo de espécies cujo nome sugere "*Leishmania* lagarto". Esses parasitos não são patogênicos para o homem, pois os seus hospedeiros vertebrados são os répteis e por essa razão a *L. tarentolae* tornou-se um modelo popular. Eles têm sido excluídos ou incluídos do gênero inúmeras vezes na história, algumas vezes sendo notificados como ancestrais da espécie *Leishmania*, um grupo primitivo. Porém estudos filogenéticos recentes baseados em seqüências de DNA os incluem dentro do gênero *Leishmania* indicando que eles são um desenvolvimento secundário derivado das espécies dos mamíferos. Os vetores desses parasitos pertencem ao gênero *Sergentomyia*, alimentam-se do sangue de répteis bem como de outros vertebrados e os parasitos ficam confinados ao intestino posterior, embora algumas literaturas antigas alegam que eles desenvolvam-se na parte anterior do intestino médio. Há poucas descrições sobre esse subgênero, mas sabe-se que a forma promastigota metacíclica, estágio final do parasito no hospedeiro invertebrado, é produzida no intestino desses vetores (BATES, 2007).

Dentro das 30 espécies de *Leishmania* que já foram nomeadas, somente pouco mais de 10 espécies possuem importância médica e veterinária (BATES, 2007) e cerca de 20 espécies e subespécies infectam os humanos, causando diferentes espectros de sintomas (CUPOLILLO *et al.*, 2000; TDR STRATEGICS, 2002).

As leishmanias se caracterizam por apresentar duas formas evolutivas durante seu ciclo biológico nos organismos hospedeiros, as formas amastigota e promastigota. A morfologia dos parasitos possui semelhanças entre as diferentes espécies.

- A forma amastigota encontra-se entre os protozoários de menor tamanho que parasitam o homem. Seu hábitat é constituído pelo vacúolo parasitóforo (fagolisossomo) no interior de macrófagos que fagocitam os parasitos (ASHFORD E BATES, 1998). Essas formas geralmente são encontradas nos hospedeiros vertebrados, parasitando principalmente macrófagos em diferentes tecidos e ocasionalmente, podem parasitar polimorfonucleares e células imaturas da medula óssea (ASHFORD e BATES, 1998; GOSSAGE, ROGERS e BATES, 2003).

As amastigotas de *Leishmania* são morfologicamente similares, mas com algumas variações quanto ao tamanho de acordo com a espécie. Elas possuem de 3 a 6 μm de comprimento por 2 a 4 μm de largura. As amastigotas, no interior de células fagocitárias ou livres, dependendo da preparação pelos métodos derivados do Romanovsky (como Giemsa, Leishman ou PANOTICO[®]) aparecem na microscopia óptica como organismos ovais ou esféricos. No citoplasma corado em azul-claro observa-se: núcleo grande, arredondado ou ovóide e excêntrico que se cora de vermelho e, às vezes, ocupando metade ou dois terços do corpo do parasito. Situado diante do núcleo, quase sempre tangente a ele, encontra-se o cinetoplasto, de aspecto baciliforme, reto ou curvo, corando em violeta pela técnica de Giemsa. Não há flagelo livre e o curto flagelo se aloja no bolso flagelar, uma invaginação da membrana na região anterior do corpo celular, e sua porção intracitoplasmática raramente é visível (ASHFORD e BATES, 1998). Em níveis ultraestruturais maiores detalhes são revelados quando os parasitos são examinados em microscópios eletrônicos. O limite externo do parasito é formado pela membrana celular unitária, sob a qual estão dispostos em conformação regular e equidistante, microtúbulos em número variável. Estes microtúbulos subpeliculares provavelmente servem de citoesqueleto (ASHFORD e BATES, 1998). Na bolsa

flagelar não se encontra microtúbulos subpeliculares, sendo essa região relacionada às atividades de endocitose e exocitose (WEBSTER e RUSSEL, 1993). O cinetoplasto que se mostra como uma estrutura mitocondrial, ligado a única mitocôndria da célula, é constituído por estruturas filamentosas, circulares, formadas por DNA, denominadas k-DNA (ASHFORD e BATES, 1998; UBOLDI *et al.*, 2006). Entre o flagelo e o cinetoplasto situa-se o corpo basal que aparece como continuação do flagelo. O citoplasma contém outras organelas como o retículo endoplasmático, o aparelho de Golgi e outras formações citoplasmáticas pouco diferenciadas (ASHFORD e BATES, 1998). Os lisossomos também são encontrados junto ao glicosomo, uma organela única para os cinetoplastídeos (OPPERDOES, 1991). Os amastigotas são encontrados nos fagolisossomos das células hospedeiras e o pH destes compartimentos não constitui um problema visto que os parasitos são acidófilos e a presença de enzimas e lipofosfoglicanas na sua superfície celular os protegem das enzimas lisossomais. A reprodução dos parasitos ocorre por divisão binária simples, longitudinal, notando-se primeiro a divisão do cinetoplasto em dois, posteriormente a divisão do núcleo e por fim a do citossomo. O parasito permanece dentro de vacúolos durante toda a fase intracelular e a divisão dos vacúolos pode acompanhar ou não a divisão das amastigotas. O isolamento das formas amastigotas pode ser através do rompimento de macrófagos infectados com essa forma a partir de animais infectados com as formas promastigotas na fase estacionária ou de culturas de macrófagos infectados, *in vitro* (ASHFORD e BATES, 1998; HOLZER, MCMASTER e FORNEY, 2006). Apesar de apresentarem dificuldades, algumas espécies já possuem seu cultivo axênico descrito, sendo denominadas “amastigotas-like” e necessitam de meio de cultura com pH em torno de 5.5 e temperatura de cultivo à 33°C (BATES, 1992; HOLZER, MCMASTER e FORNEY, 2006).

- As formas promastigotas são formas flageladas encontradas no trato digestório do hospedeiro invertebrado. Elas são alongadas, com um flagelo livre e longo, emergindo na porção anterior do corpo do parasito. O flagelo apresenta sempre medidas iguais ou superiores ao maior diâmetro do corpo e está envolvido na motilidade das promastigotas. Os elementos estruturais das promastigotas são os mesmos descritos para as amastigotas, mas com algumas variações quanto ao número de certas organelas. As modificações observadas na ultraestrutura das promastigotas são: o corpo celular alongado, com medidas que variam entre 10 a 15

µm de comprimento por 2 a 3,5 µm de largura; o alongamento do flagelo; cinetoplasto anterior ao núcleo e estruturas mais frouxas de filamentos de k-DNA dentro do cinetoplasto; desenvolvimento da mitocôndria; núcleo maior; aparelho de Golgi mais evidente e retículo endoplasmático mais abundante (ASHFORD e BATES, 1998). Durante o desenvolvimento no intestino do inseto vetor, as diferentes espécies de *Leishmania* sofrem transformações morfológicas e alguns autores referem-se a estas formas por diferentes nomes. Gossage, Rogers e Bates (2003) e Bates (2007) seqüenciaram o desenvolvimento das promastigotas classificando-as em cinco formas de promastigotas: promastigotas procíclicas, é o primeiro estágio no vetor, sendo uma forma com pouco movimento e que se multiplica no sangue ingerido; promastigotas nectomonades, nesse estágio a replicação do parasito torna-se mais lenta e diferencia-se em uma forma alongada e com uma forte mobilidade, pois esse estágio possui um caráter migratório; promastigotas leptomonades, são formas curtas resultantes da diferenciação das promastigotas nectomonades que se destinam a replicação na fase da alimentação com açúcares do inseto vetor; promastigotas haptomonades, são formas que possuem expansão da extremidade flagelar e ficam aderidas na superfície cuticular da válvula estomacal e promastigotas metacíclicas, forma resultante da diferenciação de algumas promastigotas leptomonades, sendo o estágio infectivo para os mamíferos (Figura 1). O cultivo *in vitro* das formas promastigotas está bem estabelecido, com vários meios de cultura adequados a diferentes espécies, dos quais o mais antigo é o de Novy-Macneal-Nicolle, conhecido como NMN (NOVY e MACNEAL, 1904; NICOLLE, 1908). O parasito cresce em temperaturas compreendidas entre 22 °C e 28 °C, sendo a rapidez de crescimento e a densidade parasitária final dependentes da espécie, subespécie ou linhagem do parasito estudado, além da composição do meio utilizado. Promastigotas de cultura na fase estacionária são mais infectivos do que os da fase logarítmica de crescimento, provavelmente pela mudança de antígenos na superfície (SACKS *et al.*, 1985).

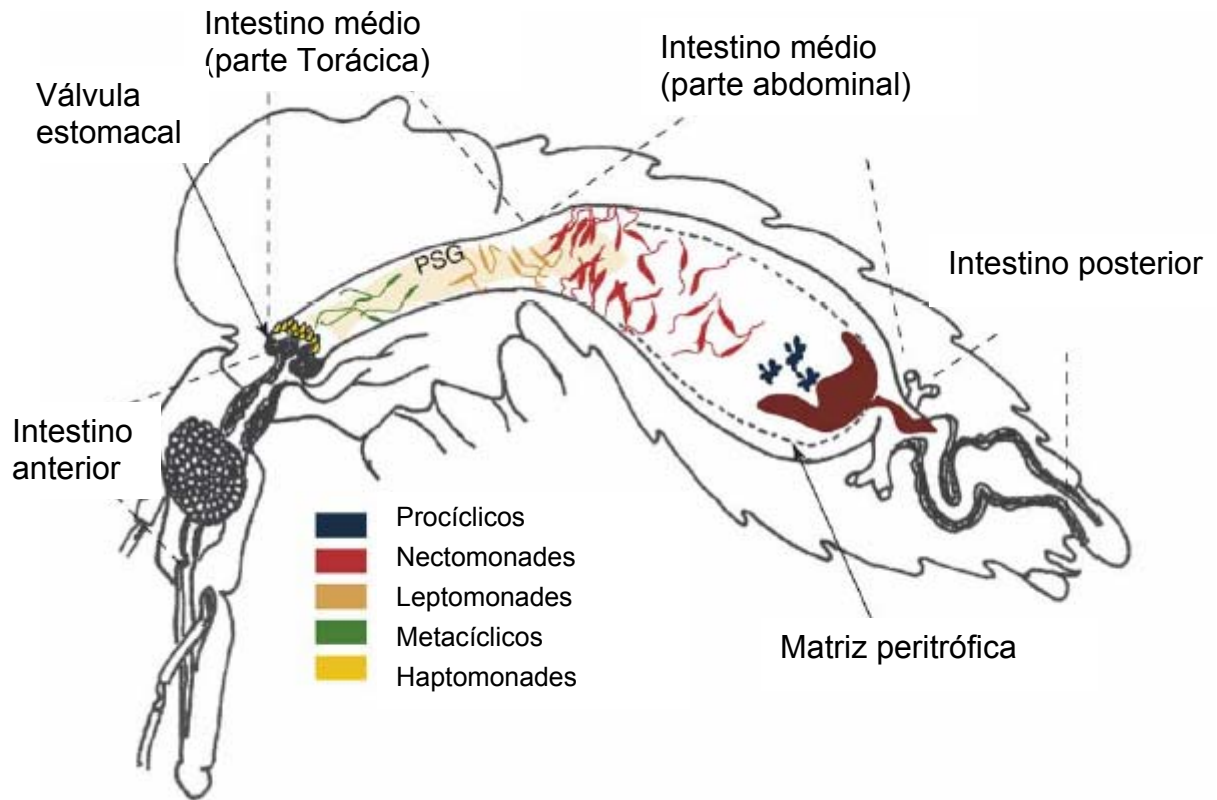


Figura 1: Ilustração do ciclo de vida da *Leishmania* no inseto vetor (adaptado de KAMHAWI, 2006).

1.2. CICLO BIOLÓGICO

Os protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo biológico do tipo digenético, alternando entre hospedeiros vertebrados e insetos vetores, os quais são os responsáveis pela transmissão do parasito durante o repasto sanguíneo da fêmea conforme está ilustrado na Figura 2. Quando o inseto vetor, hematófago da Família Phlebotominae (dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*) pica o indivíduo ou o animal parasitado, retira junto ao sangue ou a linfa intersticial os parasitos. O alimento juntamente com as formas amastigotas são envolvidos pela matriz peritrófica, uma membrana quitinosa secretada pelas células epiteliais do intestino do inseto. Após 4-5 dias depois do repasto infectante, as formas amastigotas se transformam em promastigotas (CHANG, 1990; ASHFORD e BATES, 1998; SACKS e KAMHAWI, 2001). Essas formas promastigotas multiplicam por divisão binária, sendo diferenciadas dependendo do tempo de infecção e do lugar onde se encontram. O último estágio de desenvolvimento das promastigotas é a forma promastigota metacíclica, forma infectante para os mamíferos. Independentemente de algumas espécies de *Leishmania* colonizarem a porção média e/ou posterior do intestino do inseto vetor, todas as espécies migram para as porções anteriores do aparelho digestório do inseto seguindo até à probóscide (BATES, 2007).

Durante um novo repasto sanguíneo, as fêmeas dos insetos vetores inoculam as formas promastigotas metacíclicas nos hospedeiros vertebrados. Após esforços para ingerir sangue, os músculos encarregados da sucção relaxam e causam a regurgitação do material aspirado juntamente com as formas promastigotas infectantes que estavam presentes na probóscide. Estes insetos apresentam aparelho bucal curto e adaptado para dilacerar o tecido do hospedeiro, promovendo condições para obter o sangue durante a alimentação (BATES, 2007). Posteriormente a interiorização do parasito, o macrófago promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo, formando o fagolisossomo, e a forma promastigota se diferencia em amastigota, capaz de desenvolver-se e multiplicar-se no meio ácido encontrado no compartimento vacuolar. A cinética precisa dessa transformação é incerta e assume-se que a forma promastigota é interiorizada, principalmente, por células fagocíticas mononucleares logo após sua inoculação pelo inseto vetor. A

transformação de promastigota em amastigota deve ocorrer, provavelmente, somente dentro da célula hospedeira e dados de estudos realizados *in vitro* indicam que este processo pode estar completo entre 12 a 24 horas (ASHFORD e BATES, 1998). Após sucessivas multiplicações das amastigotas, a célula hospedeira se rompe liberando estas formas que irão infectar novos macrófagos. Algumas proteínas formadoras de poro têm sido descritas, sugerindo o modo pelo qual as formas amastigotas são liberadas para o meio extracelular (HORTA, 1997).

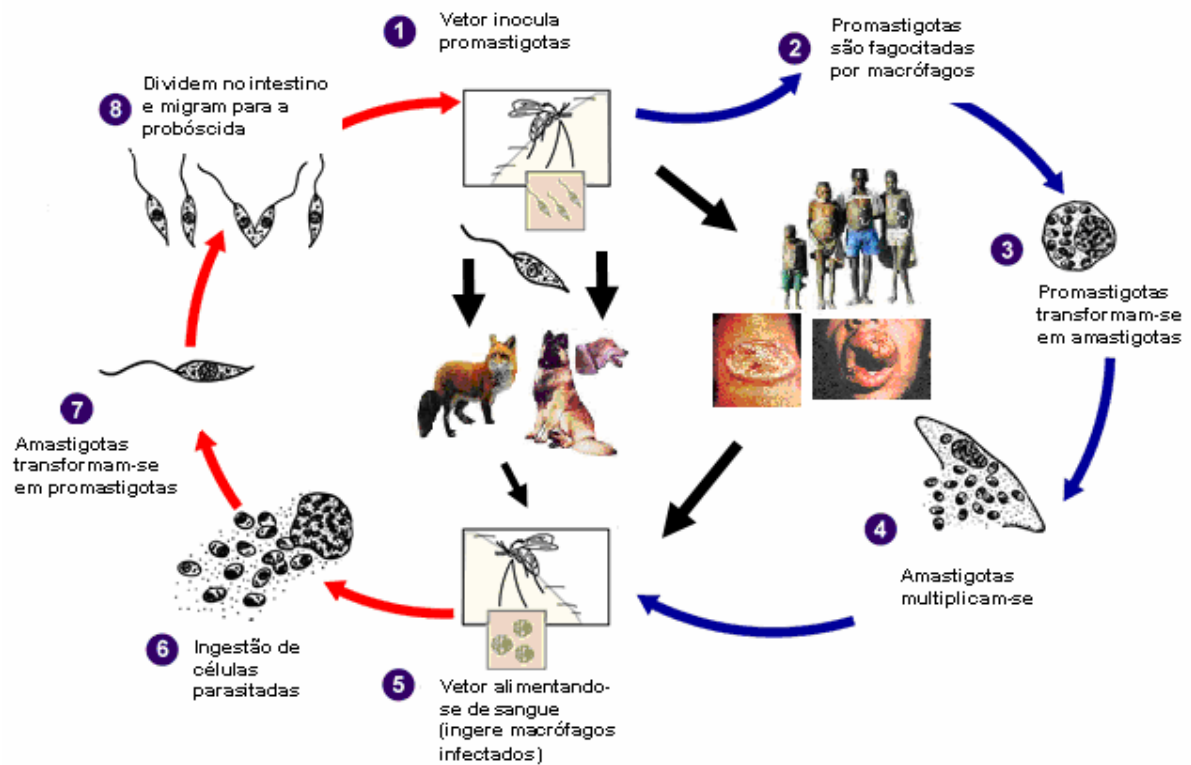


Figura 2- Ciclo biológico da *Leishmania* sp.(adaptado CDC, 2003)

1.3. PATOGENIA

Apesar de apenas algumas espécies de *Leishmania* serem responsáveis pela maioria dos casos humanos, uma das características marcantes deste gênero é a diversidade das manifestações clínicas. A patogênese da leishmaniose, suas manifestações clínicas e o curso da infecção são dependentes de complexas interações entre a virulência característica das diferentes espécies de gênero e a resposta imunológica mediada por células do hospedeiro (DEANE e GRIMALDI, 1985; GRIMALDI e TESH, 1993; ASHFORD e BATES, 1998).

Segundo Ashford e Bates (1998), Laison e Shaw (1998) e Bailey e Lockwood (2007) as leishmanioses podem ser classificadas como: Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), Leishmaniose Visceral ou Calazar e Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC). Dentro da classe de LTA encontram-se as formas de leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose cutaneomucosa e recidivas das leishmanioses (Quadro 1).

1.3.1. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é um conjunto de enfermidades causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, que acometem a pele e/ou mucosas do homem, e de diferentes espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo. Nas Américas, são transmitidas entre os animais e o homem pela picada das fêmeas de diversas espécies de flebótomos (Díptera), sendo a infecção caracterizada pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme e das mucosas do hospedeiro vertebrado (monócitos, histiócitos e macrófagos) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A LTA é uma doença que acompanha o homem desde a antigüidade, existindo relatos e descrições na literatura desde o séc. I d.C. No Continente americano foram encontradas cerâmicas pré-colombianas, datadas de 400 a 900 anos d.C., feitas pelos índios do Peru, que apresentam mutilações de lábios e narizes, características da espúndia, hoje conhecida como leishmaniose cutaneomucosa. Posteriormente, através de estudos de paleomedicina, foram

descobertas múmias com lesões de pele e mucosas características da leishmaniose (BASANO e CAMARGO, 2004). Contudo a real prevalência das leishmanioses no continente americano é difícil de ser estabelecida, em vista das subnotificações, diagnósticos incorretos, infecções inaparentes, variações de resposta do hospedeiro e multiplicidade de agentes etiológicos envolvidos (MARZOCHI, 1992).

A LTA tem sido descrita em quase todos os países americanos e no Brasil, essa doença possui ampla distribuição, sendo que a partir da década de 90, o Ministério da Saúde notificou uma média anual de 32 mil novos casos de LTA (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Nos últimos 20 anos ocorreu um aumento do número de casos e ampliação de sua ocorrência geográfica, sendo encontrada atualmente em todos os estados brasileiros, sob diferentes perfis epidemiológicos (BASANO e CAMARGO, 2004). Analisando-se os dados pertinentes em 2003, verificou-se a seguinte situação: a Região Norte notificou aproximadamente 45% dos casos, predominando os estados do Pará, Amazonas e Rondônia; a Região Nordeste, 26% dos casos, principalmente no Maranhão, Bahia e Ceará; a Região Centro-Oeste, 15% dos casos, com maior frequência em Mato Grosso; a Região Sudeste, 11% dos casos, predominantemente em Minas Gerais; e a Região Sul, 3,0%, destacando-se o Paraná (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

As três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA no país são: *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonensis*, mas recentemente, *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi* e *L.(V.) shawi* foram identificadas como novos agentes da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A LTA pode se apresentar, basicamente, com três perfis (BASANO & CAMARGO, 2004): Leishmaniose tegumentar puramente silvestre, Leishmaniose tegumentar silvestre modificada e Leishmaniose tegumentar periurbana.

- Leishmaniose tegumentar puramente silvestre: ocorre através de surtos epidêmicos associados à derrubada das matas (construção de estradas, instalação de povoados em regiões pioneiras) e à exploração desordenada das florestas (extração de madeira, agricultura, mineração), ocorrendo na Amazônia de um modo geral.
- Leishmaniose tegumentar silvestre modificada: ocorre através de surtos epidêmicos sazonais, em áreas com pequenos focos residuais de mata primária. A infecção tem lugar na interface da área peridomiciliar e nas áreas de mata, onde o homem costuma desenvolver atividades ligadas à agricultura, estando ligada às

flutuações da densidade populacional dos flebotomíneos e ocorrendo, por exemplo, no vale do rio São Francisco, Caratinga-MG e Viana-ES.

- Leishmaniose tegumentar periurbana: ocorre de forma endemo-epidêmica, endo ou peridomiciliar, em áreas de colonização antiga onde há suspeita da participação de animais domesticados como reservatórios (cães e eqüinos), ocorrendo em áreas da cidade do Rio de Janeiro, por exemplo.

1.3.1.1. Leishmaniose cutânea (LC)

A Leishmaniose cutânea é a forma mais comum da doença e produz exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém limitadas e indolores. Apresenta-se como uma pequena pápula que posteriormente, pode ampliar-se, ulcerar e obter a forma de um vulcão, com o centro úmido; permanecer como um nódulo liso ou a superfície da pele pode tornar-se hiperqueratinosa, estas duas últimas são lesões secas (ASHFORD e BATES, 1998; BAILEY e LOCKWOOD, 2007). No Brasil, as formas ulceradas são as mais comuns (DEANE e GRIMALDI, 1985). As lesões da leishmaniose cutânea podem obter um tamanho superior a 5 cm de diâmetro, mas raramente essa dimensão é superior a 10 cm de diâmetro. Geralmente a ulceração não penetra no tecido subcutâneo, exceto na cartilagem da orelha (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

A LC é geralmente causada pela *Leishmania tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* ou *L. braziliensis*, mas pode também ser causada por outras espécies de *Leishmania* que infectam o homem (ASHFORD, 2000) (Quadro 1). 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* (DEANE e GRIMALDI, 1985; LAISON e SHAW, 1998, ASHFORD e BATES, 1998). Noventa por cento dos casos da LC mundial ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (WHO, 2000)

As complicações da LC incluem infecção secundária e cicatrizes desfigurantes. As infecções secundárias podem ser devido aos coliformes comensais da pele ou aos fungos invasivos e devem ser tratadas para evitar o aumento do tempo de cicatrização. As cicatrizes desfigurantes podem melhorar na aparência em 6 a 12 meses e não deve ser considerado para a intervenção cirúrgica

antes deste prazo por causa do risco de recorrências locais (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

O curso natural da LC é de que todas as formas resolverão espontaneamente se não estiverem relacionadas à determinadas manifestações crônicas tais como a Leishmaniose Cutânea Difusa, as recidivas das leishmanioses ou Leishmaniose Cutaneomucosa. O tempo para resolução espontânea, entretanto, pode variar consideravelmente e parece ser dependente da espécie de *Leishmania* envolvida, tamanho do inóculo, imunidade do hospedeiro, e outros fatores ainda não esclarecidos no parasito e no hospedeiro. A coinfeção do vírus da imunodeficiência humana com LC pode ser associada com as apresentações raramente severas, taxas mais elevadas de recorrências e de reinfecções, e baixas taxas de cura para tratamentos já estabelecidos. Casos severos de LC foram relatados também na associação com outras causas de imunossupressão, tais como tratamento com esteróides ou tratamento com imunossupressores após transplante de órgãos, mas estes são pouco freqüentes (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

Na LC aguda pode haver disseminação local devido à propagação de parasitos ou de seus antígenos longe do local de uma lesão preliminar, com grau de severidade variada. As lesões podem ter uma propagação extensiva ao tecido subcutâneo, e também pode ocorrer o desenvolvimento de lesões satélites. Com a participação linfática pode ocorrer a forma de nódulos ou uma linfadenopatia regional que não é explicado por infecções secundárias e podem também ser associadas com o início da cicatrização. Lesões secundárias devido à autoinoculação foram relatadas em decorrência de traumas, procedimentos cirúrgicos ou tatuagens. A maioria das formas de LC aguda com disseminação local é mais comum com infecções causadas por espécies do Novo Mundo, entretanto, todas as formas foram também relatadas com espécies do Velho Mundo, especialmente em povos não indígenas (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

A LC disseminada caracteriza-se por múltiplas lesões pleomórficas em duas ou mais áreas não contínuas do corpo. Apesar da disseminação ser rara, a freqüência está aumentando em infecções provenientes de espécies de *Leishmania* do Novo Mundo e do Velho Mundo, neste último caso, quando associadas a infecções com HIV (BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

1.3.1.2. Leishmaniose cutânea difusa

Apresenta-se com lesões disseminadas, não-ulcerativas e repletas de parasitos. É a mais rara e a mais severa manifestação da doença cutânea e pode persistir indefinidamente. No Novo Mundo a doença é causada por *L. amazonensis* e *L. mexicana* nas Américas do Sul e Central, enquanto que as infecções no Velho Mundo têm sido atribuídas à *L. aethiopica* (LAINSON e SHAW, 1998; ASHFORD, 2000; BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

A doença usualmente inicia-se com uma lesão primária e depois se dissemina localmente e hematogenicamente, envolvendo outras áreas da pele, mucosa e vários linfonodos tais como a face e as superfícies externas dos membros e podem também causar destruição de tecidos profundos, mas sem visceralização. Nessa doença há resposta anérgica e está associado com a resposta predominantemente marcada pela Th2, sendo difícil o seu tratamento (LAINSON e SHAW, 1998; BAILEY e LOCKWOOD, 2007).

1.3.1.3. Leishmaniose cutaneomucosa

A leishmaniose cutaneomucosa ocorre nas superfícies das mucosas da boca, do nariz, e da faringe como resultado de metástases de uma simples lesão na pele. Apresenta-se geralmente 1 a 5 anos após a LC devido a infecções causadas por espécies do complexo *braziliensis* e tem como principal agente etiológico a *L. braziliensis* (JERONIMO e PEARSON, 1992; LAINSON e SHAW, 1998; ASHFORD, 2000; BAILEY e LOCKWOOD, 2007). A leishmaniose cutaneomucosa afeta até 10% dos casos não tratados dependendo da espécie envolvida, da localização geográfica e de outros fatores de risco (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). Noventa por cento dos casos de leishmaniose cutaneomucosa mundiais ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru (WHO, 2000).

As 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, subseqüentemente este apresenta-se 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 a graves complicações respiratórias por infecções secundárias, podendo levar o paciente a óbito (LAINSON e SHAW, 1998).

Apesar de raramente associadas com mortalidade, as lesões são geralmente crônicas e quando desfigurantes podem aparecer complicações psicológicas, sendo uma das causas importantes de desfiguramentos e morbidades em áreas endêmicas da América Latina (JERONIMO e PEARSON, 1992).

1.3.1.4. Recidivas das leishmanioses

As recidivas das leishmanioses ocorrem em decorrências de infecções causadas pela *L. tropica* ou pela *L. braziliensis*. Aparece uma lesão pequena e não ulcerada em torno da borda de uma lesão previamente cicatrizada e causa um desfiguramento severo (ASHFORD e BATES, 1998; BAILEY e LOCKWOOD, 2007). Essas recidivas estão associadas com uma forte resposta imune mediada por células (ASHFORD e BATES, 1998).

1.3.2. Leishmaniose Visceral ou Calazar (LV)

A leishmaniose visceral, dada a sua incidência e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, é também considerada emergente em indivíduos portadores da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), tornando-se uma das doenças mais importantes da atualidade. Tem ampla distribuição ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas, onde também é denominada leishmaniose visceral americana (LVA) ou calazar neo-tropical (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A LV é uma doença causada pela *L. donovani* na Índia e por *L. infantum* nas regiões mediterrâneas e África (JERONIMO e PEARSON, 1992; PEARSON, 1993; ASHFORD, 2000) (Quadro 1). No Novo Mundo existe controvérsia sobre a espécie responsável pela leishmaniose visceral americana (LVA), sendo considerada a *Leishmania (Leishmania) chagasi* por alguns, e *L. infantum chagasi* por outros (LAINSON, ISHIKAWA e SILVEIRA, 2002).

Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países e no Brasil a LV está registrada em 19 das 27 Unidades da Federação, com aproximadamente 1.600 municípios apresentando transmissão autóctone, sendo a transmissão da doença descrita em vários municípios, de todas as regiões do Brasil, exceto na Região Sul (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

No Brasil, a LV inicialmente tinha um caráter eminentemente rural e, mais recentemente, vem se expandindo para as áreas urbanas de médio e grande porte, sendo também conhecida por calazar, barriga d'água, entre outras denominações menos conhecidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Segundo o Ministério da Saúde, em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de LVA somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 casos, e a incidência de dois casos/100.000 hab (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A doença é mais freqüente em crianças menores de 10 anos (54,4%), sendo 41% dos casos registrados em menores de 5 anos. O gênero masculino é proporcionalmente o mais afetado (60%). A razão da maior susceptibilidade das crianças é explicada pelo estado de relativa imaturidade imunológica celular agravado pela desnutrição, tão comum nas áreas endêmicas, além de uma maior exposição ao vetor no peridomicílio (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

No Brasil, a LV apresenta aspectos geográficos, climáticos e sociais diferenciados, em função da sua ampla distribuição geográfica, envolvendo as regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. Na década de 90, aproximadamente 90% dos casos notificados de LV ocorreram na Região Nordeste. À medida que a doença se expande para as outras regiões e atinge áreas urbanas e periurbanas, esta situação vem se modificando e, no período de 2000 a 2002, a Região Nordeste já representa uma redução para 77% dos casos do País (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

Os dados epidemiológicos dos últimos dez anos revelam a periurbanização e a urbanização da leishmaniose visceral, destacando-se os surtos ocorridos no Rio de Janeiro (RJ), Belo Horizonte (MG), Araçatuba (SP), Santarém (PA), Corumbá (MS), Teresina (PI), Natal (RN), São Luís (MA), Fortaleza (CE), Camaçari (BA) e mais recentemente as epidemias ocorridas nos municípios de Três Lagoas (MS), Campo Grande (MS) e Palmas (TO) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

A LV é uma forma geralmente grave, em que o parasito apresenta acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado, medula óssea e tecidos linfóides, muitas vezes com evolução fatal. (JERONIMO e PEARSON, 1992; PEARSON, 1993; BASANO e CAMARGO, 2004). O calazar é geralmente mortal quando não tratado e manifesta-se com febre, anorexia, perda de peso,

hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, diarreia, caquexia, broncopneumonia. Podem ocorrer também anemia e leucopenia (DEANE e GRIMALDI, 1985; JERONIMO e PEARSON, 1992; ASHFORD e BATES, 1998; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003; SILVA-JARDIM, HORTA e RAMALHO-PINTO, 2004).

A LV tem sido reconhecida como uma doença oportunista em pessoas com comprometimento da resposta imune, tais como pacientes com SIDA (Síndrome da Imuno-Deficiência Adquirida) ou sob tratamento com imunossupressores (BADARÓ *et al.*, 1986; MONTALBAN *et al.*, 1989; ASHFORD e BATES, 1998; WOLDAY *et al.*, 1999; ASHFORD, 2000, Cruz *et al.*, 2006), sendo a primeira infecção relatada em 13-47% dos pacientes com HIV (Cruz *et al.*, 2006). A coinfeção do HIV com LV produz efeitos similares aos apresentados na associação HIV-LC (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). Noventa por cento de todos os casos de leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão (WHO, 2000).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) é a principal fonte da infecção humana, com transmissão peridoméstica e doméstica efetuada principalmente pelo vetor *Lutzomyia longipalpis* (LAINSON, ISHIKAWA e SILVEIRA, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003). A infecção canina tem precedido a ocorrência de casos humanos e a infecção em cães tem sido mais prevalente do que no homem e no ambiente silvestre, os reservatórios são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*). No Brasil, as raposas foram encontradas infectadas nas regiões Nordeste, Sudeste e Amazônica. Os marsupiais didelfídeos foram encontrados infectados no Brasil e na Colômbia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2003).

As medidas de controle incluem a controversa exterminação de cães sorologicamente ou parasitologicamente positivos, mas a existência de hospedeiros selvagens agrava a situação e provavelmente torna a erradicação completa da doença impraticável (LAINSON, ISHIKAWA e SILVEIRA, 2002).

1.3.3. Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPC)

A LDPC é vista como uma conseqüência relativamente comum após o tratamento da leishmaniose visceral causada por *L. donovani* (JERONIMO e PEARSON, 1992; ASHFORD e BATES, 1998; ASHFORD, 2000). Não tem sido associada à infecção por *L. infantum*. A LDPC é ocasionalmente vista em pacientes sem história de leishmaniose visceral, mas somente em lugares onde a *L. donovani*

é transmitida, provavelmente como seqüela de infecção subclínica (ASHFORD e BATES 1998).

A leishmaniose dérmica pós-calazar é freqüente na Índia e no Sudão. Na Índia a LDPC ocorre em 6-20% dos casos de LV, seis meses a cinco anos após um aparente tratamento bem sucedido para LV. Na África LDPC é uma complicação comum da LV, ocorrendo em 57% dos casos, entretanto, um significativo aumento na taxa da LDPC (69%) foi observado em pacientes que receberam um tratamento inadequado ou irregular (BITTENCOURT, 2002).

LDPC manifesta-se como multiplas máculas hipocrômicas, pápulas eritrematosas e nódulos. Geralmente, uma erupção macular eritrematosa na face é a primeira manifestação da doença. A erupção cutânea papular ou nodular é o aspecto clínico mais freqüente observado em 51% dos casos. LDPC é muito incomum em pacientes com HIV positivo. Há somente quatro casos documentados da associação LDPC - HIV positivo. As lesões são localizadas e envolve somente algumas áreas do corpo. Na América do Sul a LDPC é raramente reportada. (BITTENCOURT, 2002).

Apesar do parasitismo cutâneo, a medula óssea e as vísceras são geralmente negativas e não há febre ou outro sintoma de envolvimento visceral. Casos de LDPC são mais resistentes ao tratamento, exigindo altas doses de medicação sistêmica (JERONIMO e PEARSON, 1992).

Quadro 1. Classificação das espécies de *Leishmania* e suas manifestações clínicas.

Espécie	Doença
Subgênero <i>Leishmania</i>	
Complexo <i>L. donovani</i>	
<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 <i>Viannia</i>	
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

Adaptado de LAINSON e SHAW, 1987; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; GONTIJO *et al.*, 2002.

1.4. TRATAMENTO

1.4.1. Antimoniais pentavalentes

Desde a introdução do tártaro emético (antimonial trivalente) na terapia da LTA, por Gaspar Vianna em 1912 (PASSOS, 1998), o tratamento desta doença pouco evoluiu, havendo apenas a substituição do antimonial trivalente pelo pentavalente, inicialmente utilizado por Brahmachari em 1920 (MARSDEN, 1985). O antimonial trivalente também foi o primeiro agente farmacológico utilizado no tratamento da LV, em 1915 na Itália e Índia (MURRAY, 2000; KOTHARI *et al.*, 2007). Entre 1920 e 1930 os antimoniais pentavalentes foram introduzidos na terapêutica da LV, o que fez decair o período de tratamento de 3-4 meses para algumas semanas (MURRAY, 2000). Posteriormente na década de 1940 surgiram novas formulações dos antimoniais pentavalentes, tais como estibogluconato de sódio e antimoniato de meglumina, os quais continuam em uso até os dias atuais (Figura 3) (MURRAY, 2000; SOTO *et al.*, 2005). Ainda hoje não existe terapia ideal para as leishmanioses, contudo esta classe de fármacos apresenta-se como a melhor opção terapêutica disponível (HERWALDT, 1999).

Os antimoniais pentavalentes são os medicamentos de primeira escolha, sendo padronizado pela Organização Mundial da Saúde na dose entre 10 a 20 mg/Sb⁺⁵/Kg/dia (Sb⁺⁵ significando antimônio pentavalente), por 20 a 30 dias (BASANO e CAMARGO, 2004; SOLOMON *et al.*, 2007). Entretanto a terapia é longa, possui um alto custo, a via de administração é intra-muscular e está relacionado a vários efeitos colaterais incluindo artralgia, mialgia, falta de apetite, náuseas, vômitos, desconforto abdominal, coceira, febre, fraqueza, dor de cabeça, tonturas, palpitações, insônia, nervosismo, edema de face e alterações eletrocardiográficas, sendo o seu uso contra-indicado em grávidas, nefropatas, cardiopatas, pacientes com Doença de Chagas e tuberculose (MARSDEN, 1985; DUBE *et al.*, 2005; IRAJI e SADEGHINIA, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Além disto, a resposta ao tratamento com os antimoniais varia consideravelmente dependendo da cepa do parasito envolvida, estado da resposta imune do paciente e da forma clínica ou do estágio da doença (GRIMALDI e TESH, 1993). Um dos grandes problemas encontrados na terapêutica com os antimoniais é a resistência quanto a

esse medicamento no tratamento da leishmaniose visceral e recidiva na leishmaniose tegumentar, na forma mucosa (MARSDEN, 1985). A ineficácia deste tratamento é observada particularmente na co-infecção HIV-*Leishmania*, onde a eficácia terapêutica diminui durante as recidivas da leishmaniose (FAURATY-GAMBARELLI *et al.*, 1997; SINHA, PANDEY e BHATTACHARYA, 2005). Apesar do valor clínico da terapia com os antimoniais estar ameaçado por causa da resistência de alguns parasitos quanto a esse medicamento, a eficácia dos antimoniais é cerca de 70% em todas as manifestações clínicas das leishmanioses (KOTHARI *et al.*, 2007; SOLOMON *et al.*, 2007). O uso clínico desse medicamento pode posteriormente ser trocado pela Anfotericina B ou a miltefosina (KOTHARI *et al.*, 2007).

Vale enfatizar ainda que mesmo com o tratamento adequado, é frequente a ocorrência de recidivas e/ou comprometimento mucoso, com 2% nos casos tratados e cerca de 10% nos casos não tratados (BASANO e CAMARGO, 2004).

1.4.2. Pentamidina

A pentamidina, uma diamidina aromática, foi inicialmente utilizada no tratamento de infecções por *Pneumocystis carinii* e, demonstrou ser efetiva na terapêutica da leishmaniose visceral sendo considerada juntamente com a anfotericina B, drogas de segunda escolha no tratamento das leishmanioses e indicada para os casos não responsivos aos antimoniais (Figura 3) (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2005). As diaminas têm sido usadas contra as infecções causadas por *Leishmania* desde 1939, sendo a pentamidina a molécula que apresentou estabilidade mais elevada, facilidade de administração e menor toxicidade em comparação com outras aminas (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; MURRAY, 2000). Acredita-se que a pentamidina atue no DNA do cinetoplasto inibindo suas funções (DONKOR *et al.*, 2001; SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Com sua utilização na terapêutica da leishmaniose visceral no final da década de 1970 e início da década de 1980, altas taxas de cura (acima de 98%) e nenhuma recaída no tratamento foram obtidas por Jha (1983). Com o desenvolvimento de resistência a este fármaco pelos parasitos, na própria década de 1980, os índices de cura declinaram (MURRAY, 2000; SUNDAR e RAI 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2005). Contudo, em alguns países a pentamidina continua sendo utilizada isoladamente ou associada a outras drogas, possuindo uma eficácia contra

as leishmanioses cutâneas e muco-cutâneas (SUNDAR e RAI 2002, SINGH e SIVAKUMAR, 2004; MINODIER e PAROLA, 2007). O uso da pentamidina freqüentemente resulta em efeitos indesejáveis, tais como: mialgias, desconforto no local da injeção, náuseas, dores de cabeça e hipotensão (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; ANDERSEN *et al.*, 2005). Pode causar também taquicardia, hipoglicemia e até diabetes mellitus dependente de insulina (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; SUNDAR e RAI 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Assim, devido ao seu custo, sua maior toxicidade quando comparada aos antimoniais e ao surgimento de resistência e necessidade de monitoramento por causa dos efeitos colaterais, esse fármaco tem sido pouco utilizado na leishmaniose visceral (MURRAY, 2000; SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

1.4.3. Anfotericina B

A anfotericina B, um antibiótico polieno antifúngico, foi descoberta em 1956 em bactérias do gênero *Streptomyces*, sendo freqüentemente utilizada em infecções fúngicas sistêmicas e apresenta atividade contra parasitos do gênero *Leishmania* (Figura 3) (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Esse fármaco tem apresentado altas taxas de cura em pacientes infectados por *L. donovani*, particularmente, quando administradas em crianças e gestantes e nos casos de resistência do parasito aos antimoniais (KAFETZIS *et al.*, 2005; SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Acredita-se que a anfotericina B atue ligando-se à esteróides, preferencialmente ao ergosterol da membrana celular de fungos e *Leishmania*, porém, não apresenta afinidade pelo colesterol existente na membrana plasmática de mamíferos (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; SUNDAR e RAI, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Entretanto, a terapia com anfotericina B é dispendiosa devido a necessidade de longos períodos de tratamento e monitoramento hospitalar, além de apresentar alta toxicidade (KAFETZIS *et al.*, 2005; SUNDAR *et al.*, 2006). Visto os efeitos colaterais, novas formulações de Anfotericina B foram realizadas, o que constitui um dos maiores avanços na quimioterapia anti-leishmania nas últimas duas décadas (SUNDAR e RAI, 2002, CROFT e COOMBS, 2003, SINGH e SIVAKUMAR, 2004). O uso de Anfotericina B associada a lipídios (AmBisome - L-AmB) traz vários benefícios para o paciente, tais como: aumento da tolerância à droga, minimização da nefrotoxicidade e possibilidade de liberação da droga em espaços mais curtos de tempo, porém

esse tratamento não é bem sucedido em pacientes com HIV (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; SUNDAR e RAI 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; MURRAY *et al.*, 2005). A dispersão coloidal de Anfotericina B (Amphocil - ABCD) é altamente eficaz no tratamento da LV, mas possui efeitos colaterais como febre, calafrios, aumento da taxa respiratória, o que limita o seu uso (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR *et al.*, 2006). O complexo lipídico de Anfotericina B (Abelect - ABLC) é a mais recente formulação estudada no tratamento do calazar, sendo observado 100% de cura para pacientes com calazar antimônio-resistente e apresenta poucos efeitos colaterais (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Já as formulações das nanopartículas de anfotericina B são administradas oralmente e aderem a mucosa gastrointestinal prolongando o tempo de contato da droga, promovendo uma eficácia sistêmica, mas não possui efeito curativo, apenas diminui a carga parasitária (KAYSER *et al.*, 2003). Entretanto, se no uso clínico estas formulações são ideais em razão da baixa toxicidade e duração do tempo de tratamento, por outro lado, em países em desenvolvimento a utilização das mesmas tem sido inviável devido ao preço exorbitante (SUNDAR e RAI, 2002; SUNDAR *et al.*, 2006). Além das formulações acima descritas, Dea-Ayuela e colaboradores (2004) testaram em hamsters uma formulação de anfotericina B encapsulada em microesferas de albumina que obteve uma boa atividade anti-leishmania, reduzindo os efeitos tóxicos observados quando os compostos estão livres. Essa nova formulação é uma alternativa mais econômica do que os lipossomos no tratamento da LV (DEA-AYUELA *et al.*, 2004).

1.4.4. Paromomicina

Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo, é produzido pelo *Streptomyces rimosus*, utilizado em infecções bacterianas, amebíases e helmintíases intestinais, e demonstrou capacidade de inibir o crescimento de protozoários do gênero *Leishmania* (Figura 3) (SINGH e SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR e CHATTERJEE, 2006; MINODIER e PAROLA, 2007). Essa atividade não é compartilhada por outros aminoglicosídeos (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). A paromomicina injetável tem sido usada no tratamento da LV (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; SUNDAR e RAI, 2002; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR e CHATTERJEE, 2006; SUNDAR *et al.*, 2007), sendo capaz de curar indivíduos resistentes ao tratamento com antimoniais. A combinação desse fármaco com os

antimoniais tem sido utilizada com muito sucesso no Quênia e em Belise, reduzindo drasticamente a duração do tratamento evitando assim os efeitos colaterais causados pelo uso dos antimoniais (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998, MURRAY, 2000). O tratamento realizado com a combinação da paromomicina e do estibogluconato de sódio também é eficaz principalmente em leishmaniose cutânea difusa (BERMAN, 1997; SINGH e SIVAKUMAR, 2004). A paromomicina injetável não é muito efetiva contra as leishmanioses cutâneas, mas a formulação tópica possui efeitos satisfatórios (SUNDAR e RAÍ, 2002; BASANO e CAMARGO, 2004; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; SUNDAR *et al.*, 2007; EL-ON, BAZARSKY e SNEIR, 2007; MUSSI, FERNANDES e FERREIRA, 2007). Alguns efeitos colaterais são frequentemente observados com a paromomicina tópica e por ser um aminoglicosídeo essa substância possui um potencial nefrotóxico (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; JEBBARI e DAVIDSON, 1998; SINGH e SIVAKUMAR, 2004; MINODIER e PAROLA, 2007). O custo desse tratamento é considerado o mais acessível (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006).

1.4.5. Outros medicamentos

Nas últimas duas décadas, esforços têm sido voltados para a pesquisa de uma droga que pudesse ser administrada via oral, visto que o tratamento para as leishmanioses é realizado via parenteral. Assim, o alopurinol e derivados imidazólicos, tais como o cetoconazol, itraconazol e fluconazol têm sido utilizados como terapia coadjuvante, associadas ou não àquelas descritas anteriormente (GRIMALDI e TESH, 1993, SUNDAR e RAI, 2002, MURRAY *et al.* 2005). O alopurinol, um análogo da hipoxantina, inibe o catabolismo das purinas em mamíferos e o anabolismo em parasitos do gênero *Leishmania* (Figura 3). Este fármaco apresenta atividade citotóxica seletiva aos parasitos, devido à incapacidade destes em sintetizar purinas, necessitando, portanto, de purinas pré-formadas do hospedeiro para a sua sobrevivência (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Embora o alopurinol seja pouco eficaz como terapia isolada no tratamento da leishmaniose cutânea (BERMAN, 1997), o aumento da eficácia foi observado, quando utilizado em combinação com outras drogas (BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; JEBBARI e DAVIDSON, 1998; ESFANDIARPOUR e DABIRI, 2007).

Os azóis, cetoconazol, itraconazol e fluconazol, outra classe de antifúngicos, têm sido avaliados quanto a sua atividade leishmanicida no tratamento das

leishmanioses cutânea e visceral (Figura 3). Essas substâncias inibem a produção do ergosterol, esterol da membrana celular da *Leishmania* (CROFT, SEIFERT e YARDLEY, 2006). O cetoconazol e o fluconazol foram submetidos à avaliação em casos de LV na Índia, mas a atividade anti-leishmania não foi satisfatória para induzir a cura clínica (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006). O cetoconazol foi testado durante a década de 1980 e sua eficácia varia entre as espécies de *Leishmania*, por isso seu uso não é comum. O fluconazol tem uma meia vida longa e alta solubilidade em água, além de ser facilmente absorvido após a administração oral, acumulando-se em nível de pele (MUSSI, FERNANDES e FERREIRA, 2007; MINODIER e PAROLA, 2007). O itraconazol foi testado na Índia, Brasil, Argentina, Itália e Reino Unido e observou-se baixa resposta no tratamento da leishmaniose cutânea (MINODIER e PAROLA, 2007).

O desenvolvimento de níveis elevados da resistência às várias drogas existentes necessitou de pesquisas alternativas para drogas administradas oralmente. Simon Croft descreveu o primeiro composto ativo oralmente contra a LC e LV (GELB e HOL, 2002). A miltefosina, ou hexadecilfosfocolina, é um alquilfosfatidilcolina desenvolvido como agente antitumoral que atua interferindo na transdução de sinais celulares inibindo a biosíntese de fosfolípidios e esteróis (Figura 3) (CROFT e ENGEL, 2006; MINODIER e PAROLA, 2007). A miltefosina parece atuar sobre proteína quinase C, que também está presente na membrana celular dos parasitos do gênero *Leishmania* (SINGH e SIVAKUMAR, 2004). Estudos baseados em dados dos Hospitais de Bihar, Índia, mostraram que a miltefosina oral é um tratamento altamente eficaz para LV nos adultos e nas crianças, porém foi observado toxicidade gastrointestinal. Esse estudo propõe o uso da miltefosina em pacientes presentes em áreas onde LV seja endêmica (BHATTACHARYA *et al.*, 2007). A miltefosina é efetiva no tratamento da leishmaniose cutânea e cutaneomucosa causada pela *L. braziliensis* na Bolívia e na Colômbia (ESCOBAR *et al.*, 2002; SOTO e TOLEDO, 2007). A miltefosina tem demonstrado a mesma eficácia na cura das leishmanioses quando comparada a anfotericina B e aos antimoniais (SOTO e BERMAN, 2006; SOTO *et al.*, 2007). A tolerabilidade da miltefosina é maior do que a observada pelos antimoniais, entretanto gestantes não podem fazer o uso deste fármaco por causa da sua teratogenicidade (MURRAY, 2000; SUNDAR e RAI, 2002, SEIFERT *et al.*, 2003; MURRAY *et al.* 2005; SOTO *et al.*, 2007). Contudo, foram descritas cepas de *Leishmania* que são resistentes a

essa droga também, sendo essa resistência induzida em laboratório (SEIFERT *et al.*, 2003).

Outras drogas, como a sitamaquina (Figura 3), também têm sido relatadas na literatura, entretanto, exibe variações nas curvas de cura (SUNDAR e RAI 2002, SINGH e SIVAKUMAR 2004). Essa substância é um derivado da 8-aminoquinoleína e foi desenvolvida pela necessidade de agentes orais eficazes para LV. Sua atividade leishmanicida foi identificada na década de 1970 (CROFT, SEIFERT e YARDLEY, 2006; SUNDAR e CHATTERJEE, 2006). A sitamaquina foi descrita como sendo responsável por alterações morfológicas no parasito e apresenta toxicidade relativamente baixa (CROFT, SEIFERT e YARDLEY, 2006; DUEÑAS-ROMERO, LOISEAU e SAINT-PIERRE-CHAZALET, 2007).

1.4.6. Imunoterapia

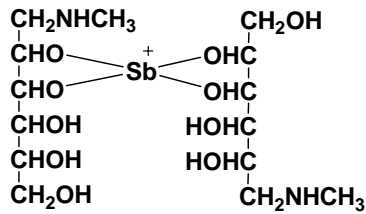
Alternativamente, a imunoterapia tem sido reportada como adjuvante no tratamento dos antimoniais no intuito de melhorar a ação das drogas leishmanicidas (BADARÓ *et al.*, 1990, GENARO *et al.*, 1996, CARVALHO e FERREIRA, 2001; MAYRINK *et al.*, 2006). Mayrink e colaboradores, utilizando vacina com cepas de promastigotas mortas (Leishvacin®), observaram que apesar da imunoterapia ter necessitado de um maior tempo de tratamento quando comparada à terapêutica convencional, ela é recomendada nos casos de contra indicação ou resistência ao tratamento com os antimoniais (MAYRINK *et al.*, 1992; MAYRINK *et al.*, 2006). Por sua vez, a associação da quimioterapia com a imunoterapia mostrou-se eficiente na redução do tempo de tratamento e da quantidade de antimonial administrado, quando comparada à quimioterapia convencional (GENARO *et al.*, 1996; MAYRINK *et al.*, 2006). Entretanto, além dessa combinação apresentar resultados variados, o preço é quase inacessível para a população (SUNDAR e RAI, 2002, SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

Estudos recentes na geração e na manutenção da memória central e da memória efetora das células T CD4⁺ durante a leishmaniose cutânea mostraram novas estratégias para projetos de vacinação (SCOTT, 2005). Durante muitas décadas, vários esforços foram focalizados em vacinas efetivas contra *Leishmania* e as formulações incluem formas mortas ou atenuadas de *Leishmania*, proteínas recombinantes ou proteínas codificadas do DNA do parasito, assim como

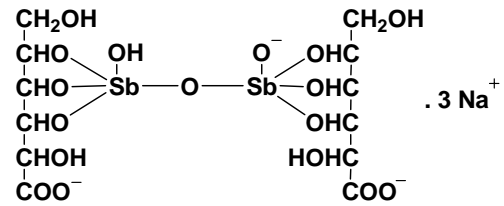
imunomoduladores da saliva do inseto vetor (HANDMAN, 2001 a; b; KEDZIERSKI, ZHU e HANDMAN, 2006). No entanto, apesar de diversas vacinas estarem em estágios avançados, não há nenhuma vacina contra o parasito do gênero *Leishmania* até os dias atuais. Uma vacina anti-leishmania ideal necessitaria possuir diversos atributos que incluem; (1) segurança; (2) ser acessível às populações necessitadas; (3) indução das respostas T CD4⁺ e CD8⁺ e da memória imunológica a longo prazo que podem ser impulsionadas por infecções naturais, assim minimizando o número de imunizações; (4) eficácia no encontro às espécies que causam LC e LV; (5) estabilidade na temperatura ambiente, eliminando a necessidade de temperatura fria para preservar o potencial da vacina; (6) eficácia como uma vacina profilática bem como uma medida terapêutica. Enquanto as relações de custo-eficácia e de segurança podem ter uma solução relativamente fácil, a indução e a manutenção das respostas imunes requeridas surgem como maiores desafios (KEDZIERSKI, ZHU e HANDMAN, 2006).

Acredita-se que uma proteção efetiva contra as leishmanioses envolva uma resposta imunológica protetora, na qual macrófagos sejam induzidos a produzirem reativos intermediários de nitrogênio e de oxigênio e seja efetiva nos mecanismos de sinalização de células T CD4⁺. Desse modo, promoveria a síntese de citocinas do perfil Th1, e conseqüentemente a eliminação das formas amastigotas do interior das células infectadas (AREVALO *et al.*, 2001; COLER e REED, 2005; ALEXANDER e BRYSON, 2005).

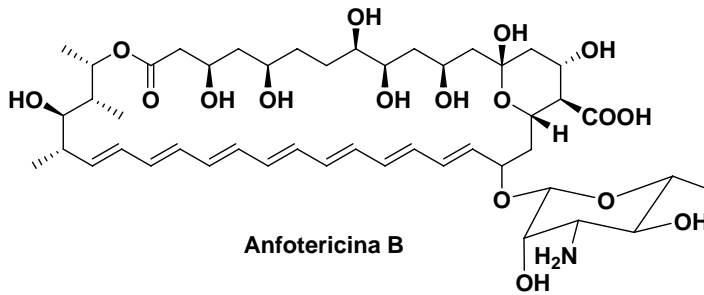
Além das diferentes drogas disponíveis para terapêutica das leishmanioses, várias pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de se obter medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o paciente. Embora, atualmente, haja vários compostos disponíveis para o tratamento das leishmanioses, nenhum é efetivo na erradicação da doença, seja por limitações do próprio medicamento, seja devido ao custo, toxicidade ou mesmo pela resistência dos parasitos. Sendo assim, vários pesquisadores têm buscado desenvolver novos compostos que tenham ação sobre o parasito ou potencialize o perfil de resposta imune efetora do hospedeiro (CROFT e COOMBS, 2003).



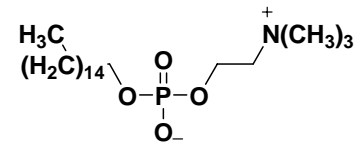
Antimoniato de Meglumina (Glucantime)



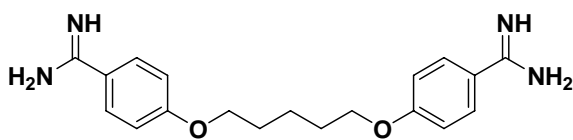
Estibogluconato de Sódio (Pentostan)



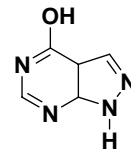
Anfotericina B



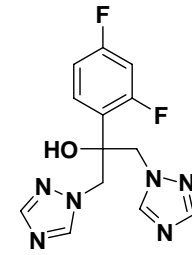
Hexadecilfosfocolina (Mitelfosina)



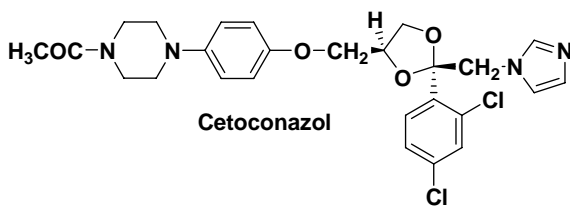
Pentamidina



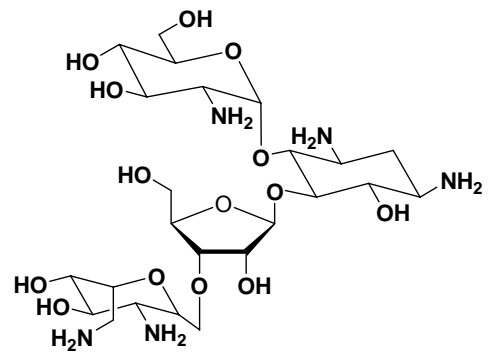
Alopurinol



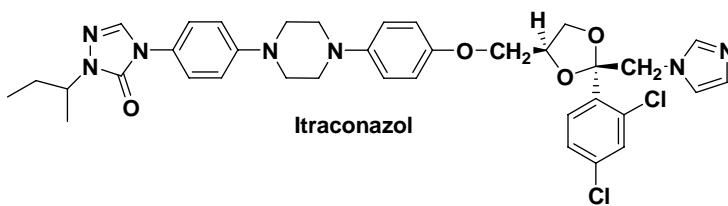
Fluconazol



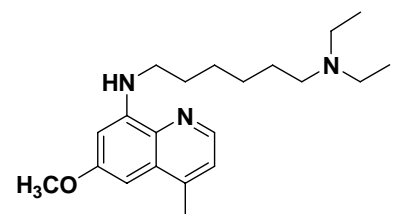
Cetoconazol



Paromomicina



Itraconazol



Sitamaquina

Figura 3. Estrutura química dos fármacos (adaptado, BALAÑA-FOUCE *et al.*, 1998; CROFT e COOMBS, 2003; CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006; ZHANG, LING e DU, 2007).

1.5. Novos derivados purínicos

As purinas possuem indiscutível importância biológica e podem ser considerados como um dos mais importantes anéis heterocíclicos da natureza (RIDA *et al.*, 2007). As purinas são de vital importância para todos os organismos vivos, sendo essenciais para a síntese dos ácidos nucleicos, proteínas, e outros metabólitos, bem como para a energia exigida nas reações (RIDA *et al.*, 2007).

As células obtêm nucleotídeos purínicos através de duas rotas metabólicas, síntese *de novo* ou aquisição extracelular. Mas uma das mais intrigantes rotas metabólicas nos protozoários é a perda da capacidade de obtenção de purinas através da síntese *de novo*, que utiliza compostos simples para a síntese de diversos nucleotídeos purínicos. Assim, parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* são considerados seres auxotróficos e, na incapacidade de sintetizar as suas próprias purinas necessárias ao seu crescimento, utilizam os percursos salvados, que são a reutilização de rotas através das quais as células podem satisfazer as suas necessidades de purina endógena e/ou exógena através de fontes de purinas pré-formadas (KOUNI, 2003). Desta maneira, a síntese de substâncias que inibem ou interferem na captação de purinas em *Leishmania* é uma excelente estratégia para a obtenção de novos medicamentos.

No ser humano, a captação celular e o fluxo fisiológico de nucleosídeos e seus análogos sintéticos é regulamentada por transporte especializado de proteínas conhecidas como transportadores de nucleosídeos. Os transportadores de nucleosídeos podem ser classificados em duas grandes categorias: Transportadores de nucleosídeos bidirecionais equilibrativos independentes de sódio (ENTs) e os Transportadores de nucleosídeos unidirecionais dependentes da concentração de sódio (CNTs). Algumas isoformas dos ENTs foram caracterizadas e sabe-se que há diferença quanto à sensibilidade aos derivados de purina, pois algumas isoformas necessitam de concentrações micromolares para inibir o transporte de purinas e outras necessitam de concentrações nanomolares para exercer essa função (CARTER, LANDFEAR e ULLMAN, 2001; GUPTA e BOULAMWINI, 2007). Já foi também descrito que as células mamíferas possuem inibidores do transporte de nucleosídeos, tal como o NBMPR (Nitrobenziltioinosina). Os transportadores de nucleosídeos purínicos dos mamíferos têm ampla especificidade e variam em sua capacidade de reconhecer nucleosídeos e nucleobases de purina e pirimidina (KOUNI, 2003; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005). Nenhum dos

transportadores de purina é dependente de sódio, pois pertencem a família ENT (KOUNI, 2003; CARTER, LANDFEAR e ULLMAN, 2001; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005).

Numa análise sobre células infectadas, os parasitos dentro do vacúolo parasitóforo multiplicam-se rapidamente e obtém as suas necessidades nutricionais através da membrana do vacúolo parasitóforo do hospedeiro, que atua como orifícios moleculares permitindo a difusão bidirecional equilibrada de pequenas moléculas (<1300 Da), incluindo nucleosídeos e nucleotídeos, entre o espaço vacuolar e o citoplasma da célula hospedeira. Em contraste, a membrana da célula hospedeira tem permeabilidade fortemente restringida (KOUNI, 2003). As membranas celulares do hospedeiro não transportam nucleotídeos porque há gasto de energia, portanto, nucleotídeos têm de ser defosforilados em nucleosídeos antes de serem transportados para dentro da célula. No entanto, a infecção mostra alterar a permeabilidade e metabolismo de purinas em células infectadas (AL SAFARJALANI *et al.*, 2003; KOUNI, 2003).

Interessantemente, NBMPR não inibe a captação de nucleosídeos em células parasitadas, diferente do que ocorre em células mamíferas não infectadas. Com isso o NBMPR não só protege células hospedeiras de análogos de nucleosídeos tóxicos como ele também é seletivamente tóxico para o próprio parasito (KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005). Contudo, é evidente que nem todos os transportes de nutrientes são alterados pela infecção, o que indica que a alteração no transporte de nucleosídeos de células infectadas tem um grau de seletividade (KOUNI, 2003).

O desenho das drogas contra patógenos é usualmente baseado nas diferenças bioquímicas e fisiológicas entre esses patógenos e o seu hospedeiro (KOUNI, 2003; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005). Análogos que inibem principalmente transportadores ou enzimas envolvidas no metabolismo de recuperação de purinas em parasitos são potenciais agentes quimioterápicos com um elevado grau de seletividade, pois os análogos de purina podem ser transportados aos parasitos através dos seus transportadores específicos excluindo desse transporte as células normais (KOUNI, 2003; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005). Alternativamente, análogos, que são transportados seletivamente e/ou preferencialmente metabolizados em nucleotídeos tóxicos para o parasito, poderiam atuar como substratos "subversivos" e apresentariam toxicidade

seletiva contra esses parasitos. Em ambos os casos, a falta de biossíntese *de novo* de purina e a total dependência de purinas salvas tornaria o parasito especialmente vulnerável a qualquer estratégia e as drogas poderiam atuar seletivamente nos transportadores de purina dos parasitos mediando à captação de antimetabólitos purínicos (KOUNI, 2003; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005).

Assim, face aos problemas relacionados com a terapia das leishmanioses e devido à importância das purinas, e conseqüentemente, aos análogos dessas substâncias, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito *in vitro* de novas moléculas derivadas de purinas (Figura 4) em *Leishmania*, na tentativa de contribuir para a tratamentos alternativos das leishmanioses.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade leishmanicida de derivados purínicos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1. Avaliar o efeito citotóxico das moléculas sintéticas derivadas de purina (Tabela 1), provenientes de síntese por nosso grupo de pesquisa, em diferentes concentrações, sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* obtidas de culturas axênicas;
- 2.2.2. Avaliar o efeito citotóxico das moléculas que mostraram atividade antipromastigota efetiva, em cinética de tempo e diferentes concentrações, sobre amastigotas de *L. amazonensis* obtidas em cultura com macrófagos;
- 2.2.3. Avaliar o efeito citotóxico das moléculas em macrófagos;
- 2.2.4. Quantificar a produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, induzida pela adição das moléculas, em cinética de tempo e diferentes concentrações.
- 2.2.5. Quantificar a produção de NO pelas macrófagos parasitados por *L. amazonensis*, induzida pela adição dos derivados purínicos, em cinética de tempo e diferentes concentrações.
- 2.2.6. Quantificar a produção de NO pelos macrófagos, induzida pela adição dos derivados purínicos, em cinética de tempo e diferentes concentrações.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. PARASITOS

Foram utilizadas duas cepas de referência de *Leishmania*: *L. amazonensis* (cepa MHOM/Br/75/Josefa, isolada de paciente com leishmaniose cutânea-difusa) e *L. chagasi* (cepa MHOM/Br/74/PP75, isolada de paciente com leishmaniose visceral). 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.) e as promastigotas de *L. chagasi* foram cultivadas em Meio 199 (Sigma Chemical Co., St Louis, Mo.), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) e cultivados à 24°C, sendo coletadas em fase exponencial de crescimento.

3.2. MOLÉCULAS UTILIZADAS

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

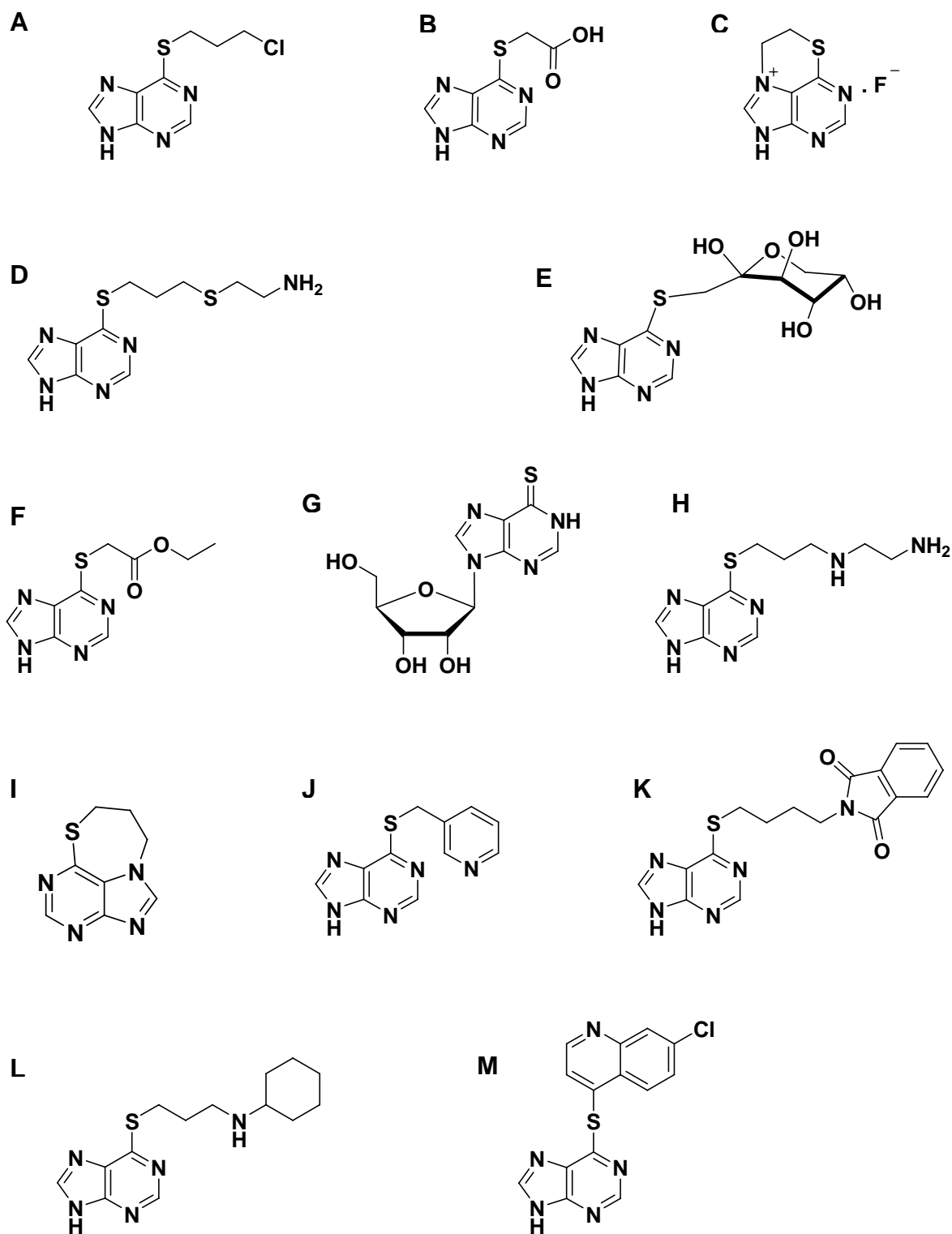


Figura 4: Estrutura química dos derivados purínicos analisados:

A- 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina; **B-** ácido 2-(9H-purin-6-tioil) acético; **C-** sal de flúor de 7,8-diidro-(1,4)tiazepino(3,2,4-hi)purina; **D-** 6-(3'-(tioetilamina)propiltio)purina; **E-** D-frutose-1-desoxi-1-(6-mercaptopurina); **F-** alfa-(6-mercaptopurina)-etanoato de etila 1; **G-** Tioguanosina; **H-** 6-(3-etilenodiamina propiltio)-9H-purina; **I-** 8,9-diidro-7H-(1,4) tiazepino(3,2,4-hi) purina; **J-** 6-(piridina-4-il)metiltio)-9H-purina; **K-** 2-(4-(9H-purina-6-iltio)butil)isoindolino-1,3-dio; **L-** N-(3-(9H-purina-6-iltio)propil)ciclohexilamina; **M-** (6-mercaptopurina)-7-cloro-aminoquinoléina

3.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA*

A atividade antipromastigota foi realizada em *L. amazonensis* e *L. chagasi* 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 pelas desidrogenases mitocondrais (MOSSMAN, 1983). As formas promastigotas foram distribuídas na placa de 96 poços na concentração de 2×10^6 células/ml de meio Warren contendo 10% de SFB para *L. amazonensis* e 3×10^6 células/ml de meio 199 contendo 10% de SFB para *L. chagasi*. As moléculas testadas foram adicionadas após 1 hora em concentrações variadas. Os testes foram realizados em triplicatas, no qual em três poços não houve adição de drogas (controle) e em outros três poços foi utilizada uma concentração final de DMSO de 0,1% que é a concentração máxima utilizada nas diluições de alguns derivados purínicos (227 μ M). Após três dias de incubação em estufa à 24°C, foi adicionado 10 μ L de MTT à 5 mg/mL em cada poço e incubado durante quatro horas. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L 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 foi determinada a concentração inibitória (IC₅₀) de cada molécula, que representa a concentração molar que inibe 50% do crescimento celular. A anfotericina B foi utilizada como fármaco de referência e os valores de IC₅₀ foram 0,9 μ M e 1,9 μ M para promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, respectivamente.

3.4. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *L. AMAZONENSIS*

O estudo do efeito dos derivados purínicos em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi realizado apenas para as moléculas que apresentaram atividade contra as formas promastigotas. Os testes biológicos anti-amastigotas foram realizados com células da linhagem J774A.1. Sobre lamínula de vidro de 13mm de diâmetro na placa de 24 poços foram distribuídas 300 μ L de uma cultura de $1,6 \times 10^6$ células J774A.1/mL meio RPMI-1640 contendo 10% SFB que permaneceram por 3 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C. Após esse período, as células foram

lavadas com PBS estéril e adicionado 300µL em cada poço de uma cultura de $1,6 \times 10^7$ formas promastigotas na fase estacionária/mL meio RPMI-1640 contendo 10% SFB para interagir por 3 horas com as células hospedeiras na razão de 10 parasitos para cada macrófago a 33°C. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirar os parasitos que não foram fagocitados e as moléculas foram adicionadas. Após 24 e 48 horas de infecção, em estufa de CO₂ à 37°C, as células foram coradas com Giemsa e cada teste foi realizado em duplicata.

O efeito antiparasitário dos derivados purínicos para as formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi avaliado a partir da contagem dessas formas dentro dos macrófagos parasitados em relação ao controle que foi macrófagos infectados sem a adição de compostos.

3.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO SOB MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1

Para verificar a citotoxicidade em células de mamíferos, foram utilizados macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c estimulados com 1 mL de tioglicolato e células da linhagem J774A.1.

Após obtenção do lavado peritoneal dos camundongos balb/c, as células foram centrifugadas por 10 minutos à 1000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido com o meio RPMI-1640, sendo retirada uma alíquota para a contagem em câmara de Neubauer. Foram adicionados 100µL em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 1×10^5 células/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB em placa de 96 poços que permaneceu por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C para os macrófagos aderirem na placa. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril e adicionado meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e as moléculas testadas. Apenas as moléculas que obtiveram atividade antiparasitária nos testes anti-promastigotas foram utilizadas nos testes de citotoxicidade em células de mamíferos. Após 48 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C, foi adicionado 10 µL de MTT (MOSSMAN, 1983) à 5 mg/mL. Depois de duas horas, 100 µL de isopropanol/ácido clorídrico foi adicionado em cada poço e a leitura foi realizada

em espectrofotômetro a 570 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). Cada teste foi realizado em triplicata.

Nos testes realizados com as células J774A.1 foram adicionadas 100µL em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 1×10^5 células/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e a placa permaneceu por 3 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C para os macrófagos aderirem. Em seguida, cada poço foi lavado com PBS estéril e adicionado meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e os derivados purínicos que apresentaram atividade anti-promastigota. A placa foi transferida para a estufa com 5% de CO₂ a 37°C, onde permaneceu por 48 horas e posteriormente, foi adicionado 10 µL de MTT (MOSSMAN, 1983) à 5 mg/mL. Após duas horas, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de isopropanol/ácido clorídrico e a leitura realizada em espectrofotômetro a 570 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). Os testes foram realizados em triplicatas, em três poços não houve adição de compostos (controle) e em outros três poços foi utilizada uma concentração final de DMSO de 0,1%, que foi a concentração máxima utilizada nas diluições de alguns derivados purínicos (227 µM).

Os dados estão expressos de citotoxicidade dos macrófagos (Tabela 3) foram calculados de acordo com as medidas colorimétricas e a seguinte fórmula (Olmo *et al.*, 2006):

% de Citotoxicidade: $[1 - (DO_{\text{células + compostos}} / DO_{\text{células}})] \times 100$, onde DO significa densidade ótica.

3.6. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* E *L. CHAGASI*

O óxido nítrico é biosintetizado através da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase. Como o NO possui uma vida curta sua produção foi estimada pelo acúmulo de nitrito (NO₂⁻), um sub-produto estável da oxidação do NO, usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982).

A produção de NO em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi analisada através da quantificação do nitrito (NO₂⁻) presente no sobrenadante da cultura. Os parasitos foram distribuídos na placa de 96 poços à concentração de 2×10^6 células/mL de meio Warren contendo 10% de SFB para *L. amazonensis* e 3×10^6

células/mL de meio 199 contendo 10% de SFB para *L. chagasi*. Os derivados purínicos testados foram aqueles que obtiveram atividade antiparasitária efetiva contra as formas promastigotas e estes foram adicionados à placa em diferentes concentrações. Os testes foram realizados em triplicatas, em três poços não houve adição de compostos (controle) e em outros três poços foi utilizada uma concentração final de DMSO de 0,05%, que foi a concentração máxima utilizada nas diluições de alguns derivados purínicos (114 µM). A placa foi centrifugada por 10 minutos à 2000 rpm após 24, 48 e 72 horas de cultivo em estufa à 24°C, sendo retirada uma alíquota de 50 µL do sobrenadante da suspensão de promastigotas que foram incubadas com 25 µL de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 25 µL de N-1-diidrocloreto de naftiletilenodiamina (Sigma) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% (Sigma) em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices). A produção de nitrito foi quantificada através da comparação com curva padrão utilizando diferentes concentrações de nitrito de sódio.

3.7. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 PARASITADOS POR *L. AMAZONENSIS*

O NO das formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi dosado através da concentração de nitrito usando o reagente de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Alíquotas de 50 µL do sobrenadante das culturas foram retiradas após 24 e 48 horas de tratamento com os derivados purínicos que obtiveram atividade antiparasitária nos testes anti-promastigotas e incubadas com 25 µL de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 25 µL de N-1-diidrocloreto de naftiletilenodiamina (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 nitrito.

Camundongos Balb/c foram estimulados com 1 mL de tioglicolato durante 72 horas, em seguida foi realizado o lavado peritoneal e as células foram centrifugadas por 10 minutos à 1000 rpm, sendo o sobrenadante descartado e o precipitado

ressuspendido com o meio RPMI-1640. Em seguida, foram adicionados 100 μL em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 1×10^5 células/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB que permaneceu por 24 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C para os macrófagos aderirem na placa. Após 24 horas, cada poço foi lavado com PBS estéril e adicionado 100 μL de uma cultura de 1×10^6 formas promastigotas na fase estacionária/mL meio RPMI-1640 contendo 10% SFB em cada poço para interagir por 3 horas com as células hospedeiras na razão de 10 parasitos para cada macrófago a 33°C . Após esse período, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirar os parasitos que não foram fagocitados e as moléculas, 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina, ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio) purina, foram adicionadas.

A dosagem de NO também foi realizada com células da linhagem J774A.1. Em placa de 96 poços foram adicionados 100 μL em cada poço de uma cultura de 1×10^5 células/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB que permaneceu por 3 horas em estufa com 5% de CO_2 a 37°C para os macrófagos aderirem na placa. Em seguida cada poço foi lavado com PBS estéril e adicionado 100 μL em cada poço de uma cultura de 1×10^6 formas promastigotas na fase estacionária/mL meio RPMI-1640 contendo 10% SFB para interagir por 3 horas com as células hospedeiras na razão de 10 parasitos para cada macrófago, a 33°C . Após esse período, cada poço foi lavado com PBS estéril para retirar os parasitos que não foram fagocitados e as moléculas a serem testadas, 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina, ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio) purina, foram adicionadas.

3.8. DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1

Para determinar a produção de NO pelas células de mamíferos, foram utilizados macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c estimulados com 1 mL de tioglicolato e células da linhagem J774A.1. Apenas as moléculas que obtiveram atividade antiparasitária nos testes anti-promastigotas foram utilizadas nos testes de produção de NO em células de mamíferos.

Foram adicionados 100 μ l em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 1×10^5 macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c/mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB que permaneceu por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C para os macrófagos aderirem na placa. Em seguida, os poços foram lavados com PBS estéril e adicionados meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e os derivados purínicos que apresentaram efeito antiparasitário, 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina, ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio) purina. Após 48 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C, foram coletadas alíquotas do sobrenadantes dessas culturas, sendo cada teste realizado em triplicata.

Nos testes realizados com as células J774A.1 foram adicionadas 100 μ L em cada poço da placa de 96 poços de uma cultura de 1×10^5 células J774A.1 /mL de meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e a placa permaneceu por 3 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C para os macrófagos aderirem. Em seguida os poços foram lavados com PBS estéril e adicionado meio RPMI-1640 contendo 10% SFB e os derivados purínicos, 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina, ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio) purina. Após 48 horas em estufa com 5% de CO₂ à 37°C, foram coletadas alíquotas do sobrenadantes dessas culturas, sendo cada teste realizado em triplicata.

As alíquotas de 50 μ L dos sobrenadantes obtidas a partir de cultura de células tratadas com os derivados purínicos, em concentrações variadas, foram incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente com 50 μ L do Reativo de Griess (25 μ L de sulfanilamida (Sigma) a 1% e 25 μ L de N-1-diidrocloreto de naftiletildenodiamina (Sigma) a 0,1% em ácido fosfórico a 2,5% - Sigma). A absorbância foi medida utilizando-se um leitor automático (SPECTRAMAX 190, Molecular Devices), com filtro de 540 nm, e a produção de NO quantificada através da comparação com uma curva padrão de nitrito.

Os testes foram realizados em triplicatas, no qual em três poços não houve adição de compostos (controle) e em outros três poços foi utilizada uma concentração final de DMSO de 0,05%, que foi a concentração máxima utilizada nas diluições de alguns derivados purínicos (114 μ M).

4 RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DERIVADOS DE PURINA SOBRE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* E *L. CHAGASI*

O efeito antiparasitário das moléculas sintéticas derivadas de purina foi avaliado, *in vitro*, em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Tabela 1). A viabilidade celular foi analisada após 72 horas de cultivo através do teste colorimétrico utilizando o MTT.

Dentre os 13 derivados de purina testados, apenas um se mostrou efetivo contra as formas promastigotas de ambas espécies utilizadas nos ensaios biológicos, o sal de flúor de 7,8-diidro-(1,4)tiazepino(3,2,4-hi)purina (ART F) com o mesmo valor de IC₅₀ de 28 µM para *L. amazonensis* e *L. chagasi* (Tabela 1 e Figura 4 C).

O 6-(3-cloropropiltio)-9H-purina (BROMEC); ácido 2-(9H-purin-6-tioil)acético (BROMER) e 6-(3'-(tioetilamina)propiltio)purina (ART S) apresentaram atividade leishmanicida apenas contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* com valor de IC₅₀ de 50 µM, 39 µM e 50 µM, respectivamente (Tabela 1 e Figura 4 A, B e D). BROMEC e BROMER foram diluídas em DMSO e o controle de DMSO não mostrou citotoxicidade para os parasitos na concentração máxima utilizada (0,1%).

Os seguintes derivados não apresentaram atividade contra as formas promastigotas das espécies de *Leishmania* utilizadas nos ensaios biológicos até a concentração máxima testada (227µM): *D*-frutose-1-desoxi-1-(6-mercaptipurina); alfa-(6-mercaptipurina)-etanoato de etila 1; Tioguanosina; 6-(3-etilenodiamina propiltio)-9H-purina; 8,9-diidro-7H-(1,4) tiazepino(3,2,4-hi) purina; 6-((piridina-4-il) metiltio)-9H-purina; 2-(4-(9H-purina-6-iltio) butil)isoindolino-1,3-dio; N-(3-(9H-purina-6-iltio)propil)ciclohexilamina; (6-mercapto purina) - 7 - cloro - aminoquinoleína (Tabela 1 e Figura 4 E - M).

Anfotericina B foi utilizada como controle com valor de IC₅₀ para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* de 0,9 e 1,9 µM, respectivamente.

Tabela 1 - Avaliação do efeito antiparasitário de derivados de purinas em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

NOME DA MOLÉCULA	IC ₅₀ para <i>L. amazonensis</i> (μ M)	IC ₅₀ para <i>L. chagasi</i> (μ M)
BROMEC	50	> 227
BROMER	39	> 227
ART F	28	28
ART S	50	> 227
<i>D</i> -frutose-1-desoxi-1-(6-mercaptopurina)	> 227	> 227
alfa-(6-mercaptopurina)-etanoato de etila 1	> 227	> 227
Tioguanozina	> 227	> 227
6-(3-etilenodiamina propiltio)-9H-purina	> 227	> 227
8,9-diidro-7H-(1,4) tiazepino(3,2,4-hi) purina	> 227	> 227
6-(piridina-4-il)metiltio)-9H-purina	> 227	> 227
2-(4-(9H-purina-6-iltio)butil)isoindolino-1,3-dio	> 227	> 227
N-(3-(9H-purina-6-iltio)propil)ciclohexilamina	> 227	> 227
(6-mercaptopurina)-7-cloro- aminoquinoleína	> 227	> 227

4.2. AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DOS DERIVADOS DE PURINA EM AMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* OBTIDAS NA INTERAÇÃO COM CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1.

As moléculas que apresentaram efetiva atividade contra promastigotas de *Leishmania* foram testadas quanto à citotoxicidade em formas amastigotas de *L. amazonensis* após interação com células da linhagem J774A.1. Os resultados foram obtidos pela contagem do número de amastigotas intracelulares após coloração com Giemsa. Foram utilizados nos testes anti-amastigotas as concentrações do IC₅₀ e duas vezes esse valor para a forma promastigota de *L. amazonensis*.

Como pode ser observado na Figura 5A e na Tabela 2, células tratadas com BROMECA à 100 µM e 50 µM, reduzem o número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, sendo mais efetiva esta redução no período de 24 horas de tratamento (22% e 30%, respectivamente). Não houve diferença significativa entre células tratadas em ambas concentrações, mas é interessante ressaltar que a atividade anti-amastigota mais efetiva foi à concentração de 50 µM, IC₅₀ para as formas promastigotas dessa espécie.

No tratamento de amastigotas de *L. amazonensis*/células J774A.1 com BROMER observamos efetiva inibição de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em ambas concentrações testadas (Figura 5B, Figura 6 e Tabela 2). Entre as moléculas analisadas, BROMER foi a que apresentou a maior atividade anti-amastigota.

Observando a Figura 5C e Tabela 2, ART F demonstrou atividade anti-amastigota efetiva somente no período de 24 horas de tratamento em ambas concentrações, sendo que a concentração de 28 µM (valor do IC₅₀ para as formas promastigotas de *L. amazonensis*) possui melhor atividade anti-amastigota na inibição do número de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* em comparação com a concentração superior (56 µM). Após o período de 24 horas, a atividade anti-amastigota é reduzida pela metade.

Dentre os derivados de purinas analisados, ART S foi o que apresentou a menor atividade anti-amastigota na concentração correspondente ao valor do IC₅₀ para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (50 µM) (Figura 5D e Tabela 2).

A anfotericina B foi utilizada como droga controle e a redução do número de amastigotas foi observada em 24 horas de tratamento pós-infecção com 48% e 35% de redução do número de amastigotas referente à concentração de 1,0 μM e 0,1 μM , respectivamente (dados não mostrados). Mas em 48 horas essa redução foi muito maior, dificultando a contagem, pois muitas células estavam lisadas, o que sugere que a anfotericina B é citotóxica para o parasito e para os macrófagos também.

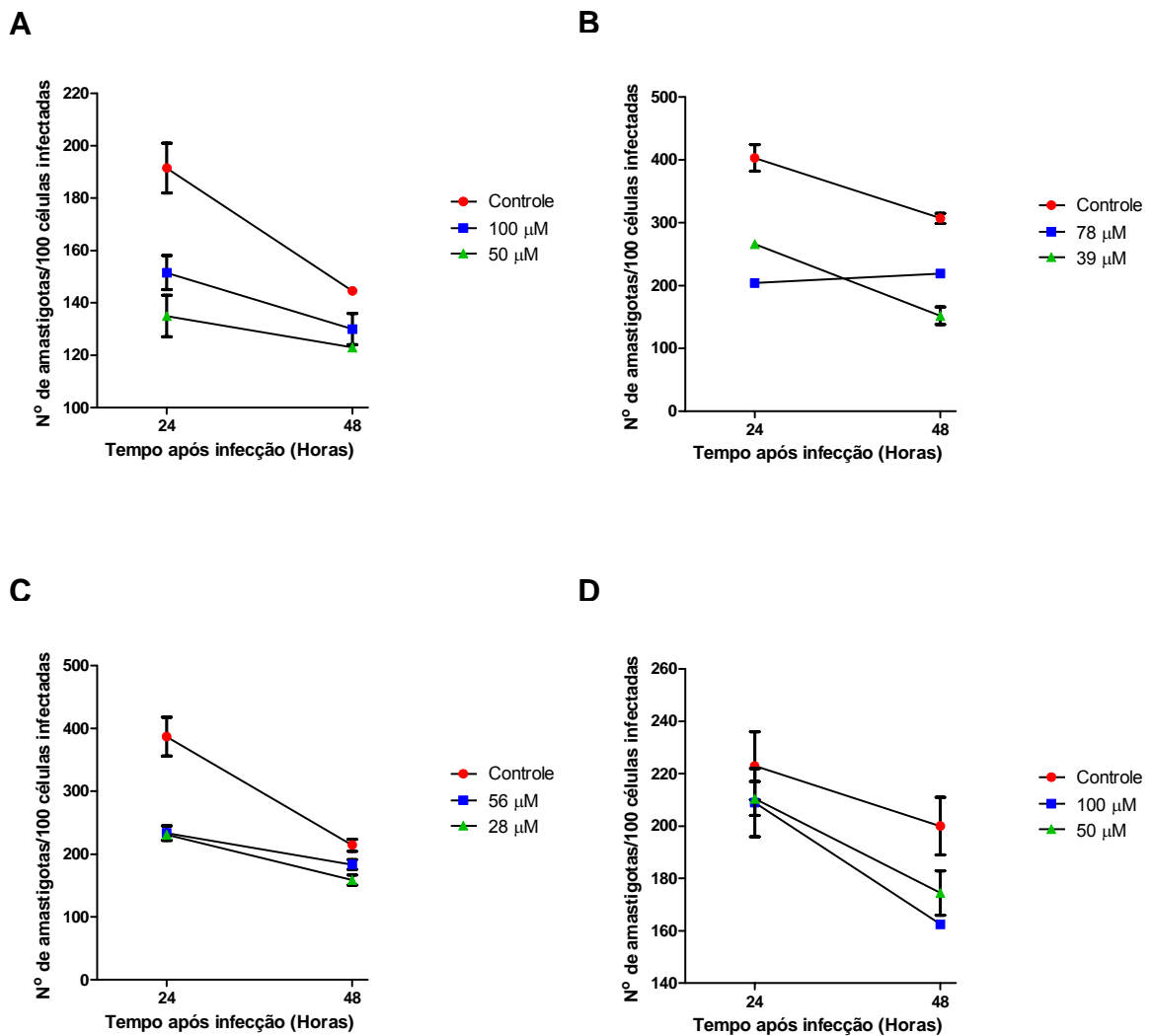


Figura 5: Número de amastigotas de *L. amazonensis*/ 100 células da linhagem J774A.1 infectadas após 24 e 48 de incubação com BROMEC (A), BROMER (B), ART F (C), ART S (D).

Tabela 2: Porcentagem de Inibição de amastigotas de *L. amazonensis* por célula J774A.1 infectada.

Nome da molécula	Concentração	% de Inibição de amastigotas de <i>L. amazonensis</i> /célula infectada	
		24h	48h
BROMECC	50 µM	30.0	15.6
	100 µM	22.0	10.4
BROMER	39 µM	37.5	50.5
	78 µM	49.0	28.7
ART F	28 µM	44.1	22.4
	56 µM	36.8	18.2
ART S	50 µM	5.4	SA
	100 µM	6.3	19.0

SA – Sem atividade na determinada concentração.

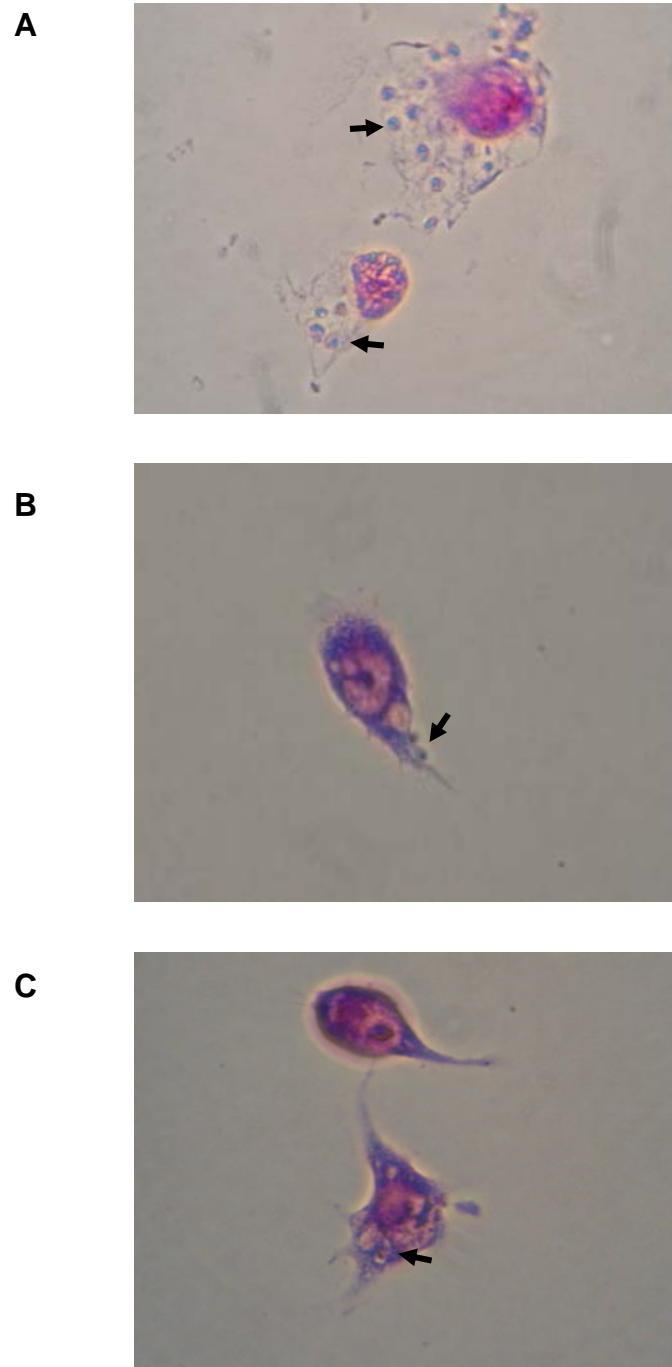


Figura 6: Interação de 24 horas de *L. amazonensis*/J774A.1: A- controle; B- BROMER 39 μ M ; C- BROMER 78 μ M. As setas mostram o parasito (Aumento de 1000X).

4.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C.

As moléculas que apresentaram atividade antiparasitária contra formas promastigotas de *Leishmania* foram testadas quanto à citotoxicidade em células da linhagem J774A.1 e macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c. Para avaliar a citotoxicidade, as células foram incubadas com as diferentes moléculas, em concentrações variadas durante 48 horas e após este tempo foi medida a viabilidade celular através do teste colorimétrico utilizando o MTT.

Como pode ser observado na Tabela 3, há diferença de sensibilidade das moléculas derivadas de purina em relação aos macrófagos inflamatórios de camundongos e às células da linhagem J774A.1, onde estas últimas parecem ser mais sensíveis aos compostos testados.

Os derivados de purina BROMECC e ART S apresentaram efeito citotóxico para as células J774A.1 e não são citotóxicas para os macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c. Entretanto, em todas as concentrações testadas destes derivados purínicos, a viabilidade das células J774A.1 foi acima de 70%.

Dentre as moléculas testadas, ART F foi a única molécula que apresentou efeito significativo sobre a viabilidade dos macrófagos inflamatórios de camundongos BALB/c e BROMER foi a única que não apresentou efeito citotóxico para nenhuma das células testadas.

BROMECC e BROMER foram diluídas em DMSO e o controle de DMSO não mostrou citotoxicidade para ambas as células testadas na concentração máxima utilizada (0,1%).

Tabela 3 - Porcentagem de citotoxicidade dos derivados purínicos em macrófagos inflamatórios de camundongos e células J774A.1.

Concentração da molécula (μM)	Citotoxicidade em Células J774A.1 (%)				Citotoxicidade em macrófagos inflamatórios de camundongos (%)			
	BROMECC	BROMER	ART F	ART S	BROMECC	BROMER	ART F	ART S
114	25,8	NC	22,1	10,2	NC	NC	19,8	NC
57	18,9	NC	23,9	NC	NC	NC	NC	NC
28	17,2	NC	27,7	NC	NC	NC	NC	NC
14	14,6	NC	22,5	13,8	NC	NC	18,7	NC
7	NC	NC	12,6	NC	NC	NC	-	NC

NC - substância não citotóxica na determinada concentração.

4.4. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADAS COM OS DERIVADOS PURÍNICOS.

A avaliação da produção de NO pelos parasitos foi determinada pela dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas incubadas com os derivados purínicos após cinética de tempo e concentrações variadas.

Como podemos observar na Figura 7 A não houve diferença significativa da produção de NO pelos parasitos no período de 24 e 48 horas de tratamento com BROMEC, 7,4 e 15 μM de nitrito, respectivamente e a redução da produção de NO foi de 28% e 24% em relação às formas promastigotas não tratadas. Mas em 72 horas de tratamento houve produção de 15 μM de nitrito com redução de cerca de 40% dessa produção em relação ao controle.

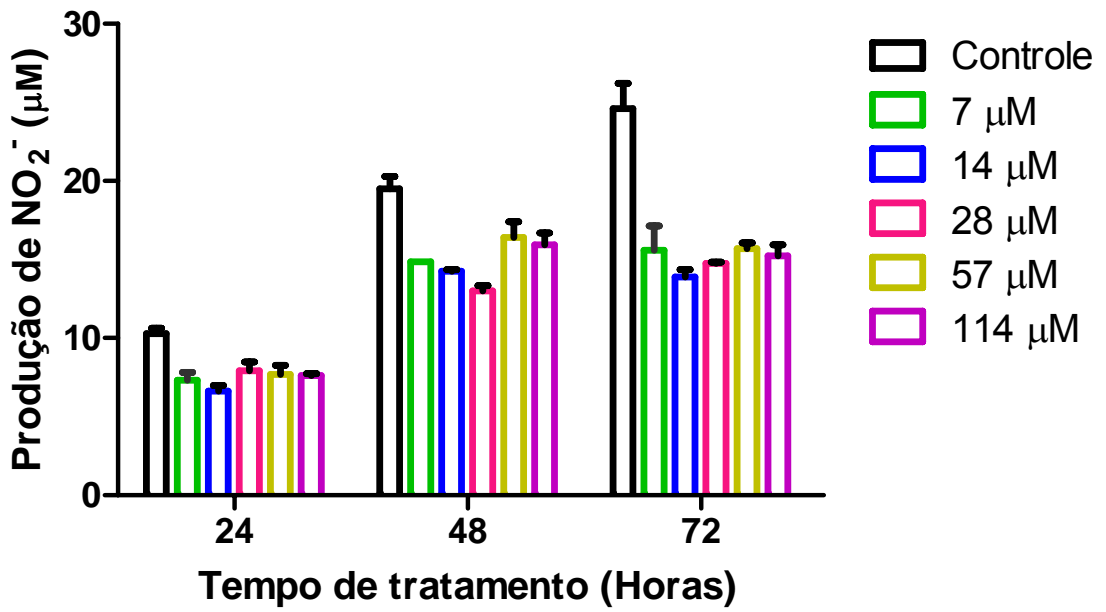
No tratamento com BROMER (Figura 7 B) a produção de NO é inibida em todas as concentrações, principalmente em 48 e 72 horas, mas não é dose dependente. No período de 24 e 48 horas de tratamento a produção de NO foi de 4,7 e 9 μM com redução de 7,6% e 17% em relação ao controle. Já no período de 72 horas de tratamento observa-se a maior redução da produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com BROMER, 5 μM (cerca de 50% de redução da produção de NO em relação ao controle).

A inibição da produção de NO das formas promastigotas tratadas com o ART F é mais significativa no período de 48 e 72 horas de tratamento, 6 e 6,3 μM respectivamente e redução de 46 e 35% da produção de NO em relação às promastigotas não tratadas, exceto na concentração máxima utilizada (114 μM) durante o período de 48 horas de tratamento (Figura 8 A).

O período de 72 horas de tratamento das promastigotas com o ART S é o mais significativo quando comparado aos períodos de 24 e 48 horas de tratamento, sendo esse período dose-dependente. A produção de nitrito observada foi de 5,5, 9 e 5,7 μM nos respectivos períodos de 24, 48 e 72 horas de tratamento com redução de 7, 19 e 40% da produção de NO comparada aos controles dos tratamentos (Figura 8 B).

Como podemos observar nas Figuras 7 e 8, no período de 24 horas de tratamento das formas promastigotas de *L. amazonensis*, o BROMEC é o derivado purínico que induz a maior inibição da produção de NO que é cerca de 28%. Porém em 48 horas essa inibição da produção de NO é maior em ART F (46%), exceto pela concentração de 114 μM e em 72 horas de tratamento, BROMER possui a maior inibição da produção de NO (cerca de 50%). O DMSO não interferiu na produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* (dados não mostrados).

A



B

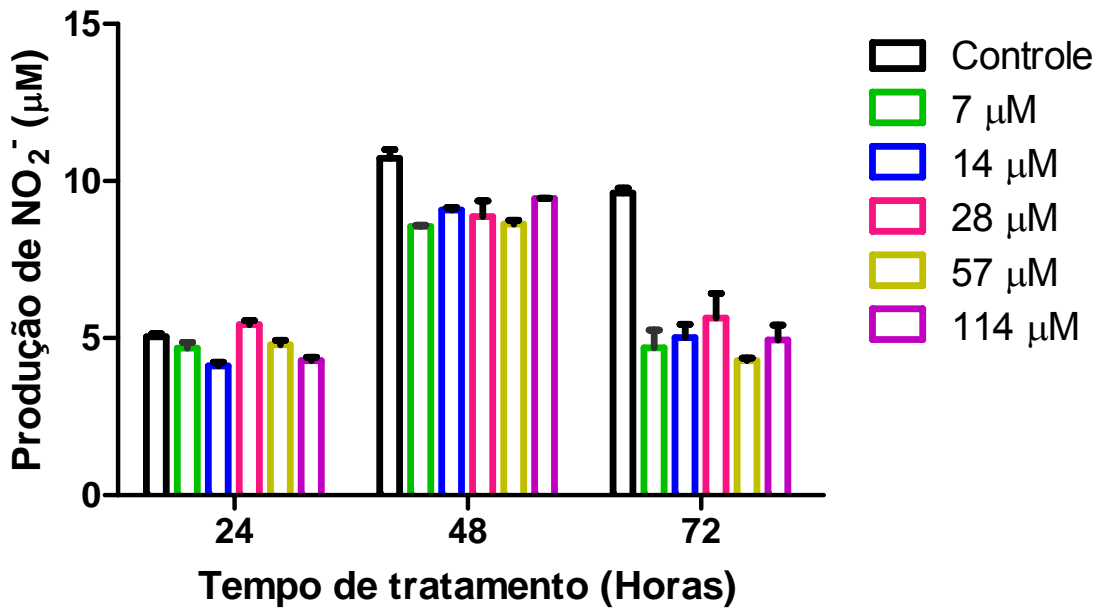


Figura 7: Produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24, 48 e 72 horas de incubação com BROMEC (A) e BROMER (B).

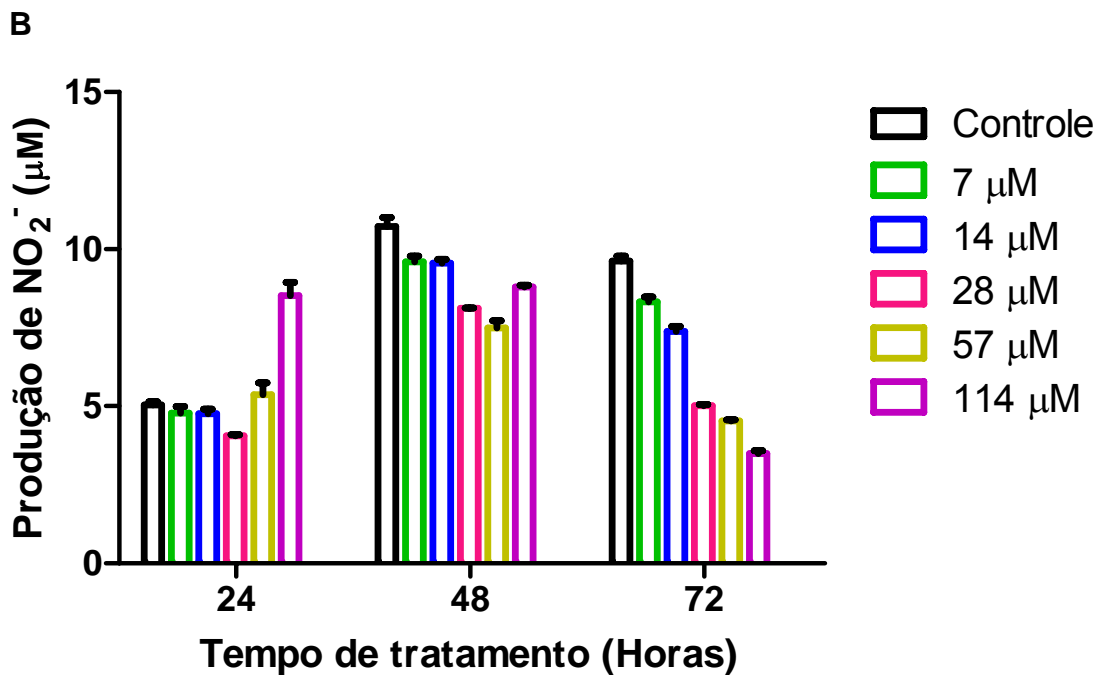
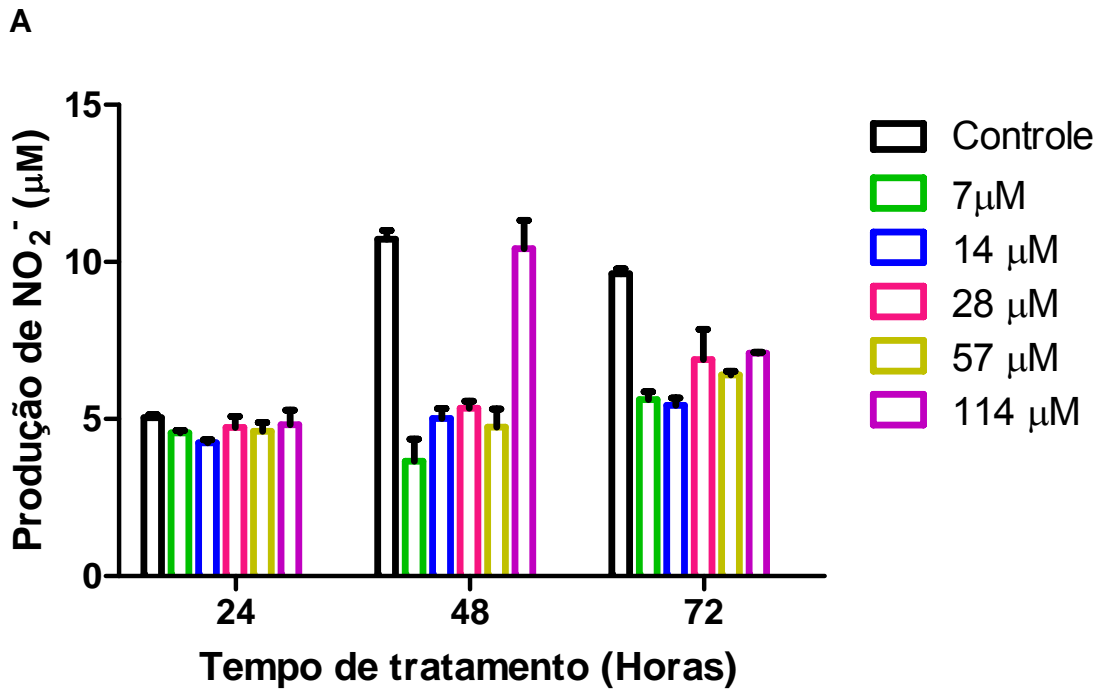


Figura 8: Produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* após 24, 48 e 72 horas de incubação com ART F (A) e ART S (B).

4.5. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. CHAGASI* TRATADAS COM OS DERIVADOS PURÍNICOS.

A avaliação da produção de NO pelos parasitos foi determinada pela dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas após concentrações e tempos variados de incubação com os derivados purínicos.

Como podemos observar nas Figuras 9 e 10, no período de 24 horas de tratamento das formas promastigotas de *L. chagasi* com os derivados purínicos não houve redução nem estímulo significativos na produção de NO. Em todos os tratamentos a produção de NO pelas formas promastigotas de *L. chagasi* foi de 10,7 – 10,9 μM com redução de 3 – 4% da produção de NO quando comparada as formas promastigotas não tratadas, exceto no tratamento com o derivado purínico BROMER no qual observa-se a produção de 11,5 μM de nitrito e aumento de 1,9% em comparação com o controle.

No entanto com 48 horas de tratamento, a inibição na produção de NO pelas promastigotas são semelhantes nas concentrações equivalentes dos diferentes derivados purínicos, com 11,1 – 11,8 μM de nitrito e redução de 12 – 17% dessa produção em relação ao controle (Figuras 9 e 10).

Em 72 horas de tratamento, a inibição da produção de NO pelas formas promastigotas também são proporcionais nas concentrações equivalentes, exceto pelo BROMER. Em todas as concentrações do tratamento utilizando BROMER observa-se uma redução da produção de NO pelas formas promastigotas de cerca de 15% da produção de NO (12,8 μM), sendo a menor porcentagem de inibição da produção de NO observada em todas as concentrações quando comparados aos demais derivados (Figuras 9 e 10). Nos demais derivados a produção de nitrito foi de 11,2 – 11,5 (redução de 22 – 24 % da produção de nitrito). O DMSO não interferiu na produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* (dados não mostrados).

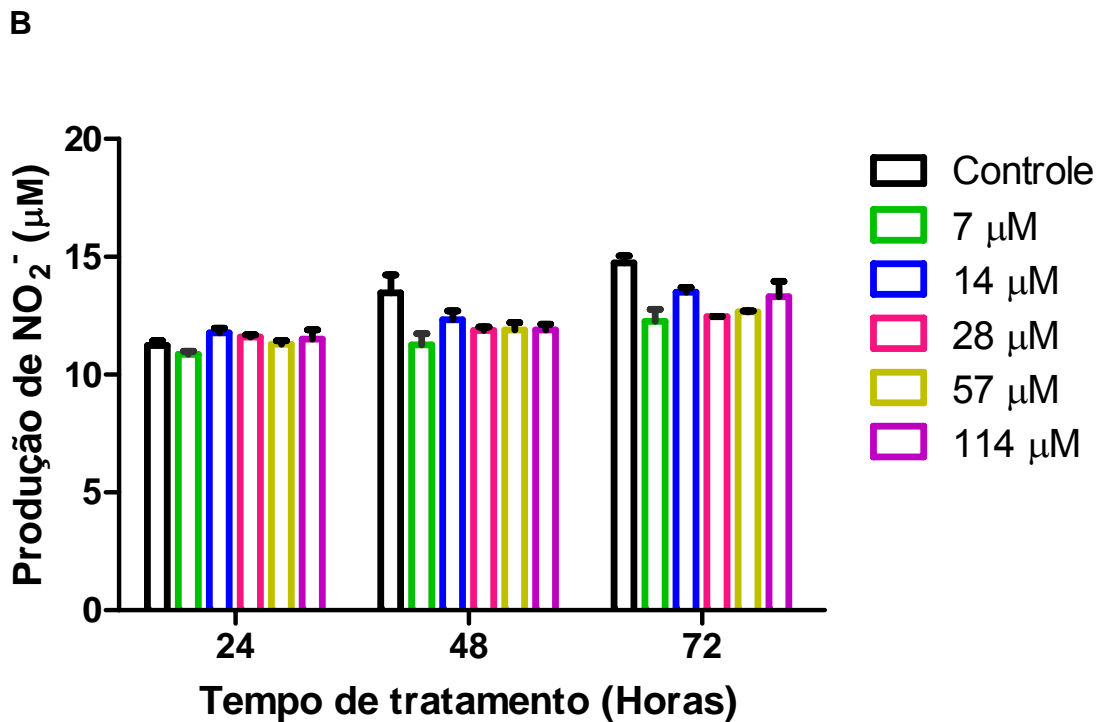
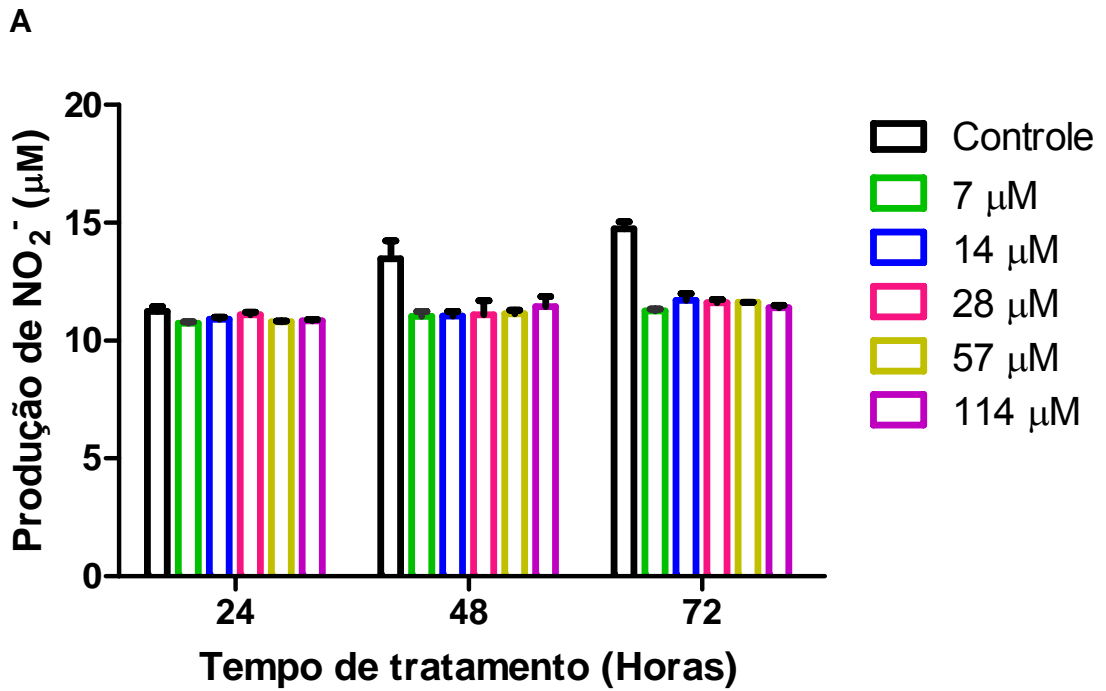


Figura 9: Produção de NO pelas formas promastigotas de *L. chagasi* após 24, 48 e 72 horas de incubação com BROMECA (A) e BROMER (B).

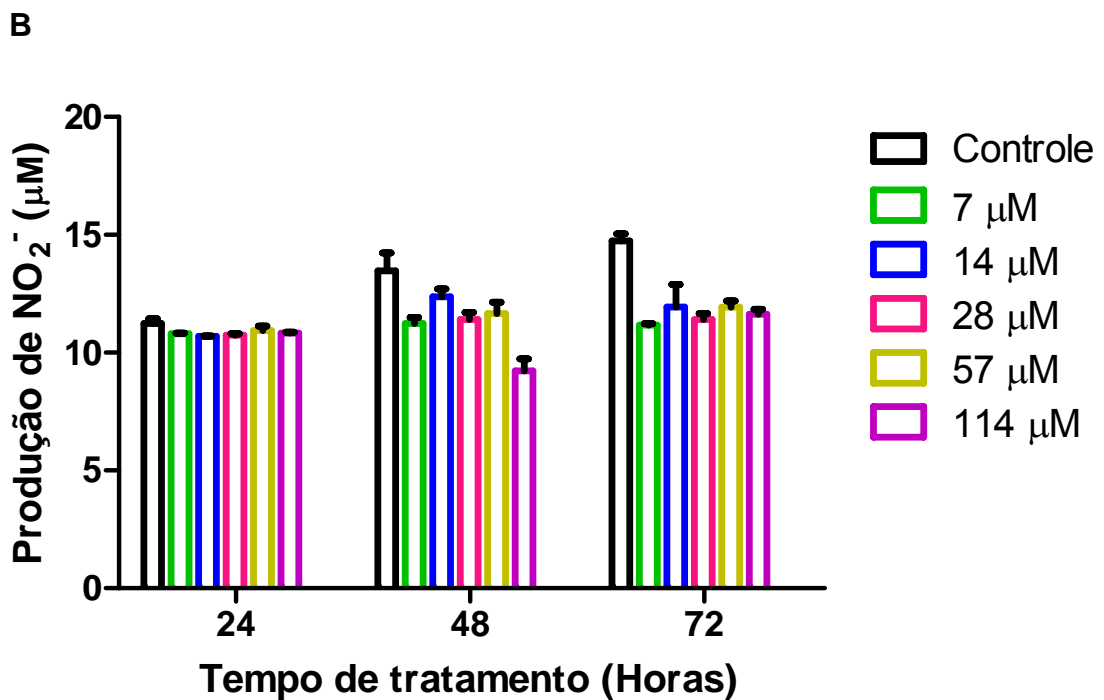
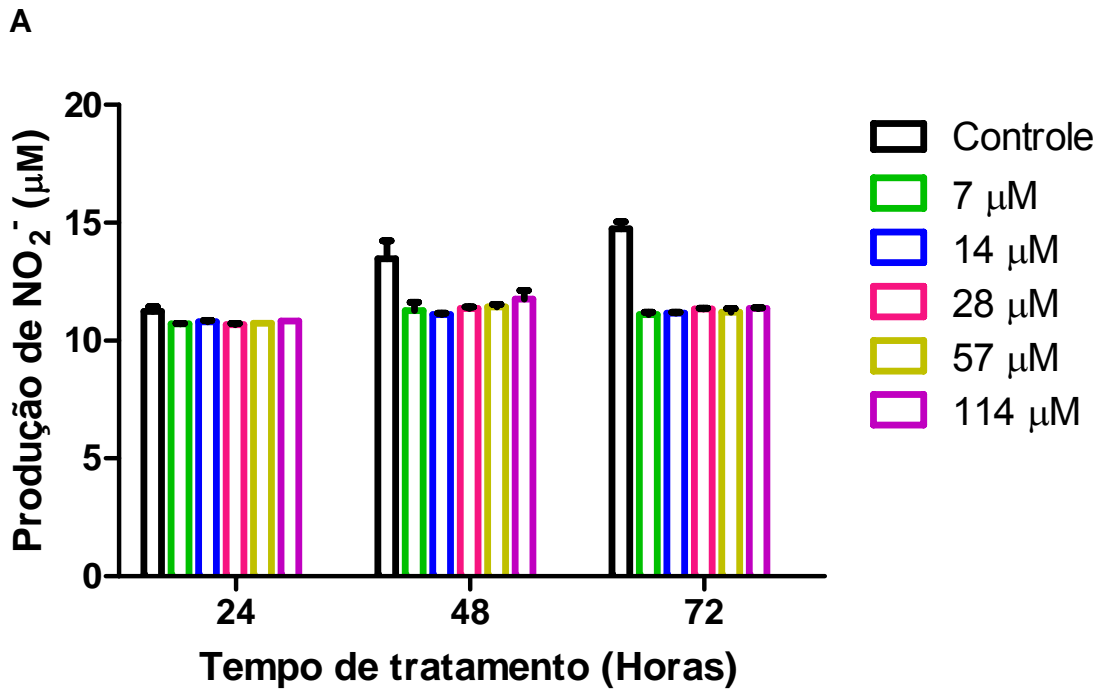


Figura 10: Produção de NO pelas formas promastigotas de *L. chagasi* após 24, 48 e 72 horas de incubação com ART F (A) e ART S (B).

4.6. PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELAS CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C PARASITADOS OU NÃO POR *L. AMAZONENSIS*.

A produção de NO pelas células J774A.1, macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c e essas células parasitadas por *L. amazonensis* foi determinada através da dosagem de nitrito no sobrenadante das culturas após concentrações e tempos variados de incubação com os derivados purínicos.

Como podemos observar na Figura 11 A, houve maior redução da produção de NO pelas células J774A.1 no tratamento com o derivado purínico BROMEC no período de 24 horas de tratamento com produção de 8,1 μM de nitrito para o tratamento à 50 μM e 7,8 μM para o tratamento à 100 μM com a redução da produção de NO de 17% e 19% quando comparado às células não tratadas. Já no período de 48 horas de tratamento a produção de nitrito foi de 11,14 μM e 10,7 μM à 50 e 100 μM com respectivamente, 1 e 5% de redução da produção de NO. Quando essas células J774A.1 estão parasitadas por *L. amazonensis*, esse derivado purínico não interfere de maneira significativa na produção de NO durante o período de 24 horas de tratamento, onde é possível observar produção de 8 μM de nitrito (redução de 3%) à 50 μM e 8,4 μM (aumento de 2,5%) à 100 μM . Porém no período de 48 horas não houve diferença nas duas concentrações analisadas (50 e 100 μM) com produção de nitrito de 10,7 μM e redução de 8% em comparação ao controle.

No período de 24 horas do tratamento com BROMER não houve diferença nas duas concentrações analisadas (39 e 78 μM), pois a produção de nitrito foi 7,8 μM e a redução foi de 19% em comparação ao controle. Porém no período de 48 horas de tratamento houve produção de nitrito, respectivamente de 10,6 μM e 10,3 μM e redução da produção de NO de 5,6 e 8,6% em comparação ao controle. Entretanto, quando as células J774A.1 estão parasitadas por *L. amazonensis*, esse derivado não interfere de maneira significativa na produção de NO durante ambos períodos de tratamento. Como pode ser observado na Figura 11 B, no período de 24 horas de tratamento, a produção de NO foi cerca de 8 μM e a redução foi de 5% para o tratamento à 39 μM , mas à 78 μM a produção de NO foi 8,5 μM (aumento de

3,5%) e à 48 horas, foi de 11,7 μM à 39 μM (aumento de 1%) e 11,4 μM à 78 μM (redução de 1,5%).

No período de 24 horas do tratamento das células J774A.1 com o derivado purínico ART S também não houve diferença nas duas concentrações analisadas (50 e 100 μM), pois a produção de nitrito foi de 8 μM e a redução foi de 18% em comparação ao controle. Já no período de 48 horas de tratamento houve diferença significativa quanto à produção de nitrito entre as concentrações analisadas. No tratamento utilizando o derivado purínico a 50 μM , a produção de NO foi de 11,4 μM (aumento de 1%) e a 100 μM , 8 μM (redução de 28% em comparação ao controle). Contudo quando as células J774A.1 estão parasitadas com a forma amastigota de *L. amazonensis*, esses derivados não interferem de maneira significativa na produção de NO no período de 24 horas de tratamento nas duas concentrações analisadas (produção de 8 e 8,3 μM no tratamento a 50 e 100 μM com a redução de 3% e aumento de 0,6%, respectivamente, quando comparados ao controle) e no período de 48 horas de tratamento, a produção de NO foi de 9 μM e 8 μM no tratamento a 50 e 100 μM com redução de 22 e 30%, respectivamente (Figura 11 C).

Como podemos observar na Figura 12, no tratamento dos macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c não parasitados e aqueles parasitados por amastigotas de *L. amazonensis* com os derivados purínicos houve redução da produção de NO, mas essa redução não difere muito entre às concentrações analisadas no tratamento nem entre os derivados purínicos testados. A redução da produção de NO é maior para os macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c não parasitados, sendo observada a produção de NO de 9,7 μM e redução de cerca de 10% da produção de NO quando comparada às células não tratadas, no período de 24 horas de tratamento e 9,6 μM (redução de 8%) no período de 48 de tratamento. Porém quando esses macrófagos estão parasitados essa produção de NO é cerca de 9,6 μM (redução de 7%) no período de 24 horas de tratamento e 9,7 μM (redução de 6,5%) no período de 48 horas de tratamento.

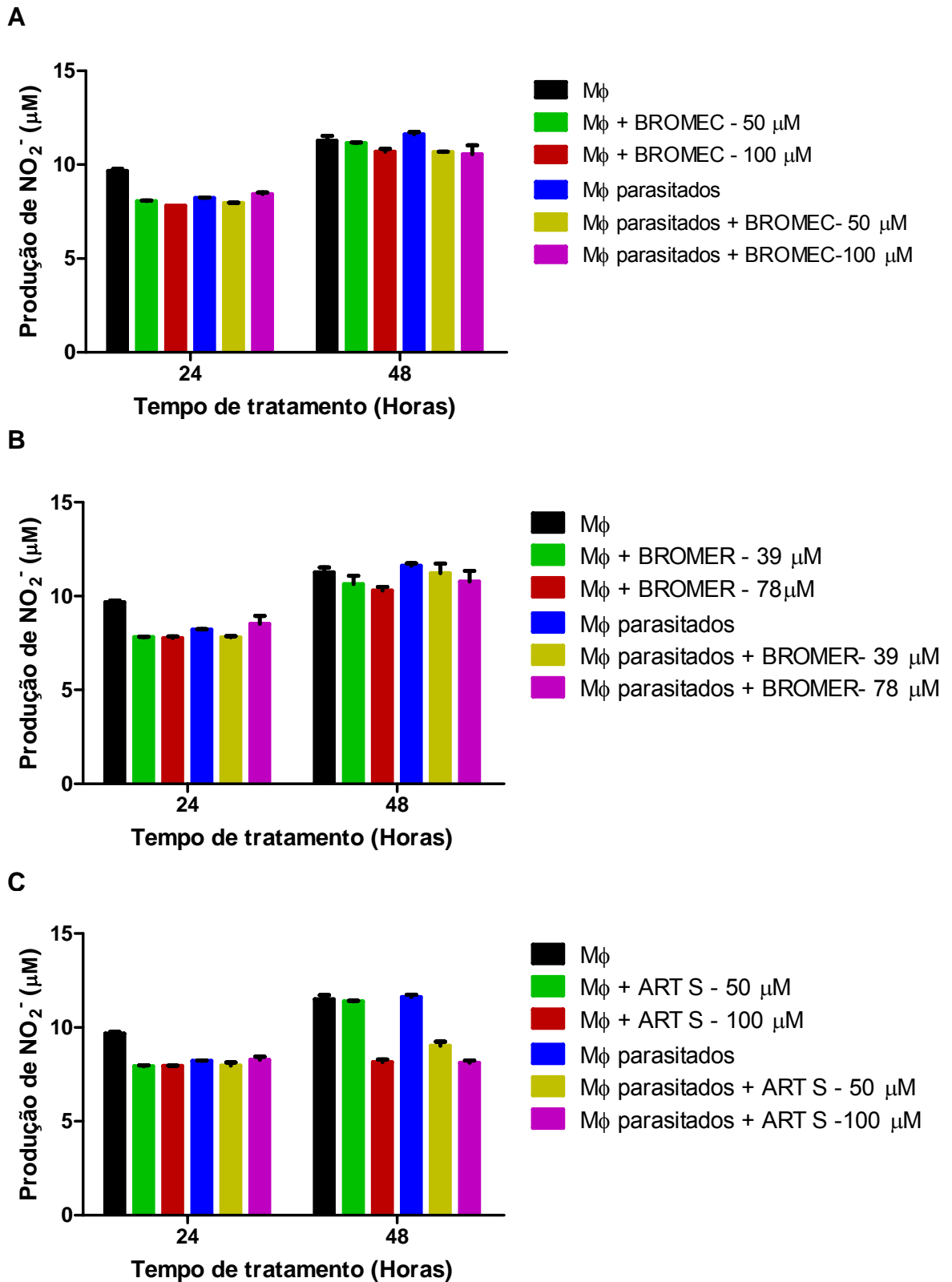


Figura 11: Produção de NO pelas células da linhagem J774A.1 e macrófagos parasitados por *L. amazonensis* após 24 e 48 de incubação com os seguintes derivados purínicos (DP) BROMECC (A), BROMER (B) e ART S (C).

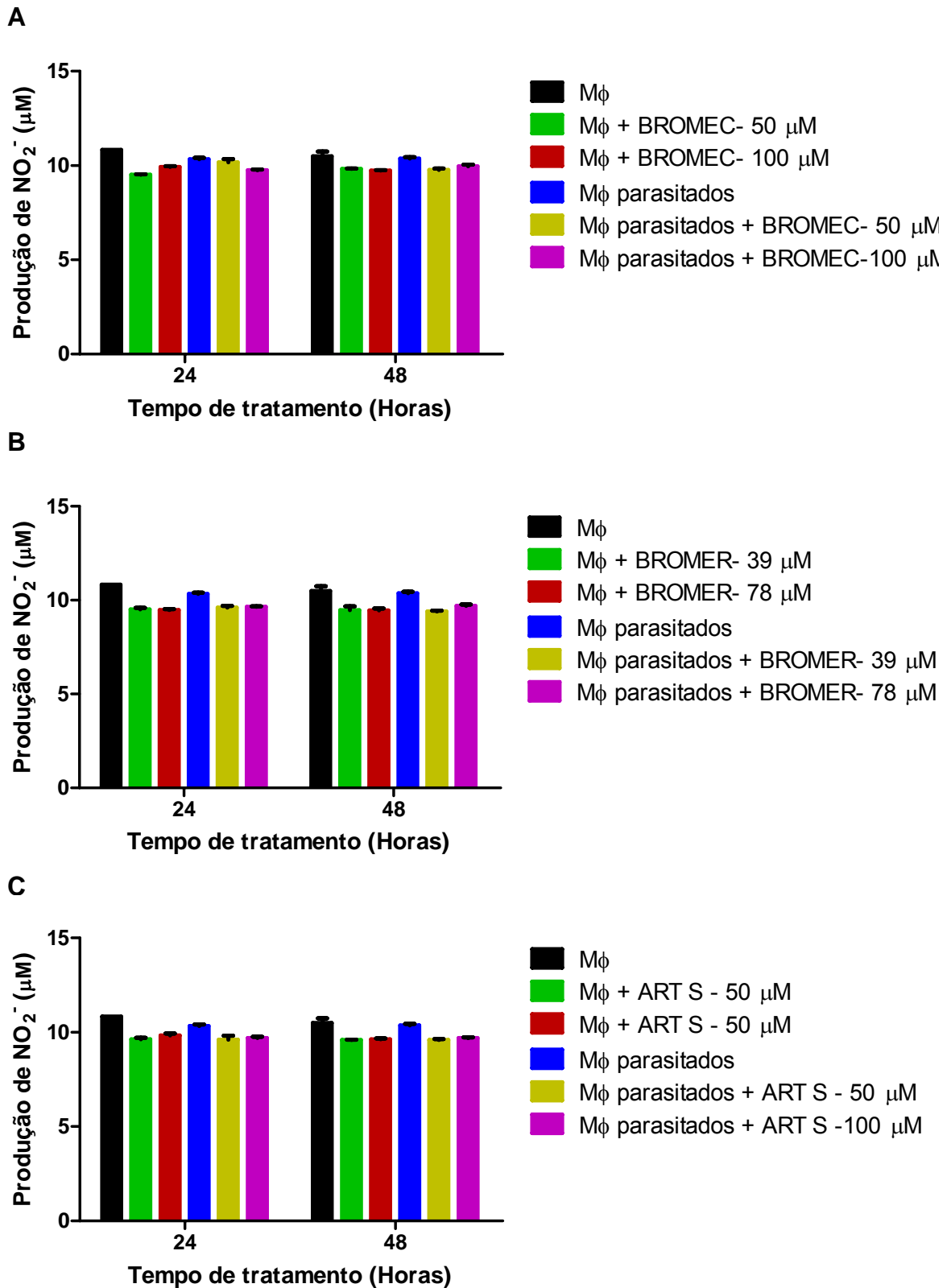


Figura 12: Produção de NO pelos macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c e macrófagos parasitados por *L. amazonensis* após 24 e 48 de incubação com os seguintes derivados purínicos (DP) BROMEC (A), BROMER (B) e ART S (C).

5 DISCUSSÃO

5.1. CITOTOXICIDADE DE NOVOS DERIVADOS DE PURINA EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* sp.

A quimioterapia ainda é o pilar para controlar a maioria das doenças parasitárias, principalmente quando não há vacinas disponíveis, como é o caso das leishmanioses (KOUNI, 2003). Entretanto, apesar da disponibilidade de tratamento para estas doenças, este é dificultado por vários fatores, os quais incluem: localização intramacrofágica da forma amastigota, contra-indicações aos medicamentos usados, respostas variáveis ao tratamento e desenvolvimento de resistência medicamentosa pelos parasitos (CARVALHO *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2005). Além disto, pacientes com leishmaniose apresentam deficiência imunológica e não são capazes de eliminar os parasitos através de mecanismos de defesa naturais, e este problema tem sido agravado pela evolução da SIDA devido a infecções paralelas em doentes com essa síndrome (CARVALHO *et al.*, 2000; ROCHA *et al.*, 2005).

Esses inconvenientes são graves e têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos para o tratamento das leishmanioses (OLLIARO, LAZDINS e GUHL, 2002; CROFT e COOMBS, 2003; KOUNI, 2003; GUPTA *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2005). Como o parasito do gênero *Leishmania* não pode fazer síntese *de novo* para a obtenção de purinas, análogos dessas moléculas constituem excelentes alvos quimioterápicos. Assim, o presente trabalho analisou novos derivados purínicos em *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Em investigação inicial, analisamos, *in vitro*, a citotoxicidade de derivados purínicos para formas promastigotas de *Leishmania*, uma vez que estas formas são mais facilmente cultiváveis. Os testes foram realizados em duas espécies de *Leishmania* e baseado no fato destas promoverem manifestações clínicas diferentes, *L. amazonensis* que tem sido associada, principalmente, as manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar e *L. chagasi* que tem sido

classicamente associada à leishmaniose visceral, era de se esperar diferenças quanto à sensibilidade dos parasitos frente às moléculas testadas (GRIMALDI e TESH, 1993). Como pode ser verificada na Tabela 1, essa diferença foi observada e as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis que as promastigotas de *L. chagasi*.

Dentre os 13 derivados purínicos testados, quatro mostraram efeito antiparasitário contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Somente um, ART F, apresentou atividade leishmanicida contra ambas espécies de *Leishmania* testadas e, vale a pena ressaltar, com a mesma concentração inibitória (IC₅₀ de 28 µM). É interessante, ainda ressaltar, que este derivado purínico apresentou a melhor atividade leishmanicida, entretanto não conseguimos estabelecer relação estrutura-atividade entre os derivados purínicos testados. Diferenças de sensibilidade de compostos a várias espécies de *Leishmania* têm sido relatadas na literatura (ESCOBAR *et al.*, 2002; ALVES *et al.*, 2003; ROBERT *et al.*, 2003; MACHARIA *et al.*, 2004; SERENO *et al.*, 2007).

Escobar e colaboradores (2002), por exemplo, demonstraram diferenças de sensibilidade analisando miltefosina, primeira droga oral no tratamento das leishmanioses, edelfosina e anfotericina B em diferentes espécies de *Leishmania*. Os autores observaram que as formas promastigotas e amastigotas de *L. panamensis*, *L. mexicana* e *L. major* possuem menor sensibilidade à miltefosina 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.

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).

A citotoxicidade em formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi também avaliada para a *L. amazonensis*, mas somente nos derivados purínicos que apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas dessa espécie (BROMEC, BROMER, ART F, ART S), uma vez que os testes em formas amastigotas apresentam maior dificuldade na execução. As concentrações das moléculas utilizadas como parâmetros para as avaliações nos testes anti-

amastigotas foram o valor do IC₅₀ e duas vezes esse valor para a forma promastigota de *L. amazonensis*.

Os derivados purínicos ART S e BROMEAC apresentaram o maior valor de IC₅₀ para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (IC₅₀ de 50 µM), mas em relação ao teste anti-amastigota, ART S foi o derivado purínico que apresentou a menor atividade leishmanicida na concentração correspondente ao valor do IC₅₀ para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (Figura 5D e Tabela 2) e a atividade anti-amastigota de BROMEAC foi reduzida à metade do seu valor com a cinética de tempo em ambas concentrações testadas (Figura 5A e Tabela 2). O derivado purínico ART F foi a única molécula testada que apresentou atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de ambas espécies estudadas. Porém quando analisada sua atividade anti-amastigota para *L. amazonensis*, esse derivado purínico foi promissor em 24 horas de tratamento, mas sua atividade reduziu-se à metade do valor com a cinética de tempo em ambas concentrações testadas (Figura 5C e Tabela 2).

Dentre os quatro derivados purínicos analisados contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, BROMER foi o derivado que apresentou melhor atividade anti-amastigota em todos os períodos de tratamento, limitando a multiplicação do parasito (Figura 5B e Tabela 2).

Essas análises da atividade anti-amastigotas foram avaliadas somente até o período de 48 horas de tratamento, pois após esse período as células da linhagem J774A.1 replicam-se, impossibilitando uma avaliação correta sobre o efeito das moléculas utilizadas no tratamento (Murray, 1981).

Neste presente trabalho observamos diferenças de sensibilidade não somente entre as espécies analisadas, mas também entre as formas evolutivas da mesma espécie. Essas variações de sensibilidade podem ser devido à diferenças na taxa de divisão, ou exposição às moléculas analisadas dos estágios intra e extracelular, ou os alvos bioquímicos, ou ao metabolismo das moléculas ou à composição bioquímica de cada espécie.

Sabe-se que o primeiro passo para a aquisição de purinas pelo parasito envolve a translocação de purinas do hospedeiro através de toda a superfície da membrana do parasito, um processo que é mediado por transportadores de nucleosídeos e nucleobases. Assim, é interessante ressaltar que já estão descritos transportadores de purinas tanto para a forma promastigota quanto para a forma

amastigota de *L. donovani*, *L. major* e em amastigotas de *L. mexicana* (GHOSH e MUKHERJEE, 2000; CARTER, LANDFEAR e ULLMAN, 2001; KOUNI, 2003; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005; LIU *et al.*, 2006). As formas promastigotas de *Leishmania* possuem três loci diferentes para o transporte de purina: para inosina, hipoxantina/adenina e para adenosina (GHOSH e MUKHERJEE, 2000; KONING, BRIDGES e BURCHMORE, 2005).

Análises posteriores sobre o mecanismo de ação das purinas fazem parte de projetos futuros em nosso laboratório e uma das abordagens poderia ser sobre a atividade da Adenonina quinase, visto que durante a transformação do estágio extracelular para o estágio intracelular no ciclo biológico da *Leishmania*, a atividade de diversas proteínas são alteradas e uma dessas proteínas é a Adenosina quinase que possui sua atividade aumentada em amastigotas.

A adenosina quinase (AdK) possui a habilidade de fosforilar diversos análogos farmacologicamente ativos de nucleosídeos, sendo estrategicamente considerada importante na quimioterapia, uma vez que é uma das enzimas envolvidas na rota de captura de purinas (GHOSH e MUKHERJEE, 2000; KOUNI, 2003; SEN *et al.*, 2007). Estudos metabólicos e de estrutura/atividade realizados com *Toxoplasma gondii* e células mamíferas mostram que há diferenças entre a adenosina quinase desse parasito e as células mamíferas, o que encoraja o desenvolvimento de substratos subversivos ideais com a enzima desse parasito e de outros patógenos, pois estudos comparativos sobre a adenosina quinase de mamíferos e *L. donovani* também têm demonstrado que a enzima do parasito exibe cinética, reconhecimento de substrato e propriedades imunológicas únicos (KOUNI, 2003).

O gênero *Leishmania* possui também fosfotransferases de nucleosídeos de purina que são enzimas que fosforilam os nucleosídeos de purina e requerem para esta reação ester fosfato de alta energia (ATP). Esses são convertidos em trifosfatos e incorporados nos ácidos nucléicos da *Leishmania* ou atuam como inibidores de outras enzimas importantes no processo de salvar purinas, levando, seletivamente, à morte do parasito (KOUNI, 2003).

Nossos resultados demonstrando a atividade de análogos de purinas tanto em formas promastigotas quanto em amastigotas de *Leishmania* estimulam futuros estudos *in vivo*.

5.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS* E *L. CHAGASI* E CÉLULAS DA LINHAGEM J774A.1 E MACRÓFAGOS INFLAMATÓRIOS DE CAMUNDONGOS BALB/C PARASITADOS OU NÃO POR *L. AMAZONENSIS*.

Na tentativa de explorar o mecanismo pelo qual os derivados purínicos apresentaram atividade anti-*Leishmania*, resolvemos analisar a produção de óxido nítrico (NO). Esta é uma molécula extremamente importante na atividade imunológica contra patógenos, que inclui a participação dos macrófagos que os eliminam através da fagocitose e posterior geração de produtos reativos do nitrogênio como o óxido nítrico (NO). O termo NO é geralmente empregado para definir todos os intermediários reativos do nitrogênio tais como NO, NO⁻, NO⁺, NO₂, NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O₃, N₂O₄, NO₂, os S-nitrosotióis (S-NO), peroxinitrito (ONOO⁻) e os complexos nitrosil-metálicos (WALLACE, 2005; NAPOLITANO *et al*, 2005).

O NO é o produto da ação das óxido nítrico sintases (NOS, “Nitric Oxide Synthases”) em vários tecidos, durante a transformação catalítica do aminoácido L-arginina em L-citrulina (WALLACE, 2005). Existem descritas três isoformas das NOS: a isoforma constitutiva (cNOS) expressada pelas isoformas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS), que são expressas continuamente em neurônios e endotélio e a NOS induzida (iNOS), que é expressa em tecido vascular, células da musculatura lisa, neutrófilos, hepatócitos e macrófagos nas formas citosólicas e associada à membrana (NAPOLITANO *et al*, 2005). As três isoformas parecem desempenhar um papel importante na resposta imunitária (WALLACE, 2005; NAPOLITANO *et al*, 2005)

A observação de que promastigotas de *Leishmania* produzem NO é recente e nosso estudo confirma estes dados, visto que verificamos que promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* produzem NO. Genestra e colaboradores (2003a; b; 2006a; b) demonstraram a produção de NO em promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, sendo que nesta última forma evolutiva a produção é mais elevada, mas em ambas formas a produção de NO é de maneira constitutiva, relacionando assim com a expressão de cNOS. Além disto, eles sugerem que a produção de NO por esses parasitos pode

modular a atividade da iNOS dos macrófagos, uma vez que o sistema do percurso do NO encontrado em *L. amazonensis* parece ser semelhante aos dos mamíferos. Esses autores também sugerem que a produção de NO pelas formas promastigotas de *L. amazonensis* está associada à infectividade desses parasitos, pois promastigotas infectivas produziram 2-3 vezes mais NO do que as formas promastigotas não infectivas e que essa síntese de NO também pode estar ligada à interiorização dos parasitos nos macrófagos.

Quando analisamos o efeito do tratamento de derivados purínicos sobre promastigotas de *Leishmania*, verificamos que as espécies demonstram sensibilidades diferentes aos análogos e que, em geral, apesar de ter ocorrido redução na produção de NO para ambas, esta foi mais significativa em *L. amazonensis* após 48 e 72 horas de tratamento.

Genestra e colaboradores (2003c) demonstraram que promastigotas de *L. amazonensis* pré-tratadas com L-NAME, inibidor da cNOS, diminuem a produção de NO, com conseqüente diminuição de parasitos intracelulares, além de induzir alterações morfológicas do parasito. Assim, eles sugerem que a inibição do NO do parasito altera características bioquímicas e estruturais, sendo importante na modulação do estabelecimento da infecção. Estudos com formas promastigotas infectivas tratadas com derivados purínicos e/ou inibidores da NOS podem ser interessantes alvos para futuras investigações, esclarecendo o papel destas moléculas na imunomodulação das leishmanioses.

Posteriormente, resolvemos avaliar o tratamento de derivados de purinas em células J774A.1, macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c e nessas células parasitadas por *L. amazonensis*. Nós verificamos que ocorre redução na produção de NO pelas células J774A.1 e macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c não infectados quando em interação com os derivados purínicos e isto é mais significativo nas duas concentrações analisadas no período de 24 horas de tratamento. Entretanto, quando essas células estão parasitadas por *L. amazonensis*, esses derivados não interferem, de maneira significativa, na produção de NO. Esses dados sugerem que o mecanismo de ação dos derivados purínicos sobre a atividade anti-amastigota de *Leishmania* observada em nosso trabalho não deve ser sobre a ativação de funções microbicidas dos macrófagos via produção de NO.

Muitos resultados de infecções leishmanióticas tem sido associadas com expansão das populações de linfócitos T helper e o controle imunológico das

leishmanioses envolve a resposta Th1, levando a ativação dos macrófagos e eliminação do parasito intracelular através da indução da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e da síntese de NO através da L-arginina pela iNOS (EVANS *et al.*, 1993; MOSSALAYI *et al.*, 1999). Essa eliminação da *Leishmania* associada à produção de NO foi evidenciada na leishmaniose humana, murina e canina (EVANS *et al.*, 1993; MOSSALAYI *et al.*, 1999). O efeito leishmanicida do NO parece ser uma consequência da indução do processo de morte programada (apoptose), pois as amastigotas axênicas e intracelulares de *L. amazonensis* quando submetidas à ação do NO cometem suicídio celular pelos percursos referidos como apoptose celular (HOLZMULLER *et al.*, 2002).

Liew, Wei e Proudfoot (1997) observaram que a *Leishmania* pode inibir diretamente a síntese de NO pelos macrófagos e bloquear o desenvolvimento das células Th1 via inibição da síntese de IL-12. Os fosfolipídios glicoinositol e as liposfosfoglicanas da *Leishmania* inibem a produção da IL-12 e como esta é essencial para a ativação de linfócitos T e subsequente secreção de IFN- γ , não há ativação de macrófagos e nem produção de NO e desta forma, o parasito consegue sobreviver dentro dos seus hospedeiros. Contudo pouco se conhece sobre os mecanismos subjacentes dessa inibição ou modulação. Balestieri e colaboradores (2002) observaram que o aumento no número de parasitos dentro do fagolisossomo diminui a regulação da produção de NO pela iNOS e que as lipofosfoglicanas associadas a uma proteína-11 de membrana Kinetoplastida inibem essa produção de NO porque ela é um inibidor e compete com a L-arginina.

É interessante ainda ressaltar que BROMER foi o derivado purínico que obteve a menor taxa de redução de NO nas células J774A.1 parasitadas em 48 horas de tratamento (1,5% - 11,44 μ M) e, em 24 horas de tratamento promoveu até um pequeno aumento de 3,5% (8,5 μ M) na concentração de 78 μ M, sendo também o derivado purínico que obteve a melhor atividade anti-amastigota, o que sustenta nossa sugestão de que os derivados purínicos analisados possuem mecanismo de ação anti-amastigota independente da "via NO". Provavelmente esse derivado atuou sobre o parasito e dessa forma a produção de NO do hospedeiro não foi prejudicada, podendo este assumir a sua função. Posteriores trabalhos serão realizados para melhor entendimento do papel do NO no processo de interação *Leishmania*-macrófagos.

Como podemos observar nas Tabelas 1 a 3, os derivados purínicos analisados neste trabalho possuem efeito leishmanicida, mas não são significativamente tóxicos para as células J774A.1 e nem para os macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c. Muitos análogos de purinas estudados demonstraram excelente efeito antiparasitário, mas também mostraram severa toxicidade aos seus hospedeiros (KOUNI, 2003).

Finalizando, os parasitos têm elaborado várias estratégias para escapar do sistema de defesa e obterem vantagem dos fatores bioquímicos dos hospedeiros (Genestra *et al.*, 2006a; b). Os mecanismos pelos quais as moléculas de NO matam a *Leishmania* ou como o NO do parasito modula a resposta durante a infecção não são totalmente compreendidos (CHAN, ADAPALA e FONG, 2005; GENESTRA *et al.*, 2003a), mas devem ser estudados para ajudar a elucidar importantes informações sobre a biologia e bioquímica desses parasitos que auxiliarão na abordagem de novos alvos imunológicos e quimioterápicos para as leishmanioses.

6 CONCLUSÕES

- 6.1. Dentre os 13 derivados purínicos analisados, somente quatro apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*: BROMEC; BROMER; ART F e ART S. Entretanto, não foi possível estabelecer relação estrutura-atividade.
- 6.2. Apenas um derivado purínico apresentou atividade contra as formas promastigotas de *L. chagasi*, ART F, o que demonstra diferenças de sensibilidade entre as espécies analisadas.
- 6.3. Os derivados purínicos que apresentaram atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* (BROMEC, BROMER, ART F, ART S) foram também avaliados e apenas os três primeiros apresentaram atividade contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, sugerindo diferenças de sensibilidade entre as formas evolutivas da mesma espécie.
- 6.4. Os derivados purínicos analisados reduzem a produção de NO em promastigotas de *Leishmania* e em macrófagos, mas no processo de interação não houve redução da produção de NO. Estes dados sugerem que o mecanismo de ação dos derivados purínicos sobre a atividade anti-amastigota de *Leishmania* observada em nosso trabalho não deve ser sobre a ativação de funções microbicidas dos macrófagos via produção de NO.
- 6.5. Os derivados purínicos não possuem efeito significativamente citotóxicos para as células J774A.1 e nem para os macrófagos inflamatórios de camundongos Balb/c.
- 6.6. Esta dissertação confirma o efeito *in vitro* dos derivados purínicos em *Leishmania* abrindo perspectivas para novos estudos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, E.M.; CRUZ-SALDARRIAGA, M.; LLANOS-CUENTAS, A.; LUZ-CJUNO, M.; ECHEVARRIA, J.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; COLINA, O.; BERMAN, J.D. 2005. Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72: 133-137.

ALEXANDER, J.; BRYSON, K. 2005. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, 99:17–23.

AL-SAFARJALANI, O.N.; NAGUIB, F.N.M; KOUNI, M.H. 2003. Uptake of nitrobenzylthioinosine and purine beta-L-nucleosides by intracellular *Toxoplasma gondii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47 (10): 3247-51.

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

AREVALO, I.; WARD, B.; MILLER, R.; MENG, T.Z.; NAJAR, E.; ALVAREZ, E.; METLASHEWSK, G.; LLANOS-CUENTAS, A. 2001. Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. **Clinical Infectious Disease**, 33: 1847-1851.

ARRUDA, C.C.P. 2004. **Indução de resistência à infecção por *L. amazonensis* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) no modelo murino por formas atenuadas do parasito**. Tese de Doutorado, Fiocruz, Rio de Janeiro.141p.

ASHFORD, R.W.; BATES, P.A. 1998. **Leishmaniasis on the old World**. In: FEG Cox, JP Kreier and D Wakelin (eds). Microbiology and Microbial infection. Oxford University Press, New York. pp. 215.

ASHFORD, R.W. 2000. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, 30 1269–1281.

BADARO, R; JONES, TC; CARVALHO, EM; SAMPAIO, D; REED, SG; BARRAL, A; TEIXEIRA, R; JOHNSON, WDJr. 1986. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, 154: 1003-1011.

BADARO, R.; FALCOFF, E.; BADARO, F.S.; CARVALHO, E.M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL, A. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **The New England Journal of Medicine**, 322:16–21.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. 2007. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, 25: 203–211.

BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R.M.; CÚBRIA, J.C.; ORDÓÑEZ, D. 1998. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, 30(4): 435-443.

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

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. 2004. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 7(3) 328-337.

BATES, P.A.; ROBERTSON, C.D.; TETJEY L.; COOMBS, G.H. 1992. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. **Parasitology**, 105:193-202.

BATES, P.A. 2007. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, 37: 1097–1106.

BERMAN, J.D. 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Disease**, 24: 684–703.

[BHATTACHARYA, S.K.](#); [SINHA, P.K.](#); [SUNDAR, S.](#); [THAKUR, C.P.](#); [JHA, T.K.](#); [PANDEY, K.](#); [DAS V.R.](#); [KUMAR, N.](#); [LAL, C.](#); [VERMA, N.](#); [SINGH, V.P.](#); [RANJAN, A.](#); [VERMA, R.B.](#); [ANDERS, G.](#); [SINDERMANN, H.](#); [GANGULY, N.K.](#) 2007. Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. **The Journal Infectious Disease**, 196(4): 591-8.

BITTENCOURT, A; NANCY SILVA, A S; NUNES, V L C; FOLLADOR, I; BADARÓ, R. 2002. Post-kala-azar Dermal Leishmaniasis associated with AIDS. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 7(3):229-233.

BRANDÃO-FILHO, S.; SHAW, J. 1994. Leishmaniasis in Brazil. **Parasitology Today**. 10 (9): 329-330.

BRUSTOLONI, Y.M.; CUNHA, R.V.; DORVAL, M.E.; OSHIRO, E.T.; PONTES, E.R.J.C.; OLIVEIRA, A.L.L.; HILLEBRAND, L.; RIBEIRO, L.F. 2007. Comparison of Conventional Methods for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Children of the Center-West Region of Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 11(1): 106-109.

CARTER, N. S.; LANDFEAR, S.M.; ULLMAN, B. 2001. Nucleoside transporters of parasitic Protozoa. **TRENDS in Parasitology**, 17 (3): 142-145.

CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. 2000. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, 36 (supl 1): 69-96.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. 2001. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia**, 72: 599-618.

CDC. Life Cycle. Disponível em: http://www.dpd.cdc.gov/dx dx/HTML/Frames/G-L/Leishmaniasis/body_Leishmaniasis_page1.htm.

CHAN, M.M.; ADAPALA, N.S.; FONG, D. 2005. Curcumin overcomes the inhibitory effect of nitric oxide on *Leishmania*. **Parasitology Research**, 96: 49-56.

CHANG, K.P.; CHAUDHURI, G.; FONG, D. 1990. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annual Review of Microbiology**, 44: 499-529.

COLER, R.N.; REED, S. G. 2005. Second-generation vaccines against Leishmaniasis. **TRENDS in Parasitology**, 215: 244-249.

COX, FEG. 1998. **Classification of the Parasitic Protozoa**. In: FEG Cox, JP Kreier and D Wakelin (eds) Microbiology and Microbial infection. Oxford University Press, New York. pp. 141.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. 2003. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, 19 (18): 502-508.

CROFT, S.L.; ENGEL, J. 2006. Mitelfosine – discovery of the antileishmanial activity of phospholipids derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100S: S4-S8.

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

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

CRUZ, I.; NIETO, J.; MORENO, J.; CAÑAVATE, C.; DESJEUX, P.; ALVAR, J. 2006. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. **The Indian Journal of Medical Research**, 123: 357-388.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI, G. JR. 2000. A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Parasitology Today**, 16: 142–144.

DEA-AYUELA, M.A.; RAMA-ÍÑIGUEZ, S.; SÁNCHEZ-BRUNETE, J.A.; TORRADO, J.J.; ALUNDA, J.M.; BOLÁS-FERNÁNDEZ. 2004. Antileishmanial activity of a new formulation of amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health**, 9 (9): 981-990.

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

DESJEUX, P. 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 95: 239-243.

DONKOR, I.O.; ASSEFA, H.; RATTENDI, D.; LANNE, S.; VARGAS, M.; GOLDBERG, B.; BACCHI, C. 2001. Trypanocidal activity of dicationic compounds related to pentamidine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 36: 531-538.

DUBE, A.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; SINGH, N. 2005. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in vitro and in vivo experimental models. **Parasitology Research**, 96(4): 216-223.

DUEÑAS-ROMERO, A.M.; LOISEAU, P.M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. 2007. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. **Biochimica and Biophysica Acta**, 1768: 246–252.

EL-ON, J.; BAZARSKY, E.; SNEIR, R. 2007. *Leishmania major*. *In vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity of paromomycin ointment (Leshcutan) combined with the immunomodulator Imiquimod. **Experimental Parasitology**, 116: 156–162.

ESCOBAR, P.; SANGEETA, M.; MARQUES, C.; CROFT, S. 2002. Sensitivities *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃ (edelfosina) and amphotericin B. **Acta Tropica**, 81: 151-157.

ESFANDIARPOUR, I.; DABIRI, S.H. 2007. Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histological study. **International Journal of Dermatology**, 46: 848–852.

EVANS, T.G.; THAI, L.; GRANGER, D.; HIBBS JR., J.B. 1993. Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, 151 (2): 907-915.

FAURATY-GAMBARELLI, F.; PIARROUX, R.; DENIAU, M.; GIUSIANO, B.; MARTY, P.; MICHAEL, G.; FAUGERE, B.; DUMON, H. 1997. *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 41: 827-830.

GELB, M.H.; HOL, W.G.J. 2002. Drugs to combat tropical protozoan parasites. **Science**, 297: 343-344.

GENARO, O.; DE TOLEDO, V.P.C.P.; DA COSTA, C.A.; HERMETO, M.V.; AFONSO, L.C.C.; MAYRINK, W. 1996. Vaccine for prophylaxis and immunotherapy, Brazil. **Clinics in Dermatology**, 14: 503-512.

GENESTRA, M.; ECHEVARRIA, A.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; VIGNÓLIO-ALVES, L.; LEON, L.L. 2003a. Effect of amidine derivatives on nitric oxide production by *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Nitric Oxide**, 8: 1–6.

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

GENESTRA, M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; GUEDES-SILVA, D.; LEON, L.L. 2003c. Effect of L-arginine analogs and a calcium chelator on Nitric Oxide (NO) production by *Leishmania* sp. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 18 (5): 445–452.

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

GENESTRA, M.; GUEDES-SILVA, D.; SOUZA, W.J.S.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; SOARES-BEZERRA, R.J.; MONTEIRO, F.P.; LEON, L.L. 2006b. Nitric Oxide Synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Archives of Medical Research**, 37: 328–333.

GHOSH, M.; MUKHERJEE, T. 2000. Stage-specific development of a novel adenosine transporter in *Leishmania donovani* amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 108: 93–99.

GONTIJO, C.M.; SILVA, E.S.; FUCCIO, M.B.; SOUSA, M.C.; PACHECO, R.S.; DIAS, E.S.; ANDRADE FILHO, J.D.; BRAZIL, R.P.; MELO, M.N.; 2002. Epidemiological studies of an outbreak of cutaneous leishmaniasis in the Rio Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. **Acta Tropica**, 81(2): 143-150.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, 33: 1027-1034.

GRADONI, L. 2001. An update on antileishmanial vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, 100: 87-103.

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

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

GUPTA, S.; RAMESH; SHARMA, S.C.; SRIVASTAVA, V.M.L. 2005. Efficacy of picroliv in combination with miltefosine, an orally effective antileishmanial drug against experimental visceral leishmaniasis. **Acta Tropica**, 9: 41–47.

GUPTE, A.; BUOLAMWINI, J.K. 2007. Novel C2-purine position analogs of nitrobenzylmercaptapurine riboside as human equilibrative nucleoside transporter 1 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15: 7726–7737.

HANDMAN, E. 2001a. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clinical Microbiology Review**, 14: 229-243.

HANDMAN, E. 2001b. Protective saliva: a novel approach to a *Leishmania* vaccine. **TRENDS in Parasitology**, 17(11): 513-514.

HERWALDT, B.L. 1999. Leishmaniasis. **Lancet**, 354: 1191-1199.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; MANGOT, I.; DAULOUÈDE, S.; VINCENDEAU, P.; LEMESRE, J. 2002. Nitric Oxide-mediated proteasome-dependent oligonucleosomal DNA fragmentation in *Leishmania amazonensis* amastigotes. **Infection and Immunity**, 70 (7): 3727–3735.

HOLZER, T.R.; MACMASTER, W.R.; FORNEY, J.D. Expression profiling by whole-genome interspecies microarray hybridization reveals differential gene expression in procyclic promastigotes, lesion-derived amastigotes, and axenic amastigotes in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [146 \(2\)](#): 198-218.

HORTA, M.F. 1997. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasite. **TRENDS in Microbiology**, 9: 363-365.

IRAJI, F.; SADEGHINIA, A. 2005. Efficacy of paramomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: result of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 99 (1): 3-9.

JEBBARI, H.; DAVIDSON, R. 1998. Recent advances in leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Disease**, 11:535-539.

JERONIMO, S.M.B.; PEARSON, R.D. 1992. **The *Leishmania*. Protozoans adapted for extracellular and intracellular survival**. In: JL Ávila and JR Harris (eds). Subcellular Biochemistry. Plenum Press, New York and London, pp1.

JHA, T.K. 1983. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 77: 167– 70.

KAFETZIS, D.A.; VELISSARIOU, I.M; STABOULI, S.; MAVRIKOU, M.; DELIS, D.; LIAPI, G. 2005. Treatment of pediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 25: 26-30.

KAMHAWI, S. 2006. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **TRENDS in Parasitology**, 22(9): 439- 445.

KAYSER, O.; OLBRICH, C.; YARDLEY, V.; KIDERLEN, A.F.; CROFT, S.L. 2003. Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. **International Journal Pharmaceutics**, 254: 73-75.

KEDZIERSKI, L.; ZHU, Y.; HANDMAN, E. 2006. Leishmania vaccines: progress and problems. **Parasitology**, 133: S87–S112.

KONING, H.P.; BRIDGES, D.J.; BURCHMORE, R.J.S. 2005. Purine and pyrimidine transport in pathogenic protozoa: From biology to therapy. **FEMS Microbiology Reviews**, 29: 987–1020.

KOTHARI, H.; KUMAR, P.; SUNDAR, S.; SINGH, N. 2007. Possibility of membrane modification as a mechanism of antimony resistance in *Leishmania donovani*. **Parasitology International**, 56: 77–80.

KOUNI, M.H. 2003. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. **Pharmacology & Therapeutics**, 99: 283– 309.

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

LAINSON, R.; SHAW JJ 1992. A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian Brazil. **Ciência e Cultura**, 44: 94-105.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. 1998. **New world Leishmaniasis- The neotropical *Leishmania* species**. In: FEG Cox, JP Kreier and D Wakelin (eds). Microbiology and microbial infection. Oxford University Press, New York. pp. 215.

LAINSON, R.; ISHIKAWA, E.A.Y.; SILVEIRA, F.T. 2002. American visceral leishmaniasis: wild animal hosts. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96: 630-631.

LIEW, F.Y.; WEI, X.; PROUDFOOT, L. 1997. Cytokines and nitric oxide as ejector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B**, 352: 1311-1315.

LIU, W.; BOITZ, J.M.; GALAZKA, J.; ARENDT, C.S.; CARTER, N.S.; ULLMAN, B. 2006. Functional characterization of nucleoside transporter gene replacements in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 150: 300–307.

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

MARSDEN, P.D. 1985. Pentavalent antimonials: old drugs for new disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 18: 187-198.

MARZOCHI, M. C. A. 1992. Leishmanioses no Brasil: as leishmanioses tegumentares. **Jornal Brasileiro de Medicina**, 63: 82-104.

MARZOCHI, M.C.A.; MARZOCHI, K.B.F. 1994. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil – Emerging anthroozoonosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, 10 (2): 359-375.

MAYRINK, W.; MAGALHÃES, P.A.; MICHALICK, M.S.M.; DA COSTA, C.A.; LIMA A.O.; MELO, M.N.; TOLEDO, V.P.C.P.; NASCIMENTO, E.; DIAS, M.; GENARO, O.; HERMETO, M.V.; WILLIAMS, P. 1992. Immunotherapy as a treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: preliminary studies in Brazil. **Parasitologia**, 34: 159-165.

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2000. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, 62p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2003. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Ministério da Saúde, 120p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2006. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 136 p.

MINODIER, P.; PAROLA, P. 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, 5: 150–158.

MONTALBAN, C.; MARTINEZ-FERNANDEZ, R.; CALLEJA, J.L.; GARCIA-DIAZ, J.D.; RUBIO, R.; DRONDRA, F.; MORENO, S.; YEBRA, M.; BARROS, C.; COBO, J.;

MOSSALAYI, M.D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P.; VOULDOUKIS, I. 1999. The Human Immune Response during Cutaneous Leishmaniasis: no problem. **Parasitology Today**, 15 (8): 342-345.

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

MS/FUNASA 2002. **Leishmaniose Tegumentar Americana e Leishmaniose Visceral**. In: Situação da prevenção e controle das doenças transmissíveis no Brasil. Ministério da Saúde/ Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 2ª edição (maio/2002). pp27.

MS/Guia de Vigilância Epidemiológica 1998. **Leishmaniose Tegumentar Americana – LTA**. In: Guia de Vigilância Epidemiológica, Fundação Nacional da Saúde, Brasília. 5ª edição.

MURRAY, H.W. 1981. Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. **The Journal of Experimental Medicine**, 153: 1690-1695.

MURRAY, H.W. 2000. Treatment of visceral leishmaniasis (kal-azar): a decade of progress and future approach. **International Journal Infectious Disease**, 4 (3): 158-177.

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

MUSSI, S.M.; FERNANDES, A.P.; FERREIRA, L.A.M. 2007. Comparative study of the efficacy of formulations containing fluconazole or paromomycin for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) major* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology Research**, 100:1221–1226.

NAPOLITANO, D.R.; MINEO, JR.; SOUZA, M.A., PAULA, J.E.; ESPÍNDOLA, L.S.; ESPÍNDOLA, F.S. 2005. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plants extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, 99: 37-41.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; LINARDI, P.M.; VITOR, R.W.A. 2005. Parasitologia Humana. 11ª edição. Ed Atheneu. P 494.

NICOLLE, C.H. 1908. **Culture du parasite du Bounton d' Orient**. Comple. Rendu Hebdomadaire des Scéances de l'Academie des Sciences, Paris.146: 842-843.

NOVY, F.G.; MACNEAL, W.J. 1904. On the cultivation of *Trypanosoma brucei*. **Journal Infectious Disease**, 1: 1-30.

OLIVEIRA, M.C.; AMORIM, R.F.B.; FREITAS, R.A.; COSTA, A.L.L. 2005. Óbito em caso de leishmaniose cutâneomucosa após o uso de antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 38(3): 258-260.

OLLIARO, P.; LAZDINS, J.; GUHL, F. 2002. Developments in the treatment of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, 7 (1): 61-67.

OLMO, E.D.; PLAZA, A.; MURO, A.; MARTÍNEZ-FERNANDEZ, A.R.; NOGAL-RUIZ, J.J.; LOPEZ-PÉREZ, J.L.; FELICIANO, A.S. 2006. Synthesis and evaluation of some lipidic aminoalcohols and diamines as immunomodulators. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 16: 6091–6095.

OPPERDOES, F.R. 1991. **Glicosomes**. Biochemical Protozoology (eds) Coombs GH, North, MJ, Taylor and Francis, London.134-44.

PASSOS, V.M.A. 1998. **Leishmaniose Tegumentar Americana: caracterização clínica, evolutiva, laboratorial e epidemiológica**. Tese de Doutorado em Medicina Tropical. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 188p.

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

RAB, M.A.; FRAME, I.A.; EVANS, D.A. 1995. The role of dogs in the epidemiology of human visceral leishmaniasis in northern Pakistan. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 89: 612-615.

RABELLO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. 2003. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, 97: 17-28.

RIDA, S.M.; ASHOUR, F.A.; EL-HAWASH, S.A.M.; EL-SEMARY, M.M.; BADR, M.H. 2007. Synthesis of some novel substituted purine derivatives as potential anticancer, anti-HIV-1 and antimicrobial agents. **Archiv der Pharmazie**, 340: 185-194.

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

ROBERTSON, I. D.; IRWIN, P. J.; LYMBERY, A. J.; THOMPSON, R. C. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. **International Journal for Parasitology**, 30: 1369–1377.

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

SACKS, D.L.; HIENY, S.; SHIER, A. 1985. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stage of *Leishmania major* promastigotes. **The Journal of Immunology**, 135: 564-569.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. 2001. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, 55: 453-483.

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

SCOTT, P. 2005. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, 7(12): 1707–1713.

SEIFERT, K.; MATU, S.; PEREZ-VICTORIA, J.F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S.L. 2003. Characterization of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **The International Journal of Antimicrobial Agents**, 22: 380–387.

SEN, B.; VENUGOPAL, V.; CHAKRABORTY, A.; DATTA, R.; DOLAI, S.; BANERJEE, R.; DATTA, A.K. 2007. Amino Acid Residues of *Leishmania donovani* cylophilin key to interaction with its adenosine kinase: biological implications. **Biochemistry**, 46: 7832-7843.

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

SILVA-JARDIM, I.; HORTA, M.F.; RAMALHO-PINTO, F.J. 2004. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta Tropica** 91: 121–130.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, C.E.P. 2004. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99: 239-251.

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

SINHA, P.K.; PANDEY, K.; BHATTACHARYA, S.K. 2005. Diagnosis & management of leishmaniasis/HIV co-infection. **Indian Journal Medical Research**, 121: 407-414.

SOLOMON, M.; BAUM, S.; BARZILAI, A.; SCOPE, A.; TRAU, H.; SCHWARTZ, E.; AVIV, T.; HASHOMER, T. 2007. Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 56(4): 612-616.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; VEGA, J.; BERMAN, J. 2005. Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 72 (4): 421-422.

SOTO, J.; BERMAN, J. 2006. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 100S: S34—S40.

SOTO, J.; TOLEDO, J.T. 2007. Oral miltefosine to treat new world cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Disease**, 7 (1): 7.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; VALDA, L.; BALDERRAMA, M.; REA, I.; PARRA, R.; ARDILES, J.; SOTO, P.; GO´MEZ, A.; MOLLEDA, F.; FUENTELESZ, C.; ANDERS, G.; SINDERMANN, H.; ENGEL, J.; BERMAN, J. 2007. Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. **Clinical Infectious Diseases**, 44:350–6.

SUNDAR, S.; RAI, M. 2002. Advances in the treatment of leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Disease**, 15: 593-8.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **The Indian Journal of Medical Research**, 123: 345-352.

SUNDAR, S.; MEHTA, H.; CHHABRA, A.; SINGH, V.; CHAUHAN, V.; DESJEUX, P.; RAI, M. 2006. Amphotericin B Colloidal Dispersion for the treatment of Indian Visceral Leishmaniasis. **Clinical Infectious Disease**, 42: 608-613.

SUNDAR, S.; JHA T.K.; THAKUR, C. P.; SINHA, P. K.; BHATTACHARYA, S.K. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, 356(25): 2571-2581.

TDR STRATEGICS. 2002. TDR Strategic Direction: Leishmaniasis. **WHO**. Access: www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf.

UBOLDI, A.D.; LUEDER, F.B.; WALSH, P.; SPURCK, T.; MCFADDEN, G.I.; CURTIS, J.; LIKIC, V.A.; PERUGINI, M.A.; BARSON, M.; LITHGOW, T.; HANDMAN, E. 2006. A mitochondrial protein affects cell morphology, mitochondrial segregation and virulence in Leishmania. **International Journal for Parasitology**, 36: 1499–1514.

ZHANG,L.; LING, Y.; DU, M. 2007. Synthesis, crystal structures and in vitro anti-fungal activities of two silver(I) coordination polymers with fluconazole. **Inorganica Chimica Acta**, 360: 3182–3188.

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

WEBSTER, P.; E RUSSEL, DG.1993. The flagelar pocket of trypanosomatids. **Parasitology Today**, 9: 201-206.

WHO/TDR. 2000. The leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infection. **WHO Factsheet No. 116**. Geneva.

WOLDAY, D.; BERHE, N.; AKUFFO, H.; BRITTON, S. 1999. *Leishmania*-HIV interaction: immunopathogenic mechanisms. **Parasitology Today**, 15: 182-187.

8 ANEXOS

8.1. Produtos diretos da dissertação

Braga, F.G.; Coimbra, E.S.; Matos, M.O.; Carmo, A.M.L.; Cancio, M.D.; Silva, A.D. 2007. Synthesis and Biological evaluation of some 6-substituted purine. **European Journal of Medicinal chemistry**, 42:530-537.

BRAGA, F.G.; CARMO, A.; Paula, M.L.; FERREIRA, A.P.; TEIXEIRA, H.; SILVA, A.D.; COIMBRA, E.S. 2008. Synthesis and Biological Properties of New Purine Analogues Obtained by Substitution of Internal Nucleophilics. **Letters in Drug Design & Discovery** (*in Press*).

8.2. Produtos indiretos da dissertação

Braga, F.G.; Bouzada, M.L.M.; Fabri, R.L.; Moreira, F.O.; Scio, E.; Coimbra, E.S. 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, 111: 396–402.

Costa, C.F.; Coimbra, E.S.; Braga, F.G.; Reis, R.C.N.; Silva, A.D.; Almeida, M.V. 2008. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, doi:10.1016/j.biopha.2007.12.013.

FABRI, R.L; SCIO, E.; Nogueira, M.S.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S. 2008. *Mitracarpus frigidus* (Willd) K. Shum aerial parts exhibited potent antimicrobial, antileishmanial and antioxidant effects. **Bioresource Technology** (*in Press*).

DE PAULA, M.L.; BRAGA, F.G.; COIMBRA, E.S.; CARMO, A.M.L.; TEIXEIRA, H.C.; SILVA, A.D.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P. Modulatory effects of 6-carboxymethylthiopurine on activated murine macrophages. **Chemical Biology & Drug Design** (*in Press*).