

DENISE TEIXEIRA

ESTUDO *IN VITRO* DE FÁRMACOS SINTÉTICOS EM
LEISHMANIA (L.) CHAGASI

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

SÃO PAULO
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Teixeira, Denise

Avaliação in vitro do potencial terapêutico de fármacos sintéticos no tratamento da leishmaniose visceral / Denise Teixeira – São Paulo, 2010.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: André Gustavo Tempone Cardoso

1. Leishmaniose visceral 2. in Vitro 3. Farmacologia
4. Toxicidade

SES/CCD/CD-237/10

Aos meus pais: Sergio e Isabel

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo pela oportunidade de realização do programa de mestrado e ao Instituto Adolfo Lutz pela infra-estrutura.

Ao Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso pela orientação, amizade, apoio e incentivo nos dias mais difíceis. Obrigada pela ajuda, por acreditar em mim e por me mostrar que seria capaz.

Ao Prof. Dr. Pedro Luis da Silva Pinto, pesquisador do Centro de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz pela atenção, confiança e oportunidade ao Programa de Aprimoramento Profissional.

Aos técnicos Matília e Vicente pela assistência e companheirismo.

À Deus pela minha existência e por ter me dado força e capacidade para concluir este trabalho.

Aos meus pais, Sergio e Isabel, por serem meus maiores exemplos de luta e persistência. Por acreditarem em mim, e por muitas vezes apesar das dificuldades abdicaram de seus sonhos para me proporcionarem sempre o melhor.

Aos meus irmãos Sergio Henrique e Milene pela torcida e por fazerem parte da minha vida.

Ao meu marido Rodrigo, pelo apoio, paciência e compreensão em todos os momentos difíceis.

À ex-funcionária Ivete pelo apoio, amizade e todo carinho.

Às amigas Daniela e Juliana pela amizade e companheirismo em todos estes anos de convívio.

E a todos aqueles que passaram de alguma forma e por algum período ao meu lado, torcendo, o meu muito obrigado.

RESUMO

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero de *Leishmania*. É a segunda maior causa de mortes causadas por parasitas no mundo, responsável por 500.000 casos por ano. A leishmaniose visceral (VL) é a forma mais severa da doença. A quimioterapia é feita pela administração de drogas com significantes efeitos colaterais - em termos de administração, duração do tratamento, toxicidade e custo - que limitam sua utilização em áreas endêmicas. Na busca por novas drogas, a triagem empírica ou "piggy-back therapy" representa um das formas mais promissoras na introdução de novos compostos ativos. O presente trabalho teve como objetivo, o estudo de fármacos comerciais usados no tratamento de outras patologias, contra *L. (L.) chagasi*. Por meio de triagem empírica, o estudo avaliou a eficácia *in vitro* de 21 fármacos sintéticos contra formas promastigotas do parasita. Cinco compostos apresentaram valores promissores de CE_{50} em culturas *in vitro* de promastigotas de *L. (L.) chagasi*, sendo eles: buparvaquona, furazolidona, clotrimazol, bifonazol e nifedipina. Dentre os fármacos ativos, buparvaquona demonstrou o menor valor de CE_{50} contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Além disso, buparvaquona demonstrou baixa toxicidade contra células de mamíferos e potente atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi*. Não foi observado aumento na produção de óxido nítrico pelos macrófagos na presença da buparvaquona, o que sugere um efeito direto no parasita e ainda que seu mecanismo de ação contra os amastigotas, não deve estar relacionado a ativação do macrófago. A buparvaquona é um potencial candidato a fármaco para os estudos em modelos animais com *L. (L.) chagasi*. Os resultados encontrados podem ser utilizados como uma importante ferramenta no desenho de novos fármacos, assim como para estudos de modelagem molecular.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a protozoan disease caused by parasites of the *Leishmania* genus. It has been the second cause of parasitic disease in the world, and is responsible for an estimated 500,000 cases per year worldwide. Visceral Leishmaniasis (VL) is the most severe form of the disease. The chemotherapy has many drawbacks, as a difficult route for administration, the long period of treatment, the toxicity or even the cost, which could also limit the use in disease-endemic areas. In the search for novel drugs, the chemotherapeutic switching or “piggy-back” chemotherapy represents one of the most promising forms for the introduction of new active compounds. The goal of this work was the *in vitro* study of drugs in clinical use for the treatment of other pathologies, against *L. (L.) chagasi*. By using an empiric screening, this study evaluated the *in vitro* effectiveness of 21 synthetic drugs against promastigotes forms of the parasite. Five compounds presented promising EC₅₀ values in cultures of *L. (L.) chagasi* promastigotes: buparvaquone, furazolidone, clotrimazole, bifonazole and nifedipine. Among the active compounds, buparvaquone demonstrated the smallest EC₅₀ value against *L. (L.) chagasi* promastigotes. Furthermore, buparvaquone demonstrated low toxicity against mammalian cells and potent activity against *L. (L.) chagasi* intracellular amastigotes. There was also observed no increase in the production of nitric oxide by the macrophages in the presence of buparvaquone, suggesting other mechanism of action against the intracellular amastigotes than macrophage activation. Buparvaquone is a potential drug candidate for experimental studies with *L. (L.) chagasi*. These results could be an important tool for drug design studies and molecular modeling studies.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ATCC– American Type Cell Collection

°C – graus Celsius

λ – Comprimento de onda

CE₅₀ – Concentração efetiva 50%

CO₂ – Dióxido de carbono

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EtOH – etanol

FDA – Food and Drug Administration – USA

HIV – vírus da imunodeficiência humana (human deficiency virus)

h – horas

I.S. – Índice de seletividade,

IC 95% – Intervalo de confiança 95%

LLC-MK2- células de rim de macaco Rhesus

LPS-lipopolissacarídeo

MeOH – metanol

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide

OMS – Organização mundial da saúde

ppm – parte por milhão

PBS – tampão fosfato-salina

QSAR – Relação estrutura química-atividade biológica

RNA – Ácido ribonucléico

rpm - rotação por minuto

RMPI – Roswell Park Memorial Institute

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SIDA – síndrome da imunodeficiência adquirida

THP-1– monócitos tumorais humanos

U.V. – ultra violeta

v/v – volume por volume

WHO – World health organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fórmulas estruturais e uso terapêutico dos fármacos em estudo.	29
Tabela 2: Atividade anti- <i>Leishmania</i> dos fármacos ativos sobre <i>L. (L.) chagasi</i> (exceto buparvaquona). Pentamidina foi utilizado como fármaco padrão.	44
Tabela 3: Valores de CE ₅₀ do fármaco buparvaquona e padrões contra promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> .	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada.	6
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania spp.</i>	8
Figura 3: Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral, Brasil – 1985 a 2002.	13
Figura 4: Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral, em fevereiro/2008.	14
Figura 5: Aspecto clínico das Leishmanioses. a- Um paciente do Peru com Leishmaniose cutânea; b- Um paciente da Bolívia com Leishmaniose mucosa; c- Um paciente da Uganda com Leishmaniose Visceral; d- Uma paciente da Índia com Leishmaniose dérmica pós kalazar.	17
Figura 6: Placa de 96 poços contendo <i>L. (L.) chagasi</i> , após incubação com os compostos por 24 horas, incubação com MTT por 4 horas e posterior incubação com SDS por 24 horas.	38
Figura 7: Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> submetidos aos fármacos sintéticos na concentração de 100 µg/mL, pelo método do MTT. ct = controle de crescimento positivo.	42

Figura 8: Curva dose-resposta dos fármacos ativos sobre formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> (exceto buparvaquona). Pentamidina foi utilizada como fármaco padrão.	43
Figura 9: Curva dose-resposta do fármaco buparvaquona sobre formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> . Pentamidina foi utilizada como fármaco padrão.	45
Figura 10: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com <i>L. (L.) chagasi</i> e tratados por 120 horas com o fármaco buparvaquona (B) e controle sem tratamento (A). Lâminas foram coradas com Giemsa e observadas em microscopia óptica.	46
Figura 11: Curva dose-resposta do fármaco buparvaquona sobre formas amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> . Glucantime foi utilizado como fármaco padrão.	47
Figura 12: Efeito do fármaco buparvaquona sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos. Os macrófagos foram cultivados na presença e ausência de lipopolissacarídeo (LPG) e na presença do fármaco.	49

ÍNDICE

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	vi
TABELAS.....	viii
FIGURAS.....	ix
1. REVISÃO DA LITERATURA	3
1. 1 Leishmanioses	3
1.1.1 Breve histórico.....	3
1.1.2 Agente Etiológico	4
1.1.3 Vetores.....	5
1.1.4 Reservatórios	6
1.1.5 Ciclo biológico	7
1.1.6 Epidemiologia.....	10
1.1.7 Classificação da doença	15
1.1.8 Tratamento	18
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1 Materiais.....	26
3.2 Culturas celulares e animais de experimentação	33
3.2.1 <i>Leishmania (Leishmania) chagasi</i>	33
3.2.2 Células de mamíferos	34
3.2.3 Animais de experimentação	35

3.3 Avaliações da atividade anti- <i>Leishmania</i>	35
3.3.1 Determinação da atividade anti- <i>Leishmania</i> e da concentração efetiva 50% (CE ₅₀).....	35
3.3.2 Determinação da CE ₅₀ em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	37
3.4 Avaliações da citotoxicidade	38
3.4.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀)	38
3.4.2 Determinação do índice de seletividade.....	39
3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica	39
3.4.4 Avaliação da produção de óxido nítrico.....	40
3.5 Análise estatística.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Triagem dos fármacos sintéticos.....	41
4.2 Determinação da concentração efetiva 50% (CE ₅₀) dos fármacos ativos sobre promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	41
4.3 Estudo do fármaco buparvaquona	43
4.3.1 Determinação da CE ₅₀ em promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i>	43
4.3.2 Determinação da citotoxicidade	48
4.3.3 Avaliação da produção de óxido nítrico.....	49
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	75
ANEXO 2: Artigo científico.....	76

1. REVISÃO DA LITERATURA

1. 1 Leishmanioses

As leishmanioses são doenças que determinam grave problema de saúde pública. Há estimativa de prevalência global de 14 milhões de casos em 88 países, 79 destes são considerados subdesenvolvidos, com incidência anual de 1,5 a 2,0 milhões de casos, sendo 1,0 a 1,5 milhões de pessoas acometidas por leishmaniose tegumentar e 500.000 por leishmaniose visceral (LV) (Alvar et al., 2004).

1.1.1 Breve histórico

A LV foi descrita no século XVIII na Grécia e Índia. Em 1903, Laveran e Mesnil descreveram o parasito, quase que ao mesmo tempo, em material fornecido por Leishman e Donovan. Em 1908, na Tunísia, Nicolle aponta o cão como reservatório e na Índia em 1915 Mackie aponta o flebótomo como vetor (Alencar, 1982). No Brasil, o primeiro registro de calazar data de 1913, um caso proveniente, provavelmente, do Mato Grosso e diagnosticado por Migone no Paraguai (Ministério da Saúde, 1999). Em 1913, Gaspar Viana descobre o uso do tártaro emético para tratamento da leishmaniose tegumentar. Em 1923, o médico pernambucano Armando Tavares,

em relato verbal à Sociedade de Medicina de Pernambuco, comunicou o primeiro caso de LV em Pernambuco (Pereira, 1985). Evandro Chagas, em 1936 aponta o *Lutzomya longipalpis* como vetor (Alencar, 1982) e documenta o primeiro caso em pessoa viva à época do diagnóstico (Machado, 1987). Castro e Ferreira reconhecem o cão como reservatório em 1937. A partir da década de 50, com os trabalhos de Deane no Ceará, a doença passa a ser reconhecida em todo território nacional (Machado, 1987).

1.1.2 Agente Etiológico

O agente etiológico da LV é um protozoário da família Tripanosomatidae, gênero *Leishmania*, que apresenta duas formas: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e outra aflagelada ou amastigota, que é intracelular obrigatória, sendo encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. Na LV Americana (LVA), três espécies estão envolvidas com a infecção dependendo da região geográfica onde a doença ocorra: *Leishmania (Leishmania) donovani*, foi o parasito originalmente descrito, responsável pela forma visceral clássica e pela leishmaniose dérmica pós-calazar na Ásia; *Leishmania (Leishmania) infantum* Nicolle, 1908, é uma espécie amplamente

distribuída no Velho Mundo: Ásia, Europa e África; *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*, ocorre nas Américas, sendo responsável pela LVA em seres humanos e cães (Cupolillo 2006; Lainson e Shaw 1987; Muricio 2001; Sucen, 2009).

1.1.3 Vetores

Há diferentes vetores, dependendo da espécie de *Leishmania* e região geográfica. São insetos da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae, e cerca de 30 espécies são envolvidas na transmissão da LV no mundo. Nas Américas, a principal espécie de flebotomíneo envolvida com a transmissão da LV é a *L. longipalpis* (Figura 1), em praticamente todas as áreas de sua ocorrência, embora, na Colômbia e na Venezuela, ao lado desta espécie, tenha sido descrita a participação da *Lutzomyia evansi* e, no Brasil, nas cidades de Corumbá e Ladário, no estado de Mato Grosso do Sul, parece que a transmissão está a cargo de *Lutzomyia cruzi* (Sucen, 2009). Os insetos desta família são pequenos e têm como características a coloração amarelada ou de cor palha e, em posição de repouso, suas asas permanecem erectas e semi-abertas. Por essas características, são também conhecidos como mosquito-palha

e asa-dura, podendo ser chamados em algumas regiões do ESP de birigui, cangalhinha, entre outros (Sucen, 2009).



Figura 1: Fêmea de Flebotomíneo adulto, engurgitada. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

1.1.4 Reservatórios

Os reservatórios do parasito são animais mamíferos, principalmente canídeos, sendo os mais importantes a raposa (no ciclo silvestre e rural) e o cão (no ciclo rural e, particularmente, nas áreas urbanas). Nos ambientes rural e urbano o cão doméstico – *Canis familiaris* – vem sendo descrito como o principal reservatório da *L. (L.) chagasi*, tanto no Brasil como nas Américas. Entre os canídeos silvestres, reservatórios da *L. (L.) chagasi*, destacam-se nos ciclos silvestres e rurais, a raposa – *Dusicyon vetulus* (= *Lycalopex vetulus*),

no Nordeste do Brasil, e a espécie *Cerdocyon thous*, na Amazônia brasileira, no estado do Pará. Os gambás também têm sido apontados como reservatórios do parasita no estado da Bahia, onde se isolou o parasita de *Didelphis albiventris* e, na Colômbia, *Didelphis marsupialis* parece ter importância significativa na epidemiologia da doença (Sucen, 2009).

1.1.5 Ciclo biológico

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários heteroxênicos pertencentes à ordem Kinetoplastida, à família Trypanossomatidae. O ciclo biológico destes parasitos (Figura 2) se realiza em um hospedeiro invertebrado, que por possuir capacidade vetorial, é o responsável pela transmissão aos hospedeiros vertebrados, nos quais a forma parasitária é intracelular obrigatória (Sacks e Kamhawi, 2001).

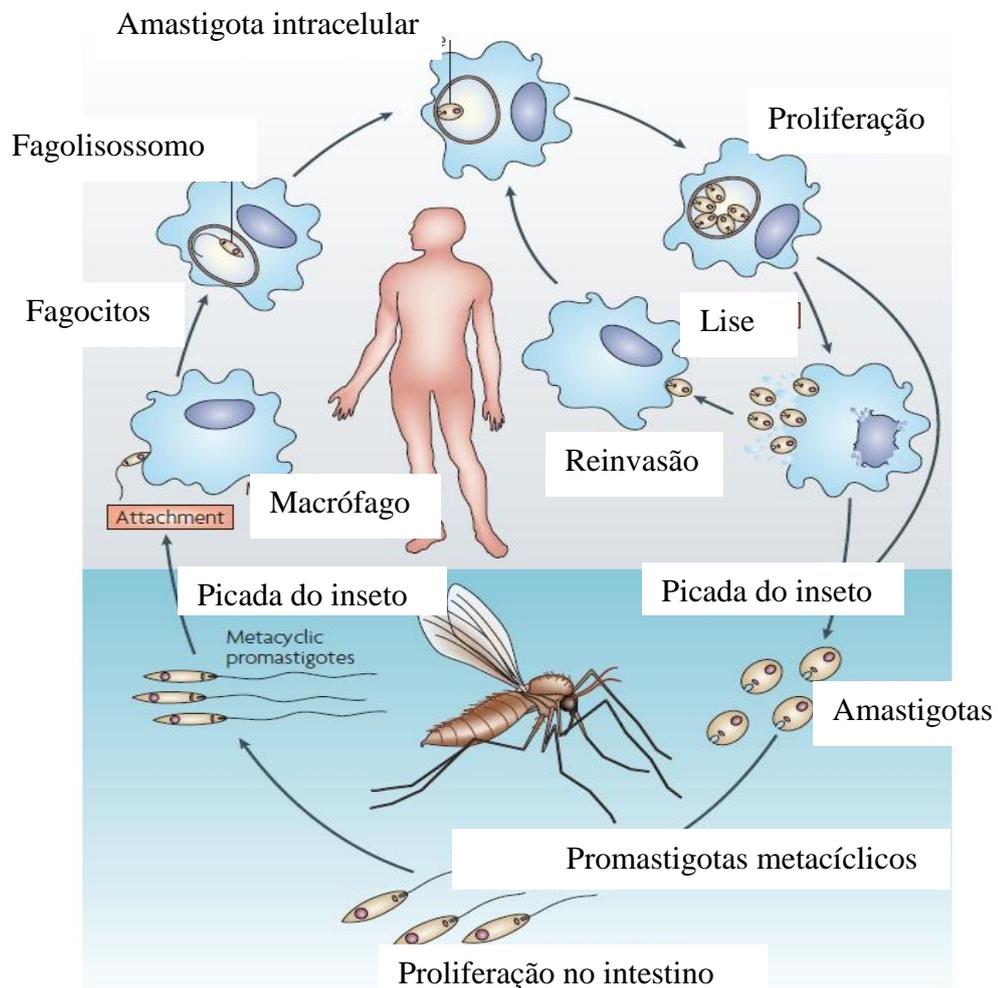


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania* spp. Fonte: Chappuis et al., 2007.

O ciclo da *Leishmania* se inicia quando uma fêmea do inseto vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero parasitado e ingere junto com o sangue células do sistema mononuclear fagocitário contendo formas amastigotas, que permanecem com o sangue

ingerido, no intestino do inseto vetor, contido pela membrana peritrófica. Após um período de 12h a 18h, se transformam em formas pequenas, ovóides, e de pouco movimento, chamadas promastigotas procíclicas. Estas formas possuem moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície, que interagem com lectinas presentes no intestino do inseto, impedindo que sejam eliminadas junto com o alimento digerido (Cardoso e Cabral, 1999; Oliver et al., 2005; Sacks e Kamhawi, 2001).

Os promastigotas procíclicas se multiplicam intensamente, e cerca de 30h a 60h, ocorre a transformação em formas alongadas, finas, com relativa motilidade, denominadas nectomonas. Estas formas aderem-se, via flagelo, às microvilosidades do epitélio celular do intestino médio do flebotomíneo. Cerca de sete dias após, quando se completa a digestão do sangue ingerido, estas formas migram para a região torácica do intestino, onde algumas se transformam em promastigotas, chamadas haptomonas, que rapidamente se transformam em formas finas, curtas, altamente ativas, e com flagelo medindo no mínimo o dobro do comprimento do corpo, as promastigotas metacíclicas. Estas são infectantes para o hospedeiro vertebrado e migram para o esôfago, faringe e probóscida (Cardoso e Cabral, 1999; Killick-Kendrick, 2002; Sacks e Kamhawi, 2001).

Ao realizar novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado susceptível, as formas infectantes de *Leishmania* são

inoculadas diretamente da probóscida e por regurgitação, junto com a saliva do inseto (Cardoso e Cabral, 1999).

Alguns pesquisadores relatam que a saliva dos flebotomíneos exerce importante papel na transmissão de *Leishmania*, potencializando a infecção, quer seja pela sua capacidade anticoagulante, quer por conter peptídeos de grande poder vasodilatador (Castro-Souza et al., 2001; Killick-Kendrick, 2002).

Após a internalização, as formas promastigotas metacíclicas, vulneráveis a acidez e a ação das enzimas líticas do fagolisossomo, se diferenciam em formas amastigotas (Cardoso e Cabral, 1999; Oliver et al., 2005). Estas se multiplicam por divisão binária até a morte e o rompimento do macrófago infectado (Killick-Kendrick, 2002). As formas amastigotas liberadas, por processo semelhante ao descrito, são capazes de infectar outras células do sistema mononuclear fagocitário (Cardoso e Cabral, 1999). O flebotomíneo ao realizar o repasto sanguíneo neste indivíduo, ingere junto ao sangue macrófagos infectados, perpetuando o ciclo biológico do parasito.

1.1.6 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a incidência anual da LV seja em torno de 500 mil novos casos (Alvar et al., 2006; WHO, 2005) e de 59 mil óbitos a cada ano, número só superado pelas mortes causadas por malária, no caso das doenças

parasitárias (Alvar et al., 2006; Desjeux, 2004). Desjeux (2004) afirma que o número de óbitos anual devido à LV provavelmente seja subestimado, tendo em vista que a doença só é notificada compulsoriamente em 32 dos 88 países em que ocorre, e que em muitos casos não é diagnosticada como tal.

A LV é endêmica em 65 países, com registro anual de mais de 90% dos 500 mil casos novos concentrados nos países Índia, Nepal, Sudão, Bangladesh e Brasil (Alvar et al., 2004; Desjeux, 2004).

Alguns autores destacam que é alta a correlação entre a condição socioeconômica da população e a doença (Alvar et al., 2006; Desjeux, 2004; WHO, 2005). Dantas-Torres e Brandão-Filho (2006) relatam que cerca de 80% das vítimas de LV sobrevivem com o equivalente a dois dólares americanos por dia. Alvar e colaboradores (2006) citam que a maioria dos fatores de risco de se contrair LV está associada à baixa renda *per capita*, o que contribui para aumentar os índices de morbidade e mortalidade da doença.

O Brasil é responsável pela quase totalidade dos casos de LV na Américas, sendo que no período compreendido entre os anos de 1984 a 2004, a média anual de casos de LV foi de 3.352 registros com uma incidência de dois casos para cada 100.000 habitantes, apresentando tendência ao crescimento. A letalidade média neste mesmo período foi de 6,3%, entretanto observou-se aumento de 100%, passando de 3,6% em 1994 para 7,4% em 2004 (Elkhoury, 2005).

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. 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.(Figura 3).

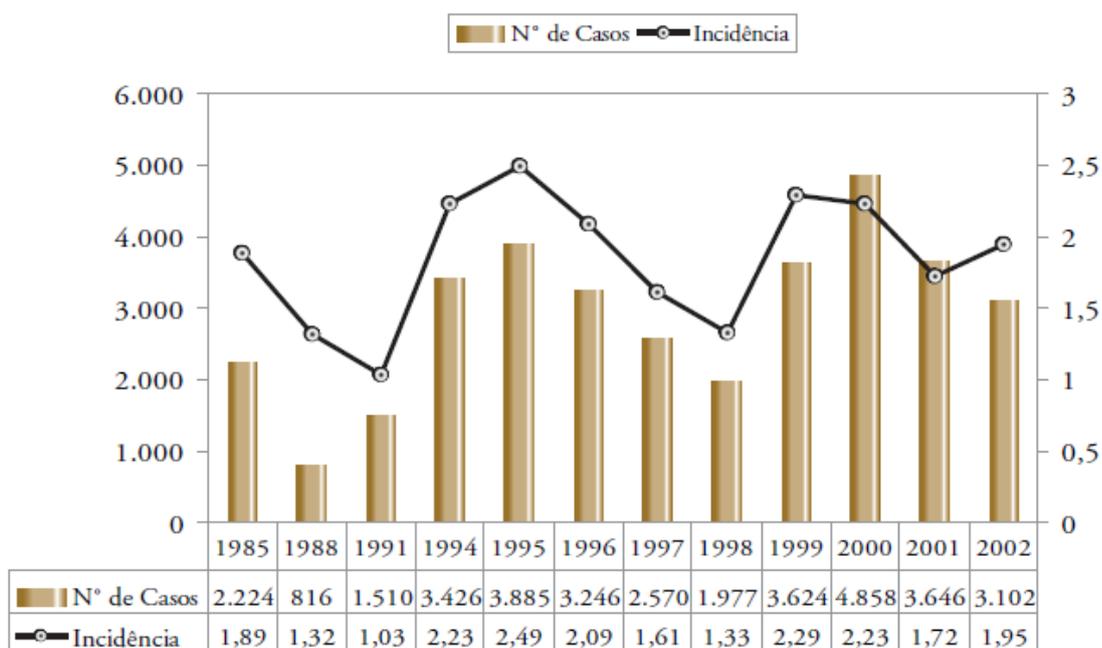


Figura 3: Número de casos e coeficiente de incidência de leishmaniose visceral, Brasil – 1985 a 2002. Fonte: Ministério da Saúde, 2006.

A doença está distribuída nas diferentes faixas etárias, porém ocorre com maior frequência em crianças de até 10 anos (59%), sendo 46% dos casos registrados em menores de cinco anos. O gênero masculino é proporcionalmente o mais atingido (60,4%) (Elkhoury, 2005).

A LV no Brasil é apontada como doença reemergente, caracterizada por nítido processo de transição epidemiológica, apresentando incidência crescente nas áreas onde ocorria tradicionalmente, expansão geográfica para os estados mais ao sul do país e franco processo de urbanização em cidades localizadas nas

regiões nordeste e sudeste (Alves e Bevilacqua, 2004). As cidades de Santarém e Boa Vista (Região Norte); Teresina, São Luis, Natal e Aracaju (Região Nordeste); Montes Claros, Belo Horizonte, Sabará e Rio de Janeiro (Região Sudeste), Cuiabá, Campo Grande e Palmas (Região Centro-Oeste) vivenciam ou já vivenciaram recentemente, epidemias de LV humana e canina (Ministério da Saúde, 2009). A classificação dos municípios do Estado de São Paulo até o mês de fevereiro de 2008, segundo a situação epidemiológica para a LV é mostrada na figura 4.

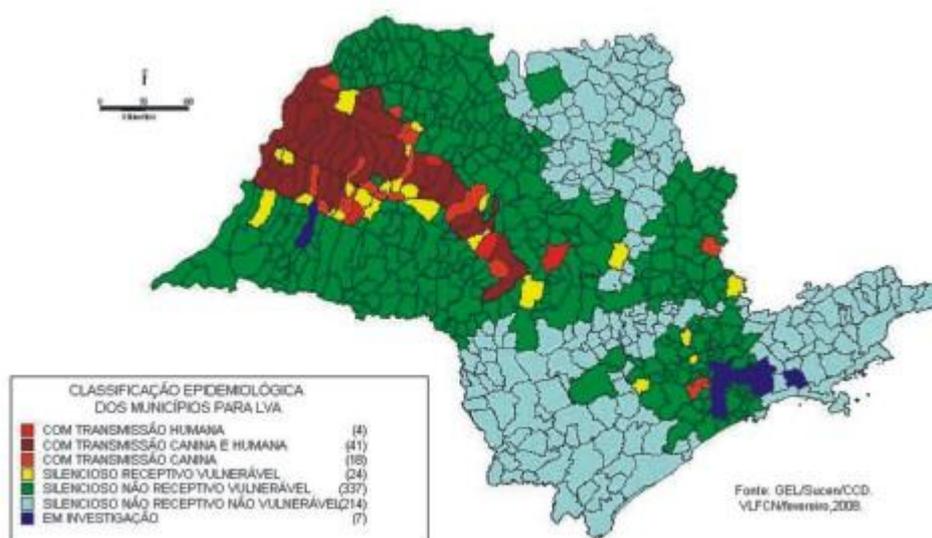


Figura 4: Distribuição dos municípios do Estado de São Paulo segundo a classificação epidemiológica para leishmaniose visceral, em fevereiro/2008.

1.1.7 Classificação da doença

A Leishmaniose é classificada da seguinte forma:

Leishmaniose Cutânea: ocasiona lesões do tipo pápula eritematosa, com um período de incubação variando de 1-2 semanas a até 1-2 meses. A lesão pode ser prurídica e não provocar dor. A forma nodular ou papular caracteriza-se histologicamente, por denso infiltrado inflamatório com grande número de macrófagos intensamente parasitados, linfócitos e plasmócitos. Esta lesão nodular evolui para ulceração em 90% dos casos. Com o decorrer do tempo, a úlcera adquire bordas elevadas devido ao intenso infiltrado inflamatório e proliferação epitelial. A necrose da derme, epiderme e parede vascular, ocorre quando o nível de anticorpos é elevado. A lesão pode evoluir para cura após o tratamento adequado, originando uma cicatriz fina e sedosa (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

Leishmaniose Cutânea pós-Kala-Azar: é causada pela *L. (L.) donovani*, após o tratamento e cura (1-3 anos) da Leishmaniose Visceral. Ocorre a formação de nódulos cutâneos ao redor da boca e nariz em maior freqüência, e ainda no tronco e extremidades (Balaña-Fouce *et al.*, 1998).

Leishmaniose Difusa: é uma forma menos freqüente da doença, caracterizada pela deficiência da imunidade do indivíduo, levado pela falta de resposta aos antígenos do parasita. Inicia-se com uma lesão ulcerativa como descrita anteriormente, e evolui para lesões não ulcerativas, do tipo nodular, em várias regiões do corpo, principalmente regiões mais frias, podendo atingir linfonodos e nasofaringe. Esta doença é progressiva e crônica, e não responde aos tratamentos quimioterápicos convencionais. A disseminação do parasita ocorre através da migração por vasos linfáticos ou mesmo por macrófagos parasitados (Balanã-Fouce *et al.*, 1998).

Leishmaniose Mucocutânea: conhecida como “espúndia” ou “nariz de anta”, inicia-se como uma típica lesão cutânea no local onde ocorreu a infecção pelo parasita, alcançando áreas de mucosas

provavelmente devido à migração dos parasitas para novas regiões do corpo. Pode ocorrer a destruição do septo nasal, laringe e traquéia, levando ao comprometimento da respiração, fala e deglutição, geralmente acompanhado por infecções secundárias, as quais podem levar o paciente ao óbito caso não tratado.

Leishmaniose Visceral: é a forma mais severa da doença, podendo levar o paciente ao óbito quando não submetido aos tratamentos quimioterápicos. Os sintomas geralmente iniciam-se após o longo tempo de incubação (1-5 meses), como febre irregular, hemorragias (gengivorragias), sudorese, anorexia, fraqueza e emagrecimento, com aumento do volume abdominal. Nos casos avançados da doença, pode ocorrer esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia, com a possibilidade de infecções secundárias como pneumonia ou tuberculose (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Formas de transmissão congênita têm sido descritas no Velho Mundo, devido à infecção por *L. infantum* (Meinecke *et al.*, 1999; Bogdan *et al.*, 2001). Também tem sido observada a Leishmaniose Visceral com bastante frequência em pacientes imunocomprometidos, incluindo pacientes portadores do HIV (Orsini *et al.*, 2002; Dereure, *et al.*, 2003).



Figura 5: Aspecto clínico das Leishmanioses. a- Um paciente do Peru com Leishmaniose cutânea; b- Um paciente da Bolívia com Leishmaniose mucosa; c- Um paciente da Uganda com Leishmaniose Visceral; d- Uma paciente da Índia com Leishmaniose dérmica pós kalazar. Fonte: Chappuis et al., 2007.

1.1.8 Tratamento

Em 1912, Gaspar Vianna descobriu a ação curativa do tártaro emético (antimonial trivalente); devido aos efeitos colaterais foi substituído por outros antimoniais trivalentes como estibofeno e solustibosan (Pessoa, 1960; Deane e Veronesi, 1962; Ribeiro e Campos, 2009). Em 1921, Brachamari, na Índia sintetizou o primeiro antimonial pentavalente, com nome de urea stibamine, considerada um fármaco mais eficaz e menos tóxico que as anteriores (Ribeiro e Campos, 2009).

Os Laboratórios Rhodia (França) e Wellcome (Inglaterra) produziram em 1940 em larga escala os antimoniais pentavalentes com os nomes de antimoniato de n-metilglucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®) respectivamente (Ribeiro e Campos, 2009).

Em 1955 foi isolada, por Gold e colaboradores nos Estados Unidos a anfotericina B, antibiótico com bons efeitos terapêuticos no tratamento da Leishmaniose Tegumentar, conforme registraram Lacaz e colaboradores, seguido por Furtado, 1959, e por Sampaio em 1960 (Deane e Veronesi, 1962). Em seguida, a anfotericina B foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) para uso em uma formulação lipossomal preparação lipídica (Sucen, 2001).

Em 2005 a OMS aprovou o uso do antitumoral Miltefosina no tratamento da LV em humanos na Índia, sendo um produto de

administração oral. Apesar disso o medicamento apresenta efeitos teratogênicos e toxicidade gastrointestinal moderada (Gontijo e Melo, 2004).

A terapia de escolha para o tratamento da LV são os antimoniais pentavalentes. No Brasil desde os anos 50, adotou-se o antimoniato de N-metil glucamina, Glucantime®, (Rhodia-Brasil), com 425mg do antimonial ou 1,5g de Sb^{5+} à 8,5% (85mg/ml). Outro composto antimonial é o estibogluconato de sódio, Pentostam® (Glaxo-Wellcome-UK) que contém 10% Sb^{5+} (100mg/ml). A eficácia terapêutica de ambos os fármacos parece ser equivalentes (Pessoa, 1963; Genaro, 2003; Ribeiro, 2003; Ribeiro e Campos, 2009).

O mecanismo de ação destes fármacos ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, parece que através do bloqueio do metabolismo do parasito, ocorre a inibição da síntese do ATP e da replicação do seu DNA. A inibição da atividade glicolítica e da via oxidativa dos ácidos graxos nas formas amastigotas determinam a sua morte (Marzochi et al., 2001; Medeiros et al., 2005).

O Glucantime® é cardiotoxico, hepatotóxico e nefrotóxico. Como tem efeito cumulativo, recomenda-se a realização semanal de eletrocardiograma (ECG) e provas de função renal e hepática. Pode ocorrer pancreatite química, artralgia, mialgia, cefaléia, adinamia e há, até mesmo, relatos de morte súbita. Geralmente os paraefeitos são revertidos após o término do tratamento, exceto as arritmias decorrentes de miocardite tóxica (Medeiros et al., 2005).

Nos últimos anos, na tentativa de evitar o surgimento de cepas desse parasito com resistência primária aos antimoniais, principalmente em países como Sudão, Quênia e Índia, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela OMS e pelo Centro de Controle de Doenças – CDC dos Estados Unidos da América. A taxa de resistência aos antimoniais no estado de Bihar na Índia pode chegar a 50% (Sundar e Rai, 2002).

No Brasil não há estudos a este respeito, nem evidências que justifiquem a elevação da dose, mesmo porque isso aumenta o risco de efeitos colaterais. Assim, recomenda-se o tratamento cauteloso da LV com dosagem padronizada pelo Ministério da Saúde, utilizando-se o limite máximo de 20 mg/Kg/dia de Sb^{+5} , não ultrapassando 3 ampolas/dia do produto, com índices de cura de até 95% dos casos com poucos efeitos adversos (Ministério da Saúde, 2004; Medeiros et al., 2005).

Nos casos de recidiva após o tratamento, a OMS recomenda uma segunda série de aplicações Glucantime® por 40 dias antes de considerar o caso como refratário (Medeiros et al., 2005).

Devem ser prescritos medicamentos alternativos sempre que possível, para pacientes idosos, nefropatas, cardiopatas ou portadores de arritmias; bem como nos casos de intolerância ou resistência aos antimoniais (Medeiros et al., 2005).

A anfotericina B, utilizada no tratamento das infecções micóticas, tem maior eficácia do que os antimoniais pentavalentes e a

pentamidina. Sua ação consiste em ligar-se ao ergosterol da membrana do parasito rompendo-a, provocando a morte dos parasitos. É alternativa fundamental nos casos refratários e em regiões com altos índices de resistência primária aos antimoniais; nos casos graves que requerem rápida e eficaz ação leishmanicida. Seu uso é limitado pela toxicidade para os rins e o miocárdio; a fim de reduzir a nefrotoxicidade. Há também risco de hipopotassemia e hipomagnesemia graves que podem levar o paciente à morte, por isso os níveis séricos de potássio e magnésio devem ser monitorados e corrigidos. Além disso, é necessário mensurar a dosagem de uréia e creatinina 2 vezes por semana e, semanalmente realizar o ECG. Semanas após o início do tratamento é comum o aparecimento de anemia (Medeiros et al., 2005).

A encapsulação de fármacos em lipossomos surge como alternativa de tratamento, uma vez que o princípio ativo fica protegido de eliminação e/ou degradação rápida *in vivo*. O direcionamento seletivo no interior da célula alvo proporciona a redução da concentração do fármaco quando comparada à forma livre e, o aumento da biodisponibilidade potencializa a ação e reduz os efeitos secundários indesejáveis (Val, 2004).

Formulações lipídicas da Anfotericina B têm-se mostrado eficazes e praticamente sem nefrotoxicidade. Na Índia observaram-se índices de cura entre 90 e 95% com o Ambisone®. O uso como droga de escolha tem aprovação pelo FDA. Em pacientes com co-infecção

Leishmania/HIV essas formulações também evidenciaram utilidade; porém são bastante dispendiosas. Mesmo assim, desde 2006, a Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, vem disponibilizando esta medicação a pacientes idosos e crianças. Estão disponíveis em três formas de apresentação: Anfotericina B lipossomal (Ambisone®), Anfotericina B de dispersão coloidal e Anfotericina B de complexo lipídico (Amphocil®) (Sucen, 2001; Ribeiro e Michalick, 2001; Gontijo e Mello, 2004).

A falta de informação comparativa em relação à Anfotericina B convencional no tratamento da Leishmaniose é outro fator que exclui a possibilidade de uso do medicamento em larga escala em programas de saúde pública (Ministério da Saúde, 2004).

O isotiocianato de pentamidina é uma opção que pode ser seguida pela anfotericina B nos casos resistentes ao Glucantime®. O uso no tratamento é limitado pela toxicidade; os efeitos colaterais são graves e incluem hipoglicemia prolongada, arritmia, insuficiência renal, pancreatite e *diabetes mellitus*. (Genaro, 2003).

O alopurinol inibe o metabolismo das purinas, exercendo efeito inibitório no crescimento de *Leishmania in vitro*. O emprego do alopurinol é controverso; usa-se associado ao antimonial na dose de 21mg/kg/dia, por via oral; os efeitos colaterais são irrelevantes (Medeiros et al., 2005).

A pentamidina e o alopurinol são usados apenas nos casos refratários à terapia convencional (Medeiros et al., 2005).

A aminosidina é um antibiótico aminoglicosídeo com ação em protozoários. Seu mecanismo de ação é complexo, inibe a síntese protéica e altera a permeabilidade da membrana plasmática dos parasitos. As vias de introdução do fármaco podem ser a subcutânea e a intramuscular. Os efeitos colaterais conhecidos são principalmente a nefrotoxicidade e surdez por lesão do VIII nervo craniano; vem sendo empregada com bons resultados na LV em protocolos associados ao Glucantime® e alopurinol. O uso deste medicamento em nosso meio não tem sido freqüente, uma vez que o produto somente é comercializado na Itália (Ribeiro e Michalick, 2001).

A Miltefosina é um fármaco indicado nos casos de LV de moderada intensidade. Durante os testes clínicos realizados na Índia, foi usada por via oral a 2,5mg/kg/dia, por 28 dias e observou-se que 95% dos pacientes tratados foram curados. Nos casos mais graves, em crianças e portadores de HIV, sua eficácia não foi estabelecida. É potencialmente teratogênico, o que limita a sua utilização por grávidas e nutrízes (Medeiros et al., 2005).

A paromomicina é um medicamento candidato ao tratamento da LV. Os estudos clínicos estão na fase III no leste da África, com intenção de registrar o medicamento na Etiópia, Sudão e Quênia. O Institute One World Health conduziu os estudos da fase III com a paromomicina com fins de registro na Índia (Lotrowska e Zackiewscz, 2005).

A LV apresenta comportamento diferente na co-infecção com HIV, que se reflete principalmente na resposta irregular ao tratamento e alteração do padrão diagnóstico (Gontijo e Melo, 2004). Os fármacos para o tratamento da co-infecção LV/HIV são os mesmos utilizados em pacientes imunocompetentes. O Glucantime® é o fármaco de escolha, como alternativas disponíveis na rede pública estão a anfotericina B e a pentamidina (Ministério da Saúde, 2004). O esquema terapêutico é o mesmo, podendo se prolongar por até 40 dias (Medeiros et al., 2005).

A eficácia da profilaxia secundária, em pacientes com co-infecção LV/HIV não foi estabelecida definitivamente. Há probabilidade de recidiva, mesmo nos pacientes tratados com terapia antiretroviral de alta potência; a toxicidade das drogas e a possível indução à resistência dificultando a abordagem das recidivas desestimulam o uso rotineiro (Ministério da Saúde, 2004).

Com base no exposto, verifica-se uma iminente necessidade por novos fármacos na leishmaniose. O uso da “piggy back therapy” pode ser uma das possíveis ferramentas para a introdução de novos agentes anti-*Leishmania* no mercado, diminuindo os custos e tempo das pesquisas.

2. OBJETIVOS

Gerais.

Estudar a atividade anti-*Leishmania* *in vitro* de fármacos sintéticos, utilizados no tratamento de diferentes patologias. Determinar a seletividade *in vitro* do fármaco mais ativo.

Específicos.

1- Triagem *in vitro* para atividade anti-*Leishmania* de 21 fármacos sintéticos usados clinicamente para outras patologias, por meio da incubação com promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

2- Determinar a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) *in vitro* dos fármacos ativos, por meio da incubação com promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi*.

3- Determinar a CE₅₀ em macrófagos infectados com amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* do fármaco mais ativo.

4- Avaliação *in vitro* da citotoxicidade do fármaco mais ativo em células de mamíferos LLCMK-2, THP-1 e macrófagos peritoneais de camundongos. Determinação do respectivo Índice de Seletividade (CE₅₀ em célula de mamífero/CE₅₀ contra o parasito).

5- Avaliação da atividade hemolítica do fármaco mais ativo em eritrócitos de camundongos BALB/c.

6- Avaliação da ativação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c do fármaco mais ativo, por meio da produção de óxido nítrico.

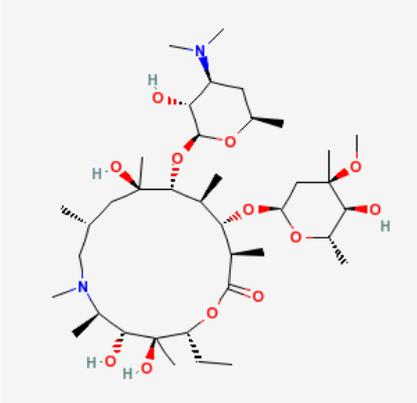
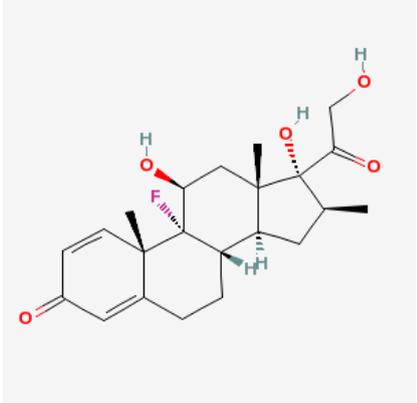
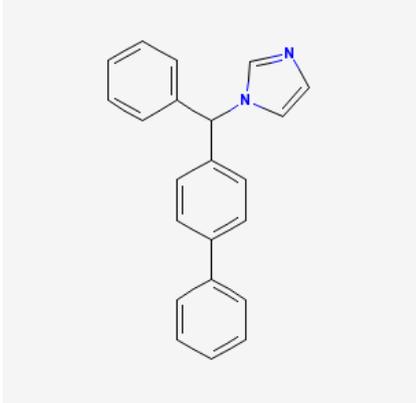
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

DMSO, glicerol, dodecil sulfato de sódio e metanol foram obtidos da Merck. MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2,5-difenil tetrazolio), meio 199 e meio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) foram adquiridos da Sigma. Outros materiais quando não mencionados foram adquiridos do Sigma.

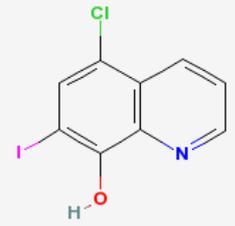
Os fármacos listados na Tabela 1, contendo sua indicação terapêutica, foram obtidos do Sigma Aldrich e foram utilizados para a triagem antiparasitária. Em nosso estudo, a escolha dos fármacos foi empírica, com exceção da buparvaquona e dos antifúngicos azólicos, pois já haviam sido descritas atividade contra *Leishmania* spp.

Tabela 1: Fórmulas estruturais e uso terapêutico dos fármacos em estudo. Fonte: PubChem Compound, 2009.

Fármaco	Uso terapêutico	Fórmula estrutural
(nome comercial)		
Azitromicina	Antibiótico	 <p>The image shows the chemical structure of Azithromycin, a 15-membered macrolide antibiotic. It features a large ring with two nitrogen atoms and a side chain containing a methyl group and a hydroxyl group.</p>
Betametasona	Antiinflamatório	 <p>The image shows the chemical structure of Betamethasone, a corticosteroid. It has a four-ring steroid nucleus with a ketone group at C3, a double bond at C4, and a fluorine atom at C6. It also has a side chain at C17 containing a hydroxyl group and a methyl group.</p>
Bifonazol	Antifúngico	 <p>The image shows the chemical structure of Bifonazole, an antifungal agent. It consists of a central carbon atom bonded to a phenyl ring, a benzimidazole ring, and a para-phenylene ring which is further substituted with another phenyl ring.</p>

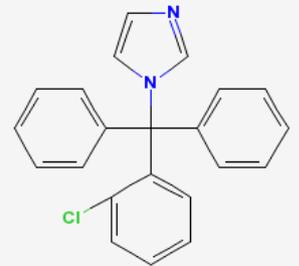
Clioquinol

Antifúngico



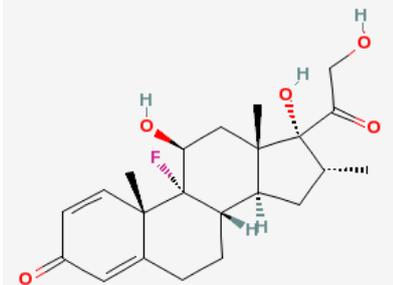
Clotrimazol

Antifúngico



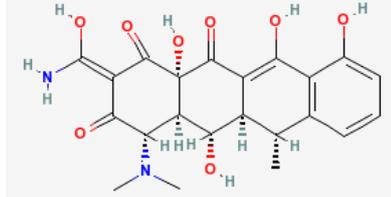
Dexametasona

Antiinflamatório



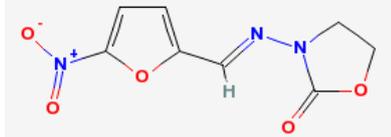
Doxiciclina

Antibiótico



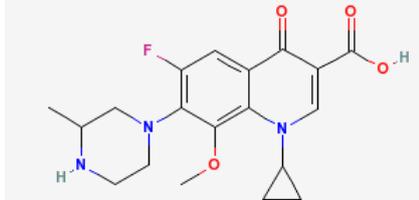
Furazolidona

Antibiótico



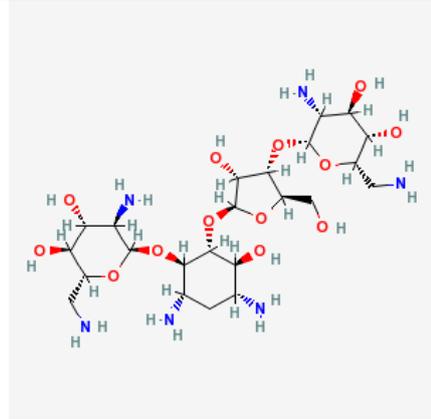
Gatifloxacina

Antibiótico



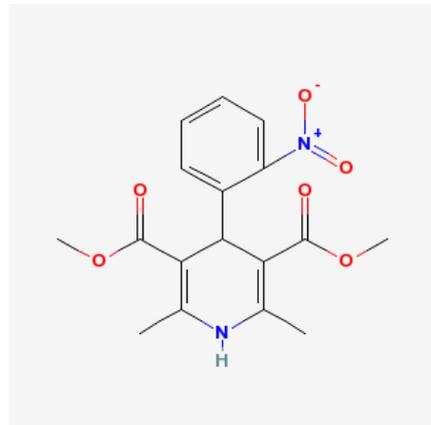
Neomicina

Antibiótico



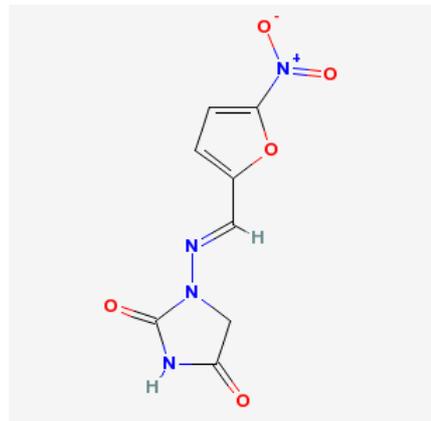
Nifedipina

Hipertensão



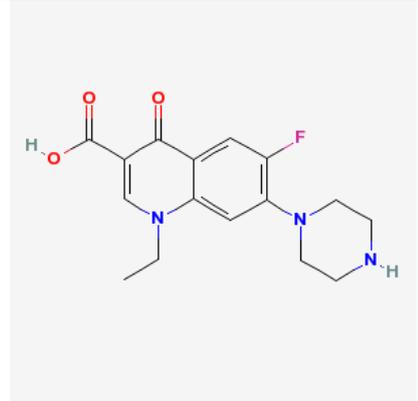
Nitrofurantoina

Antibiótico



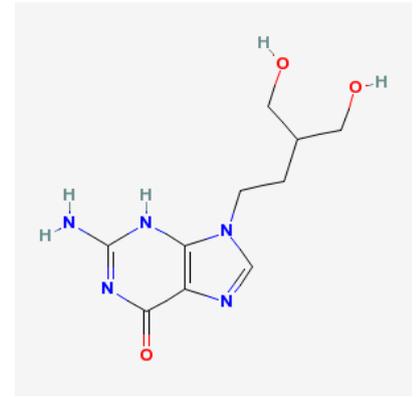
Norfloxacina

Antibiótico



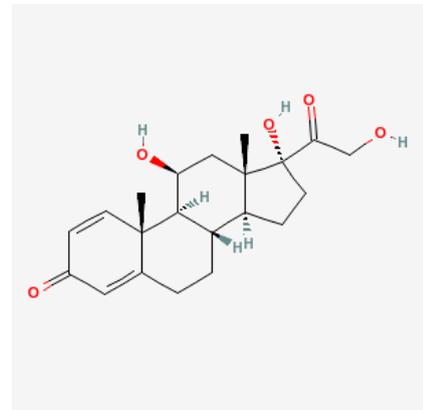
Penciclovir

Antiviral



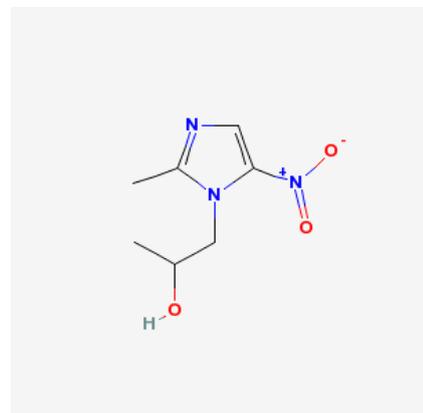
Prednisolona

Antiinflamatório



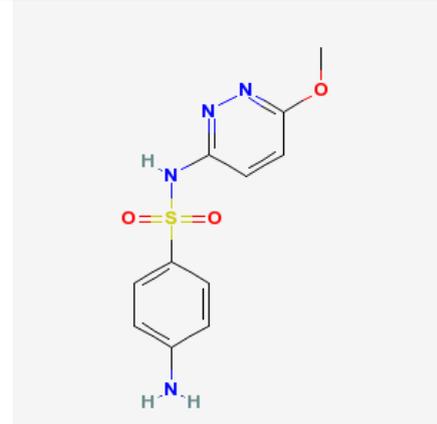
Secnidazol

Antifúngico



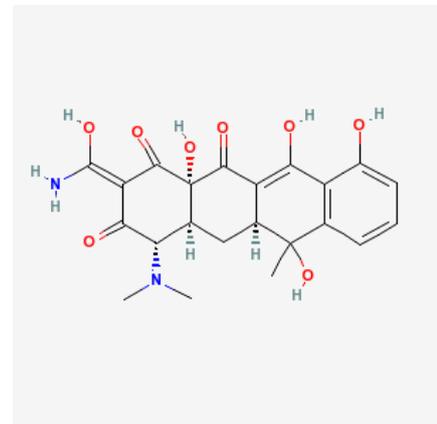
Sulfametoxipiridazina

Antibiótico



Tetraciclina

Antibiótico



3.2 Culturas celulares e animais de experimentação

3.2.1 *Leishmania (Leishmania) chagasi*

Promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina, sem a adição de antibióticos em estufa à 24°C. Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) foram infectados com amastigotas obtidas de baço para

manutenção da cepa. Amastigotas de *L. (L.) chagasi* foram purificadas de baço de hamsteres dourados (*Mesocricetus auratus*) por meio de centrifugação diferencial e o número de parasitas foi determinado pelo método de Stauber (1958) 60 a 70 dias após a infecção. Desta forma, o baço foi retirado, pesado, seccionado para realizar a impressão em lâmina de vidro (“imprint”), fixado com metanol por 5 minutos e corado com Giemsa por 10 minutos. Em seguida, o baço foi macerado em meio de cultura RPMI-1640 estéril, centrifugado a 800 rpm por 10 minutos e coletado seu sobrenadante. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 2.800 rpm por 10 minutos, sendo coletado os amastigotas no precipitado. O número de parasitas foi determinado pela fórmula de Stauber:

$$\text{Parasitas/órgão} = \frac{\text{número de amastigotas}}{\text{número de células nucleadas}} \times 2 \times 10^5 \times \text{massa órgão (g)}$$

3.2.2 Células de mamíferos

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas pela lavagem com meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e foram mantidos à temperatura de 37°C em estufa de CO₂ 5% (Sartorelli et al., 2007). LLC-MK2 (*Rhesus* Monkey Kidney Cells - ATCC CCL 7) foram cultivados em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂. Os monócitos THP-1 (ATCC) foram cultivados

em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidos à temperatura de 37°C em estufa a 5% de CO₂.

3.2.3 Animais de experimentação

Camundongos BALB/c fêmeas e Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) machos recém desmamados foram obtidos do biotério do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidos em caixas esterilizadas com material absorvente, recebendo água e alimento *ad libitum*. Hamsters dourados (*Mesocricetus auratus*) foram infectados a cada mês com amastigotas provenientes de baço para a manutenção da cepa. Todos os procedimentos realizados com animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CCD-BM 16/04).

3.3 Avaliações da atividade anti-*Leishmania*

3.3.1 Determinação da atividade anti-*Leishmania* e da concentração efetiva 50% (CE₅₀)

Os diferentes fármacos foram dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos em meio M-199. As CE₅₀s foram determinadas após incubação dos promastigotas de *L. (L.) chagasi* (1x10⁶/poço) por 24 horas (em estufa à 24°C) em placas de 96 poços

contendo meio M-199 (sem vermelho de fenol) e os diferentes compostos em diluição seriada. A viabilidade dos promastigotas foi verificada pela atividade oxidativa mitocondrial através após a incubação com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-di-feniltetrazolium bromídeo) por quatro horas (Tada et al., 1986), seguida pela incubação com dodecil sulfato de sódio (SDS) por 24 horas. Ao final do ensaio, o sobrenadante foi lido a 550 nm em leitor de placas (Multiskan reader 30). Como controle, utilizou-se o fármaco pentamidina na concentração inicial de 10 µg/mL, poços com ausência de promastigotas (branco) e poços contendo promastigotas incubados apenas com meio M-199 (100% de sobrevivência). Foi feito também o controle do solvente utilizado para dissolver os compostos (DMSO), sendo que o mesmo foi adicionado à placa na proporção máxima de 0,5% do volume final do poço. A figura 6 mostra o aspecto de uma placa de 96 poços contendo *L. (L.) chagasi* após o ensaio de viabilidade celular com MTT.

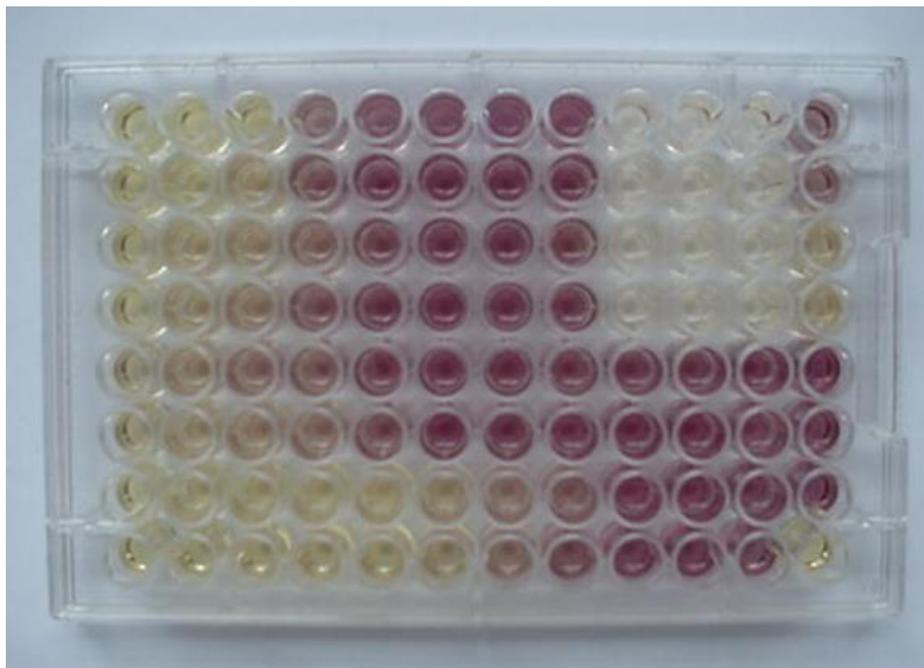


Figura 6: Placa de 96 poços contendo 1×10^6 promastigotas *L. (L.) chagasi*, após incubação com os compostos por 24 horas, incubação com MTT por 4 horas e posterior incubação com SDS por 24 horas.

3.3.2 Determinação da CE_{50} em macrófagos peritoneais infectados com amastigotas de *L. (L.) chagasi*

Os macrófagos foram coletados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c conforme descrito no item 3.2.2, cultivados em meio RPMI-1640 em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro (13 mm), e permanecendo em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$ por 24 horas. Amastigotas de *L. (L.) chagasi* extraídos de baço e separados por centrifugação foram adicionados aos macrófagos na proporção de

10:1 (amastigotas/macrófago) e as culturas foram incubadas com diferentes compostos em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por um período de 120 horas. Ao final do ensaio, as lamínulas foram coradas por Giemsa e observadas em microscópio óptico (Stauber, 1958). A CE₅₀ foi determinada pela da contagem de 500 macrófagos/lamínula, avaliando-se o número de macrófagos infectados, utilizando-se como controles macrófagos não tratados (100% infectado) e macrófagos tratados com o fármaco Glucantime®. Foi feito também o controle do solvente utilizado para dissolver os compostos (DMSO), sendo que o mesmo foi adicionado a placa na proporção máxima de 0,5% do volume final do poço.

3.4 Avaliações da citotoxicidade

3.4.1 Determinação da concentração efetiva 50% (CE₅₀)

Foram utilizadas células LLCMK-2 e THP-1 em placas de 96 poços com a adição de 4x10⁴ células/poço e incubação por 48 horas. Os compostos foram dissolvidos em DMSO e diluídos serialmente em meio RPMI-1640. As placas foram incubadas por um período de 48 horas a 37°C em estufa a 5% de CO₂ e foi determinada a viabilidade celular por meio de ensaio colorimétrico com MTT como descrito anteriormente (Tada et al., 1986; Tempone et al., 2005). Como controle do ensaio, foi utilizado o fármaco pentamidina, poços com

ausência de células (0% de sobrevivência) e poços contendo células incubadas apenas com meio RPMI-1640 (100% de sobrevivência).

3.4.2 Determinação do índice de seletividade

Com o objetivo de determinar a seletividade dos compostos com atividade anti-*Leishmania* em macrófagos, determinou-se o índice de seletividade (I.S.) dos mesmos, pela seguinte expressão

$$IS = \frac{CE_{50} \text{ em macrófagos (citotoxicidade)}}{CE_{50} \text{ contra } L. (L.) \text{ chagasi}}$$

3.4.3 Avaliação da atividade hemolítica

A atividade hemolítica do fármaco buparvaquona foi avaliada em eritrócitos de camundongos BALB/c (Conceição et al., 2006). Suspensões de 3% dos eritrócitos foram incubadas por 2 horas com o composto, diluídos serialmente em PBS em placas de 96 poços com fundo em forma de U. As placas foram incubadas a 25 °C e posteriormente o sobrenadante foi lido a 550 nm em leitor de placas (Multiskan reader 30). Utilizou-se como controle negativo (0% de hemólise) eritrócitos incubados apenas com PBS e como controle positivo (100% de hemólise) eritrócitos incubados com H₂O.

3.4.4 Avaliação da produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico por macrófagos após incubação com o fármaco buparvaquona foi medida por meio da reação de Griess (Panaro et al., 1999). Os macrófagos peritoneais foram incubados por 24 horas a 37 °C com o composto à concentração de 5 µg/mL. Lipopolissacarídeo (50 µg/mL) foi utilizado para induzir a produção de NO. A absorbância foi determinada a 540nm em leitor de placas (Multiskan reader 30).

3.5 Análises estatísticas

A CE₅₀ das substâncias analisadas foi determinada pelas curvas sigmoidais dose-resposta, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0, analisando-se os respectivos intervalos de confiança 95% e coeficientes lineares. As diferenças entre as amostras foram comparadas com os fármacos padrões (pentamidina e Glucantime) e estatisticamente avaliadas pelos valores de P com base em três ensaios distintos.

4. RESULTADOS

4.1 Triagens dos fármacos sintéticos

A partir da triagem dos 21 fármacos, foi observada atividade contra os promastigotas de *L. (L.) chagasi* à concentração de 100 µg/mL em cinco fármacos testados. Considerando-se uma atividade antiparasitária com 100% de morte, destacam-se a buparvaquona, a furazolidona, o clotrimazol, o bifonazol e a nifedipina (Figura 7).

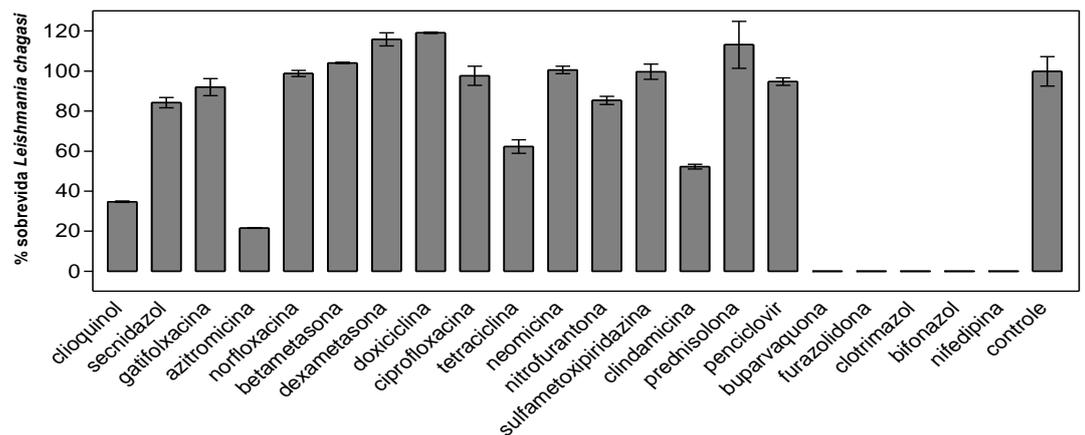


Figura 7: Porcentagem de sobrevivência de promastigotas de *L. (L.) chagasi* submetidos aos fármacos sintéticos na concentração de 100 µg/mL, pelo método do MTT.

4.2 Determinações da concentração efetiva 50% (CE₅₀) dos fármacos ativos sobre promastigotas de *L. (L.) chagasi*

Partindo-se da diluição seriada dos fármacos ativos, foi possível determinar as relativas CE₅₀, após sua incubação e posterior ensaio

de viabilidade celular. O fármaco buparvaquona apresentou o menor valor de CE_{50} e será tratado separadamente no item 4.3. Após a buparvaquona, o fármaco furazolidona foi o mais ativo contra a forma promastigota de *L. (L.) chagasi*, com um valor de CE_{50} de 0,71 $\mu\text{g/mL}$, seguido do clotrimazol (CE_{50} de 3,1 $\mu\text{g/mL}$), bifonasol (CE_{50} de 12,1 $\mu\text{g/mL}$) e nifedipina (CE_{50} de 13,5 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 2 e Figura 8).

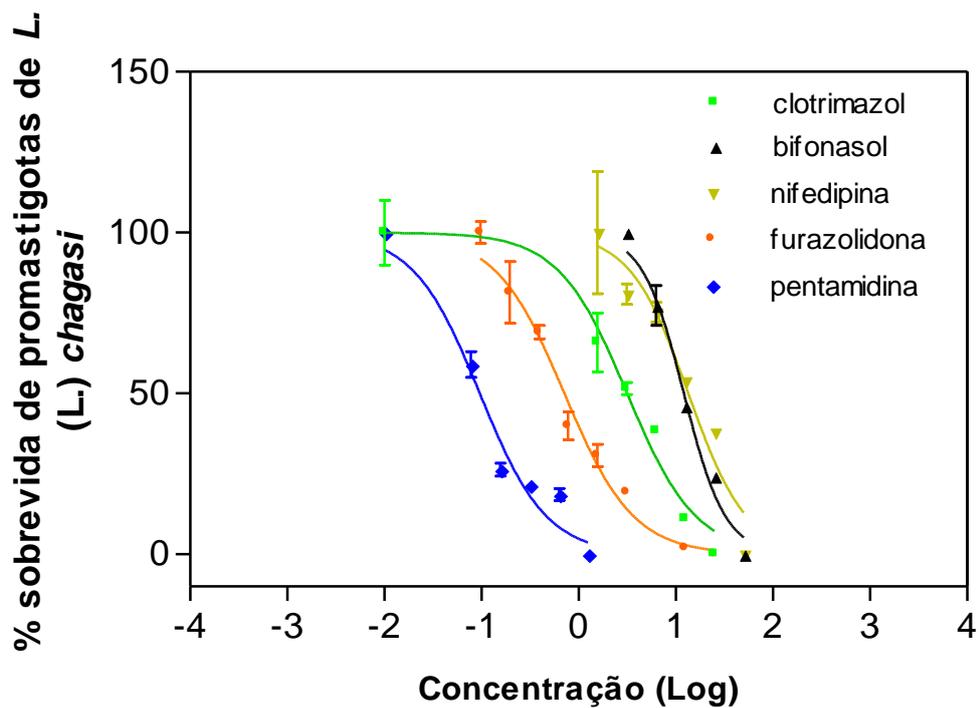


Figura 8: Curva dose-resposta dos fármacos ativos sobre formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (exceto buparvaquona). Pentamidina foi utilizada como fármaco padrão.

Tabela 2: Atividade anti-*Leishmania* dos fármacos ativos sobre *L. (L.) chagasi* (exceto buparvaquona). Pentamidina foi utilizado como fármaco padrão.

Fármaco	CE₅₀ (µg/mL) (IC 95%)
promastigotas <i>L. (L.) chagasi</i>	
clotrimazol	3,1 (2,21 – 4,52)
bifonazol	12,1 (9,26 – 15,91)
nifedipina	13,5 (8,71 – 20,88)
furazolidona	0,71 (0,56 – 0,90)
pentamidina	0,09 (0,08 – 0,11)

4.3 Estudos do fármaco buparvaquona

4.3.1 Determinação da CE₅₀ em promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi*

Dentre os fármacos triados, o antiprotozoário buparvaquona demonstrou melhor atividade *in vitro*, com uma CE_{50} em promastigotas de *L. (L.) chagasi* de 0,13 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% 0,10 a 0,16 $\mu\text{g/mL}$). A figura 9 mostra a curva dose-resposta do fármaco buparvaquona e da pentamidina em promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

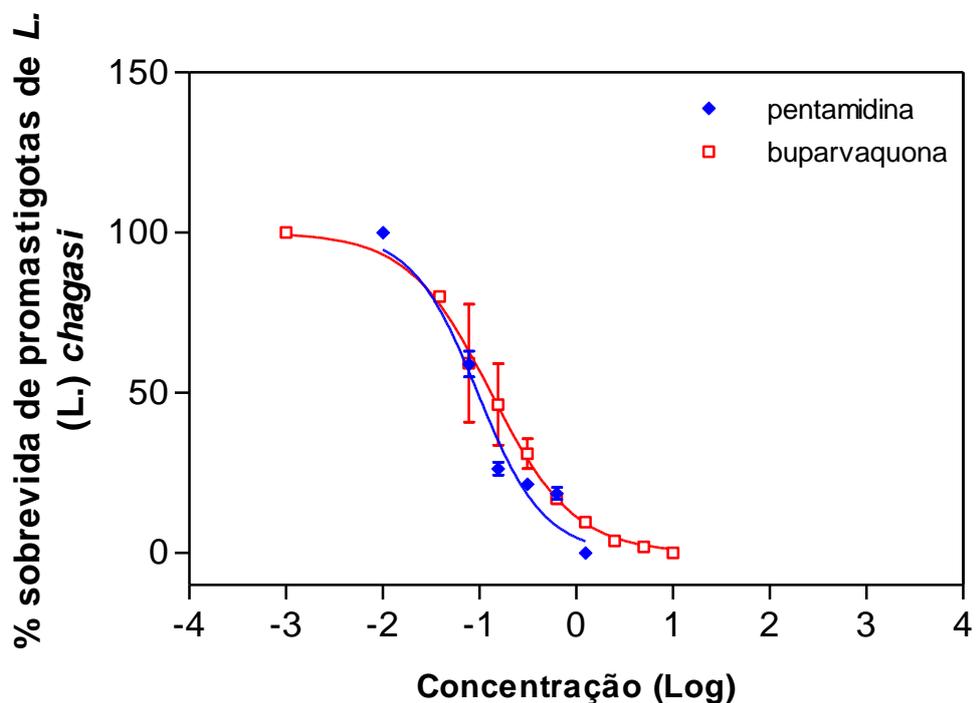


Figura 9: Curva dose-resposta do fármaco buparvaquona sobre formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*. Pentamidina foi utilizada como fármaco padrão.

Por apresentar baixa citotoxicidade em relação à atividade contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*, o fármaco buparvaquona foi testado contra amastigotas intracelulares do parasita (Figura 10).

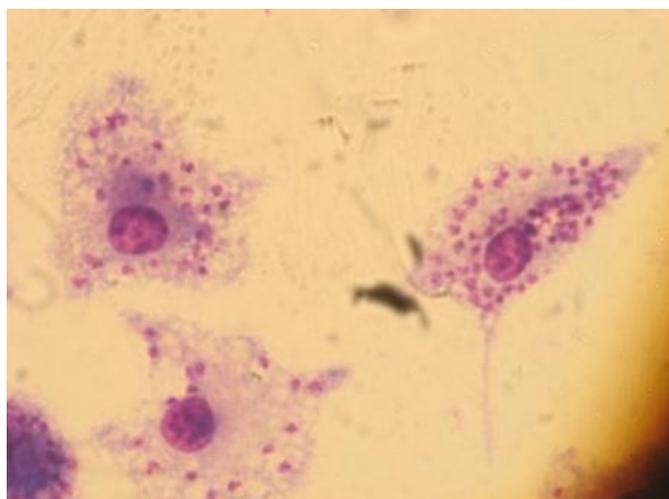
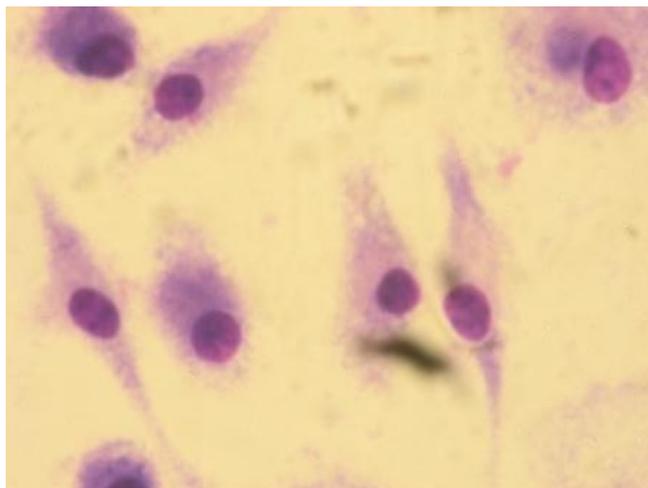


Figura 10: Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) chagasi* e tratados por 120 horas com o fármaco buparvaquona (A) a 3 µg/mL e controle sem tratamento (B). As lâminas foram coradas com Giemsa e observadas em microscopia óptica.

A buparvaquona apresentou uma CE_{50} em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) chagasi* de 0,46 $\mu\text{g/mL}$ (IC 95% 0,36 a 0,60 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 11).

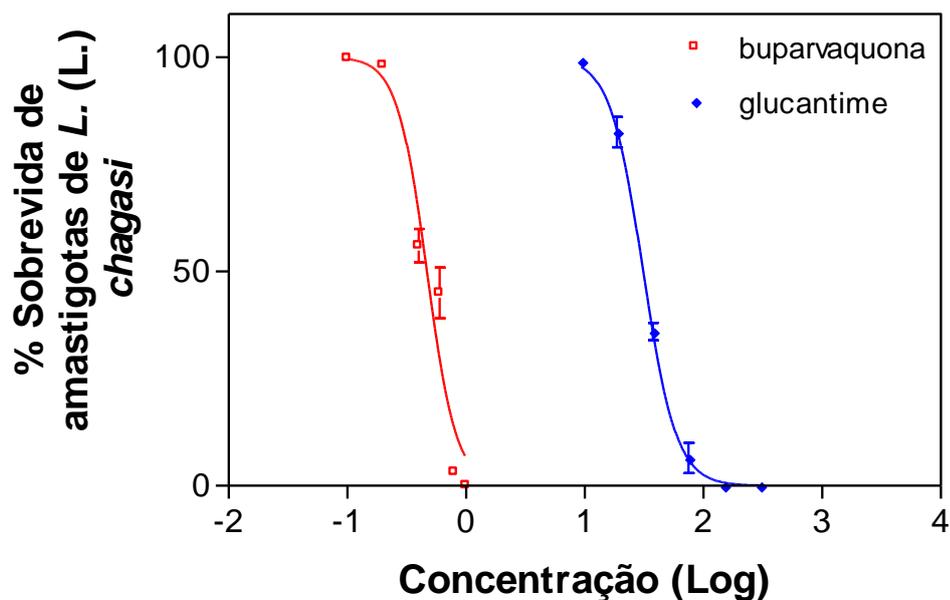


Figura 11: Curva dose-resposta do fármaco buparvaquona sobre formas amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Glucantime foi utilizado como fármaco padrão.

A tabela 3 mostra os valores de CE_{50} do fármaco buparvaquona e padrões contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Tabela 3: Valores de CE₅₀ do fármaco buparvaquona e padrões contra promastigotas e amastigotas de *L. (L.) chagasi*. Nd = não determinado.

Fármaco	CE ₅₀ (µg/mL)	
	(IC 95%)	
	Promastigotas <i>L. (L.) chagasi</i>	Amastigotas <i>L. (L.) chagasi</i>
Buparvaquona	0,13 (0,12 – 0,14)	0,46 (0,36 – 0,60)
Pentamidina	0,09 (0,08 – 0,11)	nd
Glucantime	nd	31,15 (30,34 – 31,98)

4.3.2 Determinação da citotoxicidade da buparvaquona e atividade hemolítica.

O fármaco buparvaquona foi incubado por 48 horas com células LLC-MK2, utilizando-se a concentração máxima de 75 µg/mL. Não foi observada diferença significativa ($p < 0.05$) entre a viabilidade do grupo controle (não tratado) e do grupo tratado com a buparvaquona (Fig. 12). Os fármacos pentamidina e anfotericina B foram utilizados como controle em células THP-1 e apresentaram uma CE_{50} de 5,51 µg/mL (IC 95%= 3,79 - 8,00 µg/mL) e 3,88 µg/mL (IC95%= 2,83 - 5,32 µg/mL), respectivamente.

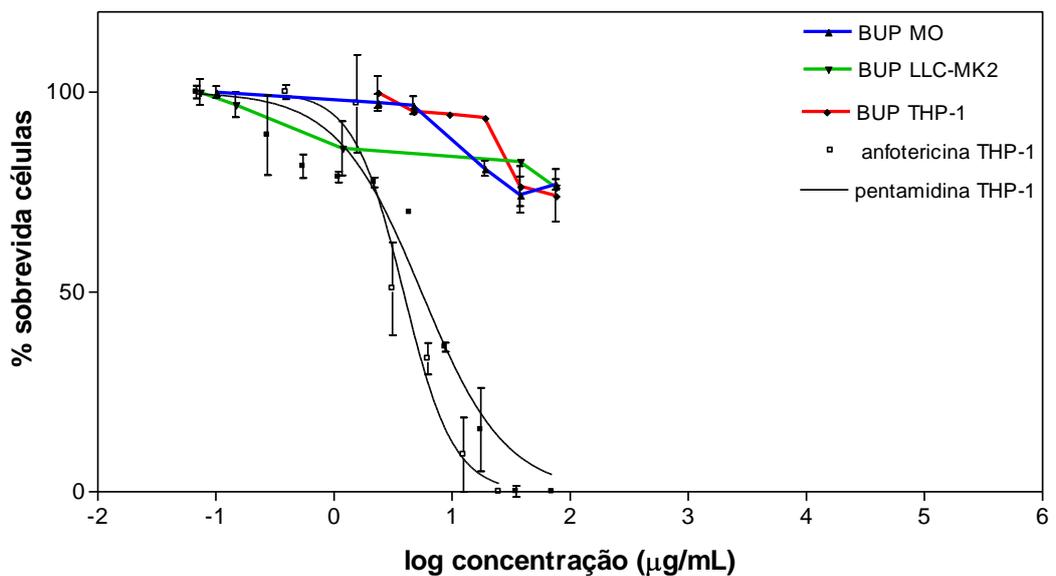


Fig. 12. Avaliação da citotoxicidade da buparvaquona em células de mamífero. A viabilidade foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT a 550 nm.

A incubação do fármaco buparvaquona com hemácias de camundongo não resultou em atividade hemolítica até a concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 13).

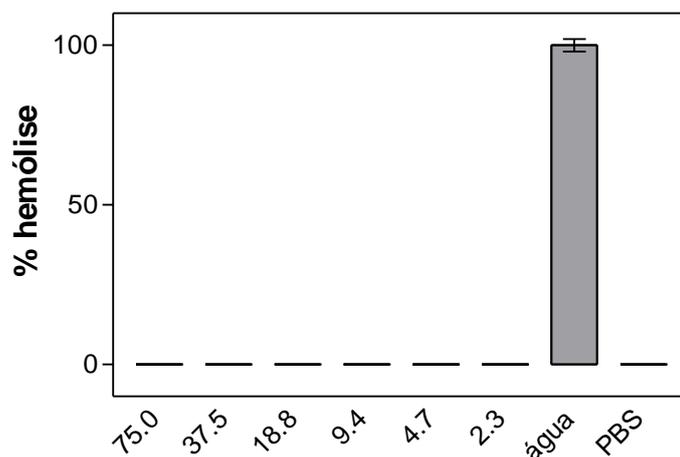


Fig. 13. Avaliação da atividade hemolítica da buparvaquona em eritrócitos de camundongo. A leitura da densidade óptica foi realizada a 550 nm, utilizando-se água como controle positivo do ensaio (100% hemólise).

4.3.3 Avaliação da produção de óxido nítrico

A incubação do fármaco buparvaquona com macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c à concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ não induziu a produção de óxido nítrico (Figura 14). Por meio da reação de Griess, foi possível observar também que este fármaco não inibiu a produção de óxido nítrico pelo macrófago, quando incubado juntamente com LPS.

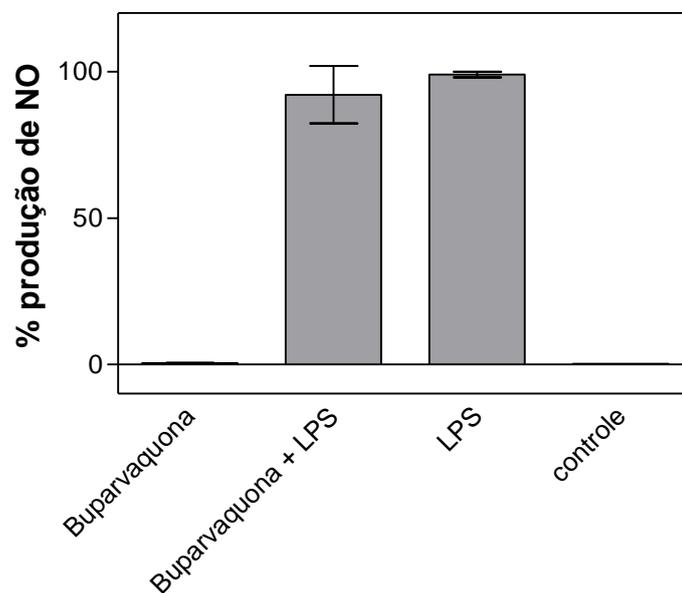


Figura 14: Efeito do fármaco buparvaquona sobre a produção de óxido nítrico por macrófagos. Os macrófagos foram cultivados na presença e ausência de lipopolissacarídeo (LPS) e na presença do fármaco.

5. DISCUSSÃO

O uso da “*piggy-back chemotherapy*” ou “*therapeutic switching*” tem sido uma das abordagens mais importantes na introdução clínica de novos fármacos anti-*Leishmania* (Croft et al, 2006). Consiste na triagem farmacológica de medicamentos já disponíveis clinicamente para outras patologias, possibilitando assim, uma considerável redução do tempo e dos custos relacionados ao desenvolvimento de um novo fármaco. Os fármacos anfotericina, fluconazol e cetoconazol (antifúngicos), pentamidina (hipoglicemiante) e miltefosina (antitumoral) são exemplos de “*piggy-back chemotherapy*” na Leishmaniose (Croft et al, 2006). Em nosso estudo, a escolha dos fármacos foi empírica, com exceção da buparvaquona e dos antifúngicos azólicos, pois já haviam sido descritas atividade contra *Leishmania* spp.

A partir da triagem de 21 fármacos sintéticos, utilizados para outras patologias, encontramos atividade anti-*Leishmania* em cinco fármacos testados, sendo eles clotrimazol, bifonazol, nifedipina, furazolidona e buparvaquona. No presente trabalho, os fármacos clotrimazol e bifonazol apresentaram expressiva atividade anti-*Leishmania*. Além disso, a atividade encontrada em *L. (L.) chagasi* é inédita na literatura para ambos. Clotrimazol e bifonazol são antifúngicos de amplo espectro da classe dos azóis. O clotrimazol é indicado para o tratamento de infecções da região genital causadas

por fungos (mais freqüentemente *Candida*) e superinfecções causadas por bactérias (Kyle e Dahi, 2004). O bifonazol atua eficazmente sobre dermatófitos, leveduras, hifomicetos e outros fungos como *Malassezia furfur* (Rubin et al., 2002). Outros azóis como o cetoconazol e o itraconazol têm mostrado bons resultados contra leishmaniose cutânea (Albanese et al., 1989, Dogra et al., 1990). O modo de ação dos azóis nos fungos (cetoconazol e itraconazol) é baseado na inibição de demetilação do lanosterol a ergosterol. Estes efeitos causam modificações ultraestruturais em membranas celulares e processos de autofagia induzem a morte do *Leishmania* (Vannier Santos et al., 1995). Sendo assim, a atividade anti-*Leishmania* encontrada em nossos ensaios para o clotrimazol e bifonazol pode também ser resultado de um mesmo mecanismo de ação, contudo estudos adicionais serão necessários para confirmação.

O presente trabalho demonstra pela primeira vez a atividade anti-*Leishmania* da nifedipina. A nifedipina é um bloqueador de canal de cálcio, da classe das diidropiridinas, usado no tratamento da hipertensão. É relatada atividade anti-*Leishmania in vitro* de duas diidropiridinas, amlodipina e lacidipina. Ambas trataram eficazmente macrófagos infectados com *L. (L.) donovani*, com um valor CE_{50} de 5,1 e 6,6 μ M respectivamente (Palit e Ali 2008). Dois outros bloqueadores de canal de cálcio, isradipina e lacidipina, igualmente mostraram atividade antitripanosoma, matando epimastigotas extracelulares de *T. cruzi* em concentrações entre 20 e 31 μ M. No

entanto, verapamil e diltiazem não mostraram atividade antitripanosoma (Núñez-Vergara et al., 1998), o que indica que os parasitas podem apresentar suscetibilidades diferentes para os bloqueadores de canal de cálcio. Coelho e colaboradores (2003) descreveram a ação do verapamil na reversão da resistência a pentamidina por *Leishmania major*. Resultados apresentados por nosso grupo demonstraram a atividade anti-*L. (L.) chagasi* de outro fármaco da classe das diidropiridinas, a nimodipina (Tempone et al., 2009). Comparando-se os valores de Concentração Efetiva 50% da nimodipina com a nifedipina, observa-se que as formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* são mais sensíveis a nifedipina.

A furazolidona é um nitrofurano sintético, com atividade antibacteriana e antiprotozoária. É ativo contra uma série de microorganismos incluindo *Staflococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp (Llovet et al., 1990) e *Pneumocystis carinii* (Walzer, Kim, Foy, 1991) e possui propriedades anti-ulcerativas (Zhao et al., 1985). A furazolidona é usada no tratamento de tricomoníase (Giron Blanc, 1959), cólera, giardíase (Webster, 1960; Lerman, Walker, 1982; Khaw, Panosian, 1995) e contra *Helicobacter pylori* (Cianci et al., 2006; Guslandi 2001). Existem poucos estudos de furazolidona contra espécies de *Leishmania* na literatura, e os trabalhos disponíveis datam de mais de 20 anos atrás. Foi relatada a atividade anti-*Leishmania* de furazolidona contra *L. tropica* (Berman, Lee 1983), *L. (L.) donovani*, *L.*

(*L.*) *enrietti* e *L.* (*L.*) *major* (Neal, Bueren, Hooper, 1988), com valores de CE₅₀ entre 0,33 e 3,26 µg/mL. Sua atividade contra *L.* (*L.*) *chagasi* nunca foi descrita na literatura. Berman e Lee (1983) testaram a atividade anti-*Leishmania in vitro* da furazolidona contra *L.* (*L.*) *tropica* em macrófagos e demonstraram que este fármaco é capaz de eliminar 92% dos parasitas na concentração de 1 µg/mL e possui um valor de CE₅₀ de 0,53 µg/mL (Berman, Lee, 1983). O valor de CE₅₀ obtido por Berman e Lee contra amastigotas de *L.* (*L.*) *tropica* (0,53 µg/mL) é próximo ao encontrado no presente trabalho em promastigotas de *L.* (*L.*) *chagasi* (0,71 µg/mL), o que comprova que a furazolidona é um agente eficaz *in vitro* contra espécies de *Leishmania*. Quando administrado por via oral a camundongos, a furazolidona mostrou baixa toxicidade, com um valor de dose letal 50% (DL₅₀) de 1,78 g/kg (Beveridge et al., 1980). A furazolidona também se mostrou pouca ativa em modelos *in vivo* quando administrada oralmente a camundongos infectados com *L. donovani* (Neal et. al, 1988). Costa et al. (1985) demonstraram ausência de atividade clínica da furazolidona administrada oralmente a pacientes com as lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* e sugeriram que os resultados foram devidos à pobre absorção oral do fármaco. Nosso grupo de pesquisa no Instituto Adolfo Lutz demonstrou recentemente que a furazolidona apresenta atividade *in vivo* contra *L.*(*L.*) *chagasi*, com significativa efetividade antiparasitária quando comparada ao Glucantime (Tempone et al., 2010).

Dentre os fármacos testados neste trabalho, a buparvaquona demonstrou o menor valor de CE₅₀ contra *L. (L.) chagasi*. A buparvaquona é uma hidroxinaftoquinona com atividade antiprotozoária, relacionada à parvaquona e à atovaquona. Este composto é a única terapia eficiente no tratamento da teleriose bovina (*Theileria bovis*), onde é usada desde os anos 1980. Existem relatos de atividade anti-*Leishmania in vitro* da buparvaquona, porém sua atividade contra *L. (L.) chagasi* nunca havia sido descrita antes. Croft e colaboradores (1992) mostraram que buparvaquona é ativa contra promastigotas de *L. (L.) donovani* e também apresenta elevada atividade *in vitro* contra amastigotas em macrófagos peritoneais, com valor de CE₅₀ de 0,05 µM. Em modelo animal (camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*), o tratamento com buparvaquona a 10mg/kg por cinco dias reduziu em 60% o número de amastigotas no fígado (Croft et al., 1992). Os resultados encontrados no presente estudo com *L. (L.) chagasi* são semelhantes aos encontrados por Croft e colaboradores (1992) com *L. (L.) donovani*, mostrando que o fármaco buparvaquona é um potente candidato a fármaco para os estudos em modelos animais para o agente etiológico da LV no Brasil. Além disso, foi observado que este fármaco apresentou um valor de CE₅₀ muito semelhante à pentamidina, fármaco de segunda escolha no tratamento da LV e utilizada com padrão em nossos ensaios com promastigotas. Quanto à citotoxicidade, verificou-se que a buparvaquona não afeta a viabilidade das linhagens de células de

mamíferos testadas, apresentando assim, um Índice de Seletividade maior que 160. Além disso, a buparvaquona não mostrou nenhuma atividade hemolítica até a concentração máxima testada, confirmando seu potencial in vitro contra *L.(L.) chagasi*.

A atividade do fármaco buparvaquona contra promastigotas de *L. (L.) chagasi* conduziu-nos ao ensaio com amastigotas intracelulares. Normalmente, a atividade anti-*Leishmania* é avaliada em promastigotas axênicos devido à praticidade, pois os promastigotas são mantidos axenicamente em meio de cultura. No entanto, os amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi* são as formas de importância médica e devem ser também avaliadas, já que apresentam um padrão metabólico distinto e resistência maior que as formas promastigotas extracelulares (Rabinovitch M, Alfieri SC, 1987). Além disso, os macrófagos representam um obstáculo para as drogas testadas, pois elas precisam cruzar sua membrana para alcançar o parasita dentro do vacúolo parasitóforo. No ensaio com amastigotas intracelulares, a buparvaquona demonstrou significativa atividade leishmanicida, matando 100% dos amastigotas sem comprometer a viabilidade e morfologia da célula hospedeira. Até o momento na literatura, não foram encontradas informações sobre atividade contra *L. (L.) chagasi* deste fármaco.

A produção de óxido nítrico pelo macrófago após a incubação com o fármaco buparvaquona foi mensurada, com o objetivo de avaliar se a morte dos amastigotas intracelulares está relacionada à

ativação do macrófago. O óxido nítrico é um metabólito freqüentemente produzido pelos macrófagos como um mecanismo defensivo contra microorganismos (Balestieri et al., 2002). Não foi observado aumento na produção de óxido nítrico pelos macrófagos na presença da buparvaquona, o que sugere que seu mecanismo de ação contra os amastigotas intracelulares não está relacionado à via ativação do macrófago. Sugere-se que o efeito anti-*Leishmania* do antimônio pentavalente deve-se à ativação da célula do hospedeiro, indicando a necessidade da ação das células-T funcionais para a atividade deste fármaco (Mookerjee-Basu et al., 2006). Assim, pacientes imunocomprometidos como os portadores de SIDA co-infectados com *Leishmania* spp podem apresentar maiores falhas terapêuticas quando tratados com antimônio (Mookerjee-Basu et al., 2006). Nossos dados sugerem que a buparvaquona é capaz de eliminar os amastigotas intracelulares por meio de outro mecanismo de ação, provavelmente envolvendo uma atividade anti-*Leishmania* específica que não depende da produção de óxido nítrico pelo macrófago. Os resultados indicam que o fármaco buparvaquona é um potente composto anti-*Leishmania* que poderia ser utilizado para estudos de relação estrutura-atividade como protótipo e candidato a fármaco para o tratamento da LV.

Considerando a necessidade de terapias menos tóxicas para a LV, a buparvaquona representa uma promissora ferramenta para os estudos *in vivo*, devido à potente atividade *in vitro* contra *L. (L.)*

chagasi e seletividade *in vitro*. Vexenat e colaboradores (1998) relatam um estudo em que sete cães portadores de LV canina foram submetidos a injeções, por via intramuscular, de buparvaquona (5mg/kg por 12 dias). Os cães apresentaram nenhuma ou apenas melhora parcial dos sinais da doença. Um dos objetivos do DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative) para os próximos anos é o estudo de novas formulações orais, usando sistemas de liberação de buparvaquona para o tratamento da LV (Dndi, 2009). Mantyla e colaboradores (2004) realizaram a síntese de derivados de buparvaquona, que foram testados *in vitro* contra *L. (L.) donovani*. Como parte do estudo para o desenvolvimento de formulações de buparvaquona para o tratamento de leishmaniose cutânea, a entrega tópica de buparvaquona e um pró-fármaco de uma série de formulações foi avaliada por Garnier e colaboradores (2004). Os resultados confirmaram que buparvaquona e um dos pró-fármacos podem penetrar a pele, fazendo dessas formulações potentes candidatos para futuras investigações de formulações tópicas.

Dentre os compostos que não apresentaram atividade contra *L. (L.) chagasi* na concentração testada, estão diversos fármacos como antibióticos, antifúngicos e antiinflamatórios. De acordo com a literatura consultada, estes fármacos não apresentam atividade anti-*Leishmania* ou nunca foram testados para este fim. São eles: azitromicina, betametasona, ciprofloxacina, clindamicina, clioquinol, dexametasona, doxiciclina, gatifolxacina, neomicina, nitrofurantona,

norfloxacina, penciclovir, prednisolona, secnidazol, sulfametoxipiridazina e tetraciclina. Sinagra e colaboradores (2007) avaliaram a atividade do antibiótico azitromicina contra *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* em hamsteres e concluíram que este fármaco tem a atividade apenas contra *L. (V.) braziliensis* neste modelo. Sua eficácia *in vivo* é controversa, pois Teixeira e colaboradores (2008) mostraram que a azitromicina não foi eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea em testes clínicos.

Os resultados encontrados até agora nestes estudos representam uma importante contribuição para futuros estudos experimentais. O presente trabalho pode também contribuir com novas moléculas para estudos de modelagem molecular ou mesmo para a química sintética. Através destes estudos, novos análogos poderiam ser sintetizados mantendo-se o protótipo e o grupamento farmacofórico da molécula, a fim de se preservar sua atividade anti-*Leishmania* e aumentar sua seletividade no parasita.

6. CONCLUSÕES

- A triagem de 21 fármacos sintéticos demonstrou a atividade anti-*Leishmania chagasi* de cinco compostos, sendo eles: buparvaquona, furazolidona, clotrimazol, bifonasol e nifedipina.
- A avaliação do potencial farmacológico dos fármacos ativos indicou valores promissores de CE₅₀ em culturas *in vitro* de promastigotas de *L. (L.) chagasi*.
- Dentre os fármacos ativos, a buparvaquona demonstrou o menor valor de CE₅₀ contra promastigotas de *L. (L.) chagasi*.
- A buparvaquona demonstrou baixa toxicidade contra células de mamíferos, nenhuma atividade hemolítica e elevada atividade contra amastigotas intracelulares de *L. (L.) chagasi* quando comparada aos fármacos padrões.
- Não foi observado aumento na produção de óxido nítrico pelos macrófagos na presença da buparvaquona, sugerindo que este fármaco apresenta uma atividade antiparasitária específica e que seu mecanismo de ação não está diretamente relacionado à ativação do macrófago.

- A buparvaquona é um potencial candidato a fármaco para os estudos em modelos animais com *L.(L.) chagasi*

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albanese G, Giorgetti P, Santagostino L, Crippa D, Sala G. Cutaneous leishmaniasis: treatment with itraconazole. *Arch Dermatol.* 1989, 125:1540-2.

Alencar JE, Neves, J. Leishmaniose Visceral (calazar) In: *Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982, p. 724-38.

Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J. Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 2004, 57:1-87.

Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006, 22:552-7.

Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad. Saúde Pública.* 2004, 20:p. 259-65.

Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría C, Ordóñez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmac.* 1998, v. 30, p. 435-43.

Balestieri FM, Queiroz AR, Scavone C, Costa VM, Barral-Neto M, Abrahamsohn Ide A. *Leishmania (L.) amazonensis* induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. *Microbes Infect.* 2002, 4:23-9.

Berman JD, Lee LS. Activity of oral drugs against *Leishmania Tropic* in human macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg.* 1983, 32:947-51.

Bogdan C, Schonian G, Banuls AL, Hide M, Pratlong F, Lorenz E, Rollinghoff M, Mertens R. Visceral leishmaniasis in a German child who had never entered a known endemic area: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis.* 2001 v. 32, n. 2, p. 302-06.

Cardoso L, Cabral M. *Leishmania* e leishmaniose canina. *Rev Port Cien Vet.* 1999, 13:121-41.

Castro-Souza F, Paranhos-Silva M, Sherlock I, Paixão MS, Pontes-de-Carvalho LC, Dos-Santos WLC. Dissociation between vasodilation and *Leishmania* infection-enhancing effects of sand fly saliva and maxadilan. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006, 96:997-9.

Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaer M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature.* 2007, 5:S7-16.

Cianci R, Montalto M, Pandolfi F, Gasbarrini GB, Cammarota G. Third-line rescue therapy for *Helicobacter pylori* infection. *World J Gastroenterol.* 2006, 12:2313-9.

Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine

resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003 Aug 31;130(2):83-90.

Conceição K, Konno K, Richardson M, AntoniazziMM, Jared C, Daffre S, Camargo AC, Pimenta DC. Isolation and biochemical characterization of peptides presenting antimicrobial activity from the skin of *Phyllomedusa hypochondrialis*. *Peptides*. 2006, 27:3092-9.

Costa JML, Sampaio RN, Tada MS, Almeida EA, Veiga EP, Magalhães AV, Marsden PD. Furazolidone treatment of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1985, 79:274.

Croft SL, Hogg J, Gutteridge WE, Hudson AT, Randall AW. The activity of hydroxynaphthoquinones against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 1992, 30:827-32.

Cupolillo E. Avanços dos estudos moleculares de *Leishmania (Leishmania) chagasi* aplicados ao diagnóstico de LV no Brasil. In: Consulta de Expertos OPS/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral em Las Americas. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud. 2006, p. 58-62.

Dantas-Torres F, Brandão-Filho SP. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. *Rev Inst Med Trop*. 2006, 3:151-6.

Deane LM, Veronesi R. Leishmaniose Visceral. In: Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1962, p 519-36.

Dereure J, Duong-Thanh H, Lavabre-Bertrand T, Cartron G, Bastides, F, Richard-Lenoble D, Dedet JP. Visceral leishmaniasis. Persistence of parasites in lymph nodes after clinical cure. J Infect. 2003 v. 47, n. 1, p. 77-81.

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp.Immunol. Microbiol Infect Dis. 2004, 27:305-18.

DNDi. DNDi's R&D projects link scientists from around the world. [acesso em 29 set 2009]. Disponível em: <http://www.dndina.org/Downloads/DNDi-PortfolioMap-2008.pdf>.

Dogra J, Aneja N, Lal BB, Mishra SN. Cutaneous leishmaniasis in India: clinical experience with itraconazole (R51 211 Janssen). Int J Dermatol. 1990, 29:661-2.

Elkhoury ANSM. Vigilância e controle da leishmaniose visceral no Brasil. In: Consulta de Expertos OPS/OMS Sobre Leishmaniasis Visceral em Las Americas. Informe final de la reunion de expertos OPS/OMS sobre leishmaniasis em las Américas. Rio de Janeiro: Organización Panamericana de salud. 2006, p. 24-26.

Garnier T, Mantyla A, Jarvinen T, Lawrence MJ, Brown MB, Croft SL. Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol*. 2007, 59:41-9.

GEL/CCD/Sucen/SES-SP. Atualização da classificação epidemiológica dos municípios para a leishmaniose visceral americana. *BEPA*. 2008, 5:50.

Genaro O. Leishmaniose Visceral Americana. In: *Parasitologia Humana*. São Paulo: Atheneu. 2003, p 56-72.

Giron Blanc JJ. Treatment of vaginal trichomoniasis with furazolidone. *Tokoginecol Pract*. 1959, 18:144-51.

Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: Quadro Atual, Desafios e Perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*. 2004, 7:338-49.

Guslandi M. Review article: alternative antibacterial agents for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001, 15:1543-7.

Khaw M, Panosian CB. Human antiprotozoal therapy: past, present, and future. *Clin Microbiol Rev*. 1995, 8:427-39.

Killicck-Kendrick R. The life cycles of *Leishmania* in the sand fly and transmission of leishmaniasis by bite. In: *Canine Leishmaniasis Moving Towards a Solution*. Sevilha: Proceedings of the second international canine leishmaniasis forum. 2002, p. 57-69.

Kyle AA, Dahl MV. Topical therapy for fungal infections. *Am J Clin Dermatol.* 2004,5(6):443-51. Review.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in biology and medicine.* Londres: Academic Press. 1987, p. 291-364.

Lerman SJ, Walker RA. Treatment of giardiasis. Literature review and recommendations. *Clin Pediatr.* 1982, 21:409-14.

Llovet T, Sánchez F, Mirelis B, Prats G. Sensitivity of enteropathogenic bacteria to furazolidone. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1990, 8:449-52.

Lotrowska M, Zackiewscz C. Pesquisas Negligenciam Doenças de Populações Pobres. *Ser Médico.* 2005, 3:10-3.

Machado AL. Calazar - Leishmaniose Visceral. In: *Doenças Infecciosas na Infância.* Rio de Janeiro: Medsi. 1987, p. 747-55.

Mantyla A, Rautio J, Nevalainen T, Vepsalainen J, Juvonen R, Kendrick H, Garnier T, Croft SL, Jarvinen T. Synthesis and antileishmanial activity of novel buparvaquone oxime derivatives. *Bioorg Med Chem.* 2004, 12:3497-502.

Marzochi MCA, Marzochi KBF, Schubach AO. Leishmaniose Visceral Americana (Calazar Americano ou Neotropical). In: Parasitologia Humana e Seus Fundamentos Gerais. São Paulo: Atheneu. 2001, p 65-80.

Mauricio IL, Gaunt MW, Stodard JR, Miles MA. Genetic typing and phylogeny of the *Leishmania donovani* complex by restriction analysis of PCR amplified gp63 intergenic regions. Parasitology. 2001, 122:393-403.

Medeiros IM, Nascimento ELT, Hinrichsen SL. Leishmanioses - Visceral e Tegumentar. In Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005, p. 398-409.

Meinecke CK, Schottelius J, Oskam L, Fleischer B. Congenital transmission of visceral leishmaniasis (Kala Azar) from an asymptomatic mother to her child. Pediatrics. 1999, v. 104, n. 5

Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar): Normas Técnicas. Brasília (DF). 1999.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e AIDS. Manual de Recomendação para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção leishmania/HIV. Brasília (DF). 2004.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF). 2006.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. Brasil, 2009. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2004/d0205.def> > Acesso em 29 de setembro de 2009.

Mookerjee-Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S. Antimony Gluconate Induces Generation of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide via Phosphoinositide 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in *Leishmania donovani*-Infected Macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50:1788-97.

Neal RA, van-Bueren J, Hooper G. The activity of nitrofurazone and furazolidone against *Leishmania donovani*, *L. major* and *L. enriettii* in vitro and in vivo. *Ann Trop Med Parasitol* 1988, 82:453-6.

Núñez-Vergara LJ, Squella JA, Bollo-Dragnic S, Marín-Catalán R, Pino L, Díaz-Araya G, Letelier ME. Isradipine and lacidipine: effects in vivo and in vitro on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Gen Pharmacol.* 1998, 30:85-7.

Oliver M, Gregory DJ, Foget G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune responses: a signaling point of view. Clin Microbiol Rev. 2005, 18:293-305.

Orsini M, Silva M, Luz ZM, Disch J, Fernandes O, Moreira D, Guedes AC, Rabello A. Identification of Leishmania chagasi from skin in Leishmania/HIV co-infection: a case report. Rev Soc Bras Med Trop. 2002,v. 35, n. 3, p. 259-62.

Palit P, Ali N. Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1, 4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral Leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother. 2008, 52:374-77.

Panaro MA, Acquafredda A, Lisi S, Lofrumento DD, Trotta T, Satalino R et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production in Leishmania infantum-infected human macrophages stimulated with interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Int J Clin Lab Res. 1999, 29:122-7.

Pereira G, Machado G, Pereira R, Gadelha J, Barbosa ML. Leishmaniose Visceral em Pernambuco (dados epidemiológicos). Bol trim Clín Doenças Infect Parasit. 1985, 1: 53-70.

Pessoa SB. Calazar. In: Endemias Parasitárias da Zona Rural Brasileira. São Paulo: Prociencx. 1963, p. 457-89.

Pessoa SB. Histórico da Geografia Médica; Educação Sanitária; Universidade Ensino e Pesquisa. In: Ensaio Médico-Sociais. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1960, p. 9-171.

PubChem Compound. [acesso em 29 set 2009]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>.

Rabinovitch M, Alfieri SC. From lysosomes to cells, from cells to Leishmania: amino acid esters as potential chemotherapeutic agents. Braz J Med Biol Res. 1987, 20:665-674.

Ribeiro TA, Campos S. Leishmaniose Visceral (Calazar). [acesso em 25 set 2009]. Disponível em: <http://www.drashirleydecampos.com.br>.

Ribeiro VM, Michalick MSM. Leishmaniose, Estratégia de Controle. Nosso Clínico. 2001, 24:10.

Ribeiro VM, Rajão RA, De-Araújo-Diniz S, Michalick MSM. Evaluation of the potential transmission of visceral leishmaniasis in a canine shelter. Rev Méd Vet. 2005, 156:20-22.

Rubin AI, Bagheri B, Scher RK. Six novel antimycotics. Am J Clin Dermatol. 2002,3(2):71-81. Review

SacksD, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector host interactions in leishmaniasis. Annu Rev Microbiol. 2001, 55:453-83.

Sartorelli P, Andrade SP, Melhem MSC, Prado FO, Tempone AG. Isolation of Antileishmanial Sterol from the Fruits of *Cassia fistula* using Bioguided Fractionation. *Phytother Res.* 2007, 21:644-7.

Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella Mdel C, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2007, 40:627-30.

Stauber LA, Franchino EM, Grun J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *J Protozool.* 1958, 5:269-73.

Sucen - Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. *Leishmaniose Visceral Americana.* São Paulo (SP). 2001.

Sucen. Vetores e Doenças - Leishmaniose Visceral Americana. [acesso em 29 set 2009]. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/atuac/tegume.html>.

Sundar S, Rai M. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2002, Dec; 15(6):593-8.

Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto M. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods*. 1986, 93:157-65.

Tempone AG, Mortara RA, de Andrade HF Jr, Reimão JQ. Therapeutic evaluation of free and liposome-loaded furazolidone in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010, Aug;36(2):159-63. Epub 2010 May 31.

Teixeira AC, Paes MG, Guerra Jde O, Prata A, Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008, 50:157-60.

Tempone AG, Taniwaki NN, Reimão JQ. Antileishmanial activity and ultrastructural alterations of *Leishmania (L.) chagasi* treated with the calcium channel blocker nimodipine. *Parasitol Res*. 2009, 105:499-505.

Val APC. Tratamento da Leishmaniose Visceral Canina com Antimonial Pentavalente Encapsulado em Lipossomas. [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2004.

Vannier-dos-Santos MA, Martiny A, Meyer-Fernandes JR, de-Souza W. Leishmanial PKC modulates host cell infection via secreted acid phosphatase. *Eur J Cell Biol*. 1995, 67:112- 9.

Vexenat JA, Croft SL, Campos JHF, Miles MA. Failure of buparvaquone (Butalex) in the treatment of canine visceral leishmaniosis. *Vet Parasit.* 1998, 77:71-3.

Walzer PD, Kim CJ, Foy J. Furazolidone and nitrofurantoin in the treatment of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991, 35:158-63.

Webster BH. Furazolidone in the treatment of giardiasis. *Am J Dig. Dis.* 1960, 5:618-22

World Health Organization. Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços. [acesso em 01 set 2005]. Disponível em <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en>.

Zhao HY, Li GZ, Guo JD, Yan Z, Sun SW, Li LS, Duan YM, Yue FZ. Furazolidone in peptic ulcer. *Lancet.* 1985, 3:276.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
CTC / IAL



APROVAÇÃO DE PROJETO DE PESQUISA - CTC

IAL/CCD/CEPIAL/CTC

Projeto CCD- BM/Nº 16/2004

Coordenador (a): André G Tempone Cardoso

Título do projeto: Avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos sintéticos e plantas medicinais brasileiras no tratamento da Leishmaniose e Doenças de Chagas.

Sr. Coordenador:

Comunicamos que o projeto acima citado foi aprovado na CEPIAL (ética), CCD-BM (mérito) e cadastrado no Conselho Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz - CTC em 12/5/2005

Atenciosamente

Myrna Sabino
Presidente do CTC/IAL

Via 1: Coordenador
Via 2: CCD
Via 3: CTC



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 25 de abril de 2005

Ilmo(a) Sr(a): **ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE CARDOSO**

Coordenador(a) do Projeto de Pesquisa: **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NOVOS FÁRMACOS SINTÉTICOS E PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE E DOENÇA DE CHAGAS.**

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL), em reunião apresentou o PARECER, enquadrando o referido projeto na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução 196/96 sobre Pesquisas Envolvendo Seres Humanos / CNS / MS , Brasília, 1996.

Atenciosamente

Dra. Júlia Maria Martins de Souza Felipe
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Adolfo Lutz
CEPIAL