



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MORGANA VITAL DE ARAÚJO

**ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DA
CAMBRETASTATINA A-4: UMA PROPOSTA PARA NOVAS ESTRATÉGIAS NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

MACEIÓ- AL
2013

MORGANA VITAL DE ARAÚJO

**ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DA
CAMBRETASTATINA A-4: UMA PROPOSTA PARA NOVAS ESTRATÉGIAS NO
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Magna Suzana
Alexandre Moreira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lídia Moreira Lima

MACEIÓ- AL

2013

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

A663e Araújo, Morgana Vital de.

Estudo da atividade leishmanicida dos derivados da cambretastatina A-4: uma proposta para duas estratégias no tratamento da leishmaniose / Morgana Vital de Araújo. – 2013.

77 f. : il.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Coorientadora: Lídia Moreira Lima.

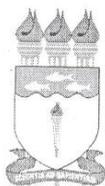
Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2013.

Bibliografia: f. 68-76.

Anexos: f. 77.

1. Cambretastatina A4. 2. Promastigota. 3. Leishmania. 4. Atividade leishmanicida. 5. Parasitos e viabilidade celular. I. Título.

CDU: 616.993.161:615.283



Universidade Federal de Alagoas
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

ICBS - UFAL – Campus A. C. Simões
Av. Lourival Melo Mota, S/N
Cidade Universitária – Maceió-AL
CEP: 57072-900
E-mail: ppgcs9@gmail.com
Fone: 82 3214 1850

Defesa da Dissertação de Mestrado da mestranda Morgana Vital de Araújo, intitulada: “Estudo da atividade leishmanicida de derivados da cambretastatina A4: uma proposta para novas estratégias no tratamento da Leishmaniose”, orientada pela Prof.^a Dr.^a Magna Suzana Alexandre Moreira, apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Alagoas, em 08 de julho de 2013.

Os membros da Banca Examinadora consideraram a candidata Aprovada.

Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Rosângela Alves Falcão – (UPE)


Prof.^a Dr.^a Eliane Aparecida Campesatto – (UFAL)


Prof. Dr. Olagide Wagner de Castro – (UFAL)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pelas melhores dádivas da vida, pela minha experiência e formação, pelo amor da minha família, pela concretização de mais uma etapa de vida.

À MINHA FAMÍLIA, principalmente a minha mãe ANA e a meus irmãos MICHAEL e MAX, pelos valores morais e éticos que norteiam minha vida e pelo apoio mesmo de longe durante mais essa jornada.

Ao meu sobrinho KARL MAX VITAL, que trouxe a luz aos nossos sorrisos;

À minha adorável AVÓ MARINALVA VITAL, por ter me ensinado um dos sentimentos mais belos que existe, a ter fé em Deus, e por estar sempre me protegendo desde minha infância;

À Profa. Dra. MAGNA SUZANA ALEXANDRE MOREIRA pela orientação, dedicação, amizade e competência ao longo deste trabalho. Agradeço por me ensinar a ser uma profissional melhor e pelas valiosas lições de vida.

À Profa. Dra. LÍDIA MOREIRA LIMA, pelo auxílio na orientação. Agradeço pelo apoio e dedicação neste trabalho.

À profa. Dra. ELIANE CAMPESATTO por me abrir portas ao aceitar ser minha orientadora como aluna PIBIC e por sua amizade, apoio e companheirismo;

Aos PROFESSORES que compõem o corpo docente da UFAL, grandiosos mestres da sabedoria, obrigada pelos ensinamentos;

Aos meus companheiros de mestrado CAROLINA BRITO e LUIZ HENRIQUE AGRA, pelo ombro amigo, companheirismo nessa caminhada, pelos risos e gargalhadas, conselhos e ensinamentos, vocês compartilharam momentos decisórios da minha vida;

A grande pesquisadora ALINE CAVALCANTI, esta possui qualidades únicas, exemplo de pesquisadora e bondade, sempre disposta a ajudar ao próximo, a passar seu conhecimento, só tenho a agradecer por todo o apoio, colaboração e amizade;

A todos os integrantes da grande família que forma o Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI): ALINE CAVALCANTI, CAROL BRITO, LUIZ HENRIQUE,

YOLANDA KARLA, GABRIELA MUNIZ, THAYS DIAS, ANA CAROLINA, ANDERSON LEITE, MARIA ALICE, MAX VIANA, NÍVEA KARLA, MARIANA SANTOS, ARIANE PRISCILA, AMANDA SILVA, LUDMILLA STEFANIE, ELLYMAIRA FREITAS e LUIZ ANTÔNIO por todos os dias que passamos juntos e por toda a colaboração para que esse trabalho fosse concluído;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo apoio financeiro e pela concessão da bolsa.

Enfim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, enfatizando que, o mesmo não é mérito apenas meu, mas de todos aqueles que estiveram comigo por toda essa longa caminhada;

Meu muitíssimo obrigada!!

RESUMO

A leishmaniose é considerada um problema de saúde pública e afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Os medicamentos usados para o tratamento da doença possuem custo elevado, eficácia variável e elevada toxicidade podendo levar o paciente ao óbito. Com a finalidade de desenvolver tratamentos mais eficazes e seguros, este trabalho visa investigar a atividade leishmanicida de derivados da combretastatina A-4. Para isto, foi realizado inicialmente um *screening* para determinar a toxicidade sobre a célula hospedeira e sobre formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. No ensaio de viabilidade celular, foi observado que os derivados LASSBio 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1592, 1594, 1595 e 1716, não apresentaram efeito tóxico até a concentração máxima de 100 μ M. Os resultados obtidos na avaliação da atividade antipromastigota contra *L. braziliensis* evidenciaram que os derivados LASSBio 1594, 1714, 1715, 1716, 1735, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742 e 1744 exibiram atividade leishmanicida significativa. No ensaio contra o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, os derivados LASSBio 1589, 1593, 1738, 1740, 1741 apresentaram atividade contra o parasito. Enquanto no ensaio contra formas promastigotas de *L. chagasi*, os derivados LASSBio 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1596, 1715, 1735, 1738 e 1740 apresentaram atividade significativa contra o parasito. A partir do *screening* foram selecionados dois derivados da CA-4 para o ensaio de infecção *in vivo* em orelhas de camundongos BALB/c com formas promastigotas de *L. amazonensis*, espécie causadora de Leishmaniose Tegumentar Americana. Nesse estudo, foi observado que os animais tratados com os derivados LASSBio 1738 e LASSBio 1588 apresentaram significativa diminuição da lesão na orelha quando comparado ao controle. Neste mesmo ensaio, foi observado que não houve alteração das enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST), creatinina e ureia. Porém, ao analisar o peso do baço, o tratamento com o LASSBio 1538 alterou o peso do baço de forma significativa. Portanto, podemos concluir que os derivados da CA-4 são eficazes contra formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Além disso, os derivados LASSBio 1588 e LASSBio 1738 possuem efeito sobre o curso da infecção da orelha *in vivo* com *L. amazonensis* na dose de 30 μ mol/kg/dia x 28 dias (i.p.). Assim, os derivados da CA-4 destacaram-se como importantes substâncias na proposta de novos fármacos leishmanicidas.

Palavras-chave: Combretastatina A-4. Promastigota. *Leishmania*.

ABSTRACT

Leishmaniasis are considered a public health issue that affect millions of people. The treatment adopted has a number of adverse effects, various strains of *Leishmania* drug resistance and high toxicity, which may lead the patient to death. Thus, in order to develop safer and more effective treatments, this work aims to investigate the leishmanicidal activity of combretastine A-4 derivatives. Therefore, we performed an initial screening to determine the toxicity on the host cell and on promastigotes. In viability assay, it was observed that LASSBio 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1592, 1594, 1595 and 1716 derivatives did not show toxic effect to maximum concentration 100 μ M. Subsequently, the viability assay against promastigotes of *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. chagasi* was performed. The results obtained in the evaluation of anti-promastigote activity against *L. braziliensis* showed that LASSBio 1594, 1714, 1715, 1716, 1735, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742 and 1744 derivatives exhibited significant leishmanicidal activity. In the test against the growth of promastigotes of *L. amazonensis*, LASSBio 1594, 1714, 1715, 1716, 1735, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742 and 1744 derivatives had activity against parasite. While in the test against the growth of promastigotes of *L. chagasi*, LASSBio 1586, 1587, 1588, 1589, 1590, 1591, 1592, 1593, 1596, 1715, 1735, 1738 and 1740 derivatives had significant activity against parasite. From the screening were selected two CA-4 derivatives for testing in vivo infection in the ears of BALB / c mice with promastigotes of *L. amazonensis*, which causes cutaneous leishmaniasis. In this study, it was observed that the animals treated with LASSBio 1738 and LASSBio 1588 derivatives had significant decrease of injury when compared to the control. In this same assay, it was observed that there was no change in liver enzymes alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST), creatinine and urea. However, to examine the spleen, only treatment with LASSBio 1538 did changes the spleen weight significantly. Therefore, we can concluded that CA-4 derivatives are effective against promastigotes of *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. chagasi*. Furthermore, LASSBio 1588 and LASSBio 1738 have effect on the course of infection of the ear in vivo with *L. amazonensis* at the dose of 30 μ mol/kg/days x 28 days (i.p.). Thus, CA-4 derivatives stood out as important substances in the proposed new antileishmanial drugs.

Keywords: Combretastatin A-4. Promastigote. *Leishmania*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| Figura 1 - | Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago (A) e formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> (B), ambas observadas no microscópio eletrônico de varredura..... | 17 |
| Figura 2 - | Indivíduo com leishmaniose visceral com hepatoesplenomegalia..... | 18 |
| Figura 3 - | Diversidade de manifestações clínicas de LTA: (A) forma cutânea, (B) forma mucosa e (C) forma difusa..... | 20 |
| Figura 4 - | Distribuição da LV no Velho e Novo Mundo..... | 22 |
| Figura 5 - | Distribuição da LTA no Velho e Novo Mundo..... | 22 |
| Figura 6 - | Distribuição de casos de LV (A) e LTA (B) no Brasil de 2005 a 2007..... | 23 |
| Figura 7 - | Representação esquemática da superfície glicoconjugada do parasito <i>Leishmania</i> | 26 |
| Figura 8 - | Interação de forma promastigota de <i>Leishmania</i> com macrófagos de cultura..... | 27 |
| Figura 9 - | Papel das células T e das citocinas na determinação de susceptibilidade e resistência à infecção..... | 29 |
| Figura 10 - | Arbusto <i>Combretum caffum</i> | 33 |
| Figura 11 - | Subunidades que constituem a CA-4..... | 35 |
| Figura 12 - | Construção de série congênere 1..... | 40 |
| Figura 13 - | Representação dos análogos <i>N</i> -acilhidrazônicos (série congênere 1)..... | 41 |
| Figura 14 - | Representação dos análogos semicarbazônicos (série congênere 1)..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 15 - Representação dos análogos <i>N</i> -acilhidrazônicos (série congênere 2)..... | 43 |
| Figura 16 - Ilustração do ensaio de redução de MTT..... | 46 |
| Figura 17 - Ilustração do ensaio de viabilidade dos parasitos <i>in vitro</i> | 47 |
| Figura 18 - Ensaio <i>in vivo</i> (Modelo de infecção na orelha de animais BALB/c com <i>L. amazonensis</i>)..... | 49 |
| Figura 19 - Efeito leishmanicida em BALB/c dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime..... | 63 |
| Figura 20 - Efeito leishmanicida em BALB/c dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a carga parasitária em orelhas (A) e linfonodos (B)..... | 64 |
| Figura 21 - Fotografias das orelhas infectadas e tratadas no 28 ^o dia pós-infecção..... | 65 |
| Figura 22 - Efeito do tratamento dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a atividade de enzimas hepáticas..... | 66 |
| Figura 23 - Efeito do tratamento dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a atividade de creatinina e ureia..... | 68 |
| Figura 24 - Efeito do tratamento sobre o peso do baço dos animais tratados..... | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| Tabela 1 - | Efeito dos compostos derivados da CA-4 sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT..... | 55 |
| Tabela 2 - | Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de <i>L. braziliensis</i> | 58 |
| Tabela 3 - | Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de <i>L.amazonensis</i> | 59 |
| Tabela 4 - | Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de <i>L.chagasi</i> | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

LV - Leishmaniose Visceral

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

LC - Leishmaniose Cutânea

LM - Leishmaniose Mucosa

LD - Leishmaniose Difusa

L. – *Leishmania*

Ip - Intraperitoneal

Células NK - "Natural Killer"

CR3 - Complemento tipo 3

MHC II - Complexo de Histocompatibilidade tipo II

NO - Óxido nítrico

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

IFN- γ - Interferon γ

IL-10 - Interleucina-10

Treg - Células T regulatórias

WHO - World Health Organization

CA-4 - Combretastatina A-4

gp63 - glicoproteína 63

LPG - lipofosfoglicano

PPG - Proteofosfoglicano

LASSBio - Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas

SFB - Soro Fetal Bovino

DMSO – Dimetilsulfóxido

MTT – brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

$M \pm E.P.M.$ - Média \pm Erro Padrão da Média

CL_{50} - Concentração letal de 50

CI_{50} – Concentração inibitória de 50

NT - Substância não apresenta atividade letal significativa

mM – Milimolar

μ M - Micromolar

ANOVA - Análise de variância

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 16 |
| 2.1 Aspectos gerais da leishmaniose | 16 |
| 2.2 Epidemiologia | 20 |
| 2.3 Coinfecção <i>Leishmania</i>-HIV | 24 |
| 2.4 Resposta imune do hospedeiro | 24 |
| 2.5 Terapia da leishmaniose | 30 |
| 2.6 Considerações sobre combretastatina A-4 | 33 |
| 3 OBJETIVOS | 39 |
| 3.1 Objetivo geral | 39 |
| 3.2 Objetivos específicos | 39 |
| 4 METODOLOGIA | 40 |
| 4.1 Planejamento dos derivados <i>N</i>-acilhidrazonas e semicarbazônicos da CA-4 | 40 |
| 4.2 Preparação dos derivados da CA-4 | 44 |
| 4.3 Experiências <i>in vitro</i> | 44 |
| 4.3.1 Manutenção de linhagem de células | 44 |
| 4.3.2 Manutenção dos parasitos | 45 |
| 4.3.3 Ensaio de viabilidade celular | 45 |
| 4.3.4 Ensaio de viabilidade de parasitos <i>in vitro</i> | 46 |
| 4.4 Experiências <i>in vivo</i> | 47 |
| 4.4.1 Procedimentos éticos adotados nos experimentos | 47 |

| | |
|---|----|
| 4.4.2 Ensaio <i>In vivo</i> de infecção com promastigotas na orelha de camundongos BALB/c– Adaptado de Pereira et al., (2010) | 48 |
| 4.4.3 Dosagem da enzima ALT | 49 |
| 4.4.4 Dosagem da enzima AST | 50 |
| 4.4.5 Diluições limitantes | 50 |
| 4.4.6 Pesagem do baço | 51 |
| 4.5 Análise estatística | 51 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 54 |
| 5.1 Ensaio de citotoxicidade celular | 54 |
| 5.2 Ensaio de viabilidade de parasitos <i>in vitro</i> | 56 |
| 5.3 Ensaio de infecção <i>in vivo</i> | 62 |
| 6 CONCLUSÕES | 71 |
| REFERÊNCIAS | 72 |
| ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – UFAL | 81 |

1 INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são enfermidades que acometem cerca de um bilhão de habitantes no mundo, sendo 90% destes, residentes em países subdesenvolvidos. Entre essas doenças, encontram-se as infecções por diversos tipos de protozoários, como a leishmaniose que é a segunda maior doença parasitária no mundo. A subnotificação desta doença é alarmante com apenas 32 países apresentando notificação obrigatória, dentre eles o Brasil (HOLZMULLER; BRAS-GONÇALVES; LEMESRE, 2006).

Leishmaniose é uma doença causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, da família Trypanosomatidae. Sua transmissão nas américas ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* infectada com o parasito *Leishmania*. As manifestações clínicas da doença são variáveis dependendo da virulência da espécie infectante, susceptibilidade do hospedeiro e co-infecções (CAMACHO et al., 2003). A leishmaniose apresenta-se em duas formas clínicas distintas: Leishmaniose Visceral (LV) causando uma infecção disseminada visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Esta última, apresenta-se em 3 formas distintas, Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Mucosa (LM) e Leishmaniose Difusa (LD), todas apresentando lesões cutâneas, muitas vezes desfigurantes (DESJEUX, 2004).

Estima-se que a leishmaniose afeta mais de 12 milhões de indivíduos em 98 países, com 350 milhões de pessoas em risco de contaminação. No Brasil, é de elevada incidência, apresentando no decorrer dos últimos anos um tendência crescente, sendo que, a maioria dos casos se concentram nas regiões Norte e Nordeste, havendo ainda focos importantes na região Centro-Oeste e Sudeste (World Health Organization - WHO, 2012).

O arsenal terapêutico disponível para tratamento da Leishmaniose é bastante precário, existindo até o momento os antimoniais pentavalentes, que tem em seu arsenal o glucantime que é o fármaco de primeira escolha, apresentando-se como a melhor opção terapêutica disponível, com cura de 60% a 90% dos casos (BRENDLE et al., 2002). Os fármacos de segunda escolha disponíveis são a anfotericina B e a pentamidina. Existe ainda a forma lipossomal da anfotericina B, conhecida comercialmente com Ambisome[®], que é menos tóxica que a anfotericina

B, mas por ser de alto custo, tem sido utilizada apenas para o tratamento de LV ou para pacientes com LTA com alguma forma de imunossupressão, incluindo indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (AMATO et al., 2000). Outra alternativa terapêutica é a miltefosina, que tem a vantagem de ser administrada por via oral, porém estudos *in vitro* mostraram que algumas cepas de *Leishmania* já apresentam resistência (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

Dessa forma, faltam opções terapêuticas ou tratamentos mais adequados para a Leishmaniose que é classificada como uma doença negligenciada. Isto é resultado da ausência de políticas públicas e da falta de interesse do mercado farmacêutico mundial em investir para o desenvolvimento de novos fármacos eficazes contra essa doença (NWAKA; RIDLEY, 2003). Portanto, a abordagem descrita neste trabalho visa investigar novos candidatos a protótipos de fármacos leishmanicidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da leishmaniose

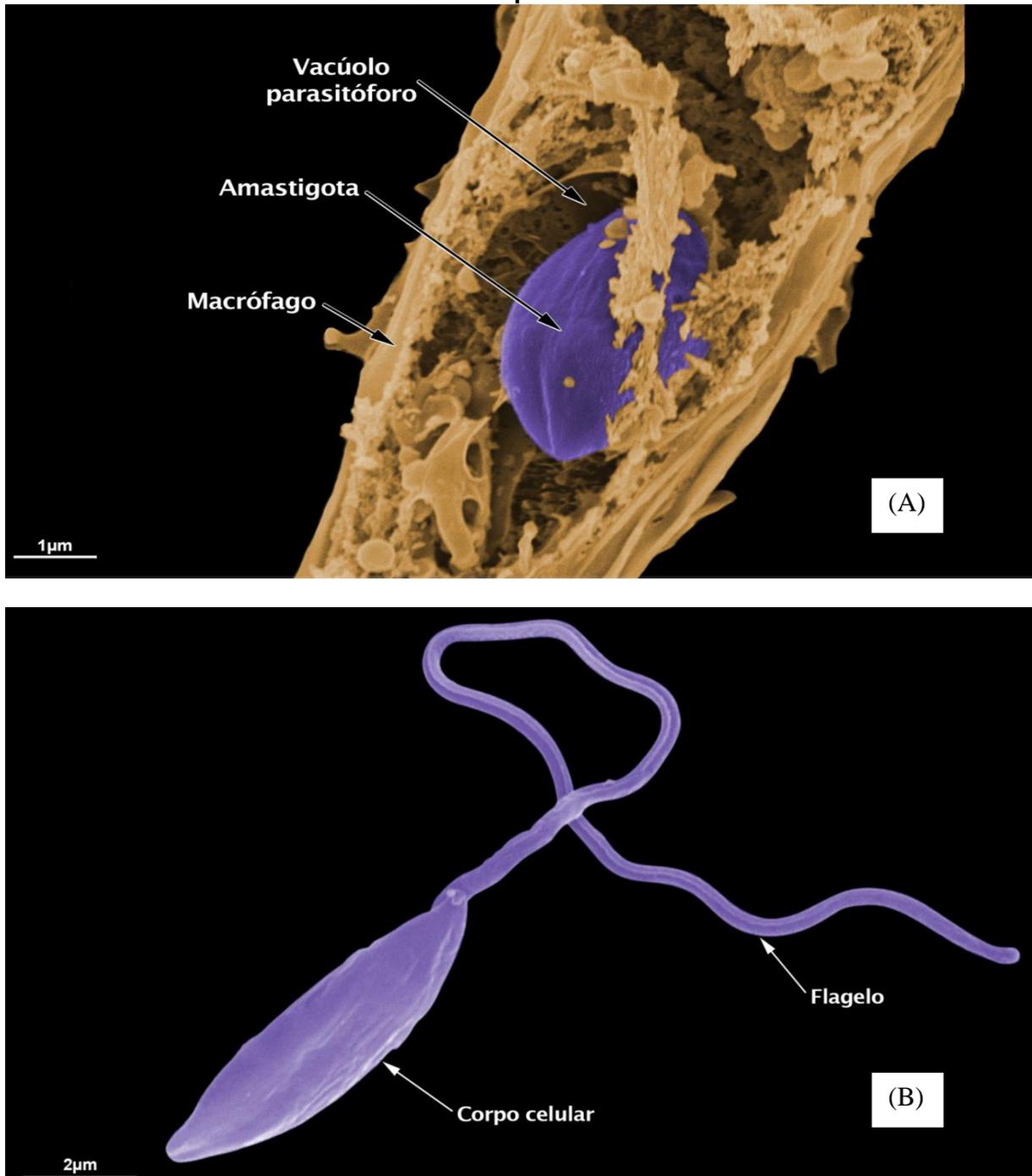
Diversos parasitos são responsáveis por causarem doenças infecciosas que aumentam a morbidade e mortalidade nos seres humanos em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde o acesso aos agentes quimioterápicos é limitado (GIGLEY et al., 2012). Dentre esses parasitos, encontram-se os protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* – agentes causadores de uma doença parasitária zoonótica conhecida como leishmaniose (DONG; UZONNA, 2012).

A doença ocorre através de parasitismo intracelular obrigatório (CHAPPUIS et al., 2007). Existem duas formas evolutivas: a forma amastigota com estrutura arredondada ou ovalada sem flagelo, encontra-se no interior de células do sistema mononuclear fagocitário de hospedeiros vertebrados, como monócitos, histiócitos e macrófagos (Figura 1A), e a forma promastigota (Figura 1B), que é alongada, extracelular, possui flagelo livre e longo emergindo do corpo do parasito e pode ser encontrada no tubo digestivo dos flebotomíneos (ROBERTS, 2006).

No continente americano, são reconhecidas 11 espécies de *Leishmania* (dermotrópica) causadoras de doença em seres humanos (COSTA et al., 2007). No Brasil, sete espécies foram identificadas, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três mais freqüentes são: *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. A multiplicidade de espécies de *Leishmania* em diversas áreas geográficas é capaz de causar doenças nos humanos e pode resultar em diversas manifestações clínicas desta enfermidade (CHAPPUIS et al., 2007).

A transmissão da leishmaniose ocorre através da picada da fêmea do flebotomíneo *Lutzomyia* infectado com as diferentes espécies de *Leishmania*. As manifestações clínicas dependem da espécie do parasito, do vetor e da constituição genética e imunológica do hospedeiro, variando de uma lesão cutânea (LTA) até uma visceralização da doença, muitas vezes fatal, conhecida como leishmaniose visceral (LV) (MURBACK et al., 2011).

Figura 1. Forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago (A) e formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (B), ambas observadas no microscópio eletrônico de varredura.



Fonte: DIRCEU ESDRAS TEIXEIRA et al., 2013.

A leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, o que significa febre negra em hindi – forma mais severa da doença, é tipicamente causada pelas espécies de *L. chagasi* e *L. donovani* (SENGUPTA, 1947). Esta forma clínica da doença pode permanecer assintomática ou após um período de incubação de 2-4 meses apresentar sintomas

como febre baixa de desenvolvimento lento, prostração geral, anemia e protrusão do abdômen devido ao aumento do fígado e do baço. Neste tipo de leishmaniose, as formas amastigotas residem em células do sistema retículo endotelial de vísceras, podendo comprometer baço, fígado, linfonodos e intestino (Figura 2), causando uma infecção disseminada visceral, sendo assim, inevitavelmente fatal se não tratada (MURRAY et al., 2005).

Figura 2. Indivíduo com leishmaniose visceral com hepatoesplenomegalia.



Fonte: Ministério da Saúde, 2010.

Outra forma de leishmaniose é a tegumentar americana (LTA), que é uma doença amplamente dispersa, atingindo principalmente indivíduos nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Um amplo espectro de manifestações clínicas envolvendo pele e mucosas pode ser visto na LTA, variando desde uma lesão auto-resolutiva a lesões múltiplas ou desfigurantes. De modo geral, a maioria das infecções leishmanióticas permanecem localizadas na pele ou linfonodos adjacentes. Entretanto, algumas espécies podem escapar para mucosas e múltiplos locais na pele (MURRAY et al., 2005). As lesões de pele ulceradas típicas da LTA são principalmente causadas pela *L. major* e *L. tropica* no Velho Mundo (Europa, África,

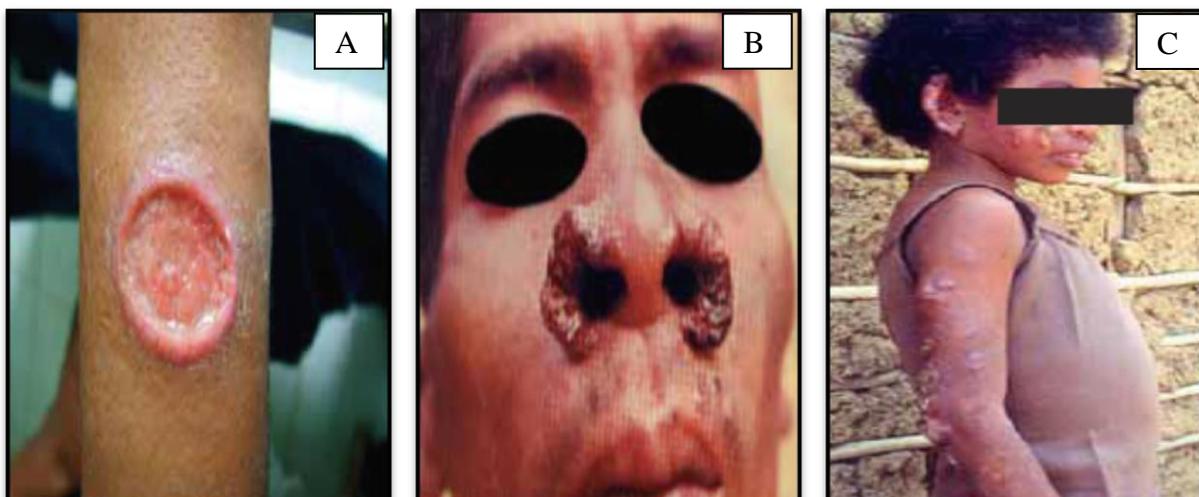
Ásia Central e do Oriente Médio) e pelas espécies de *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. mexicana* na América Latina (CROFT, 2001).

A LTA pode apresentar-se na forma leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LD). Na LC, o período de incubação é bastante variável, podendo a infecção evoluir após um período de incubação de 1-12 semanas, em uma pápula que aumenta de tamanho e finalmente úlcera. A lesão típica é indolor e apresenta bordas salientes com fundo necrótico granuloso e úmido (AMATO et al., 2008) (Figura 3A).

A LM é considerada a manifestação mais severa da LTA, pois não cura espontaneamente e é de difícil tratamento. Esta forma de LTA apresenta notável expressão clínica, por comprometer a mucosa, com destruição tissular progressiva da mucosa nasal e orofaríngea, podendo levar à perfuração do septo e ocasionar destruição de cartilagens e tecidos moles, com possível desfiguração da face e perda do septo, palato e pavilhão auditivo (Figura 3B), devido à intensa resposta inflamatória (AMATO et al., 2008). O acometimento de faringe e laringe ocasiona dificuldade para deglutição e, assim, leva à desnutrição, além de eventualmente provocar aspiração e/ou obstrução de vias aéreas que causam importante risco de vida ao enfermo. Nos casos mais graves, o paciente pode chegar ao óbito por complicações respiratórias, devido ao envolvimento da traqueia (HEPBURN, 2000). As evidências sugerem que, entre os pacientes com LC que evoluem para LM, 90% dos eventos ocorrem dentro de 10 anos. Desses, 50% ocorrem nos primeiros dois anos após a cicatrização das lesões cutâneas (PASSOS et al., 2001).

A LD é uma variante rara da LTA, descrita no Brasil principalmente na região Amazônica e causada pela *L. (L.) amazonensis*. Nessa forma da doença, as lesões, em geral, disseminam-se pelo corpo, acometendo principalmente as extremidades caracterizando-se como pápulas, nódulos ou máculas. Os nódulos, não ulcerosos, generalizados, múltiplos (≥ 10), com progressão lenta, esteticamente desfigurantes e sem envolvimento visceral (Figura 3C). Embora o acometimento mucoso não seja a regra, em fases tardias da LD, pode haver presença de lesões mucosas. A doença é resistente à quimioterapia e normalmente é recorrente (VERMA et al., 2012).

Figura 3. Diversidade de manifestações clínicas de LTA: (A) forma cutânea, (B) forma mucosa e (C) forma difusa.



Fonte: DIRCEU ESDRAS TEIXEIRA et al., 2013.

2.2 Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada considerada reemergente, com um aumento na sua incidência nas últimas décadas (GOTO; LINDOSO, 2010; HOTEZ et al., 2006). Além disso, a leishmaniose é vista como a segunda maior doença parasitária no mundo, cuja subnotificação ainda é alarmante com apenas 32 países apresentando notificação obrigatória, entre eles o Brasil (CLEM, 2010).

No entanto, a leishmaniose é largamente ignorada na discussão das prioridades de doenças tropicais (HOTEZ et al., 2006). Este esquecimento resulta em sua epidemiologia complexa, falta de ferramentas simples e facilmente aplicáveis para o caso de detecção da doença e da escassez de dados de incidência atuais, que muitas vezes resulta em uma falha por parte dos políticos em reconhecer a sua importância (BERN; MAGUIRE; ALVAR, 2008).

Esta doença afeta principalmente indivíduos de países subdesenvolvidos, onde a população acometida é aquela com menor poder socioeconômico, que possui menor poder político para influenciar as decisões do governo e uma limitada capacidade de assumir os custos da doença (diagnóstico, hospitalização, tratamento) (CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010; DESJEUX, 2004).

Atualmente, a leishmaniose ocorre em 3 territórios nos 5 continentes e é considerada endêmica em 98 países, 72 dos quais são países em desenvolvimento. 90% de todos os casos de LV ocorrem em 6 países, a saber: Bangladesh, Brasil, Índia, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (Figura 4). A LTA é mais amplamente distribuída, com cerca de um terço dos casos ocorrendo em três regiões endêmicas, nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia ocidental do Oriente Médio à Ásia Central. Os dez países com as mais elevadas contagens de casos estimados são Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, o Sudão do Norte, Costa Rica e Peru, que juntos representam 70 a 75% de incidência global estimada (Figura 5) (WHO, 2012).

Acredita-se que cerca de 350 milhões de pessoas no mundo estejam expostas ao risco de infecção, com uma prevalência global estimada em 12 milhões de casos, com aproximadamente 1-2 milhões de ocorrências por ano (OLIVEIRA et al., 2005). No total, a contagem de casos oficiais totalizaram mais de 58.000 casos de LV e 220.000 LT casos por ano. No entanto, apenas cerca de dois terços dos países relataram dados de incidência por um período de cinco anos, sendo as informações mais dispersas para os focos na África (KAYE; SCOTT, 2011, ALVAR et al., 2012). Como muitas infecções não apresentam sintomas ou são mal diagnosticadas, o número de casos de leishmaniose é provavelmente subestimado (GONZALEZ et al., 2009).

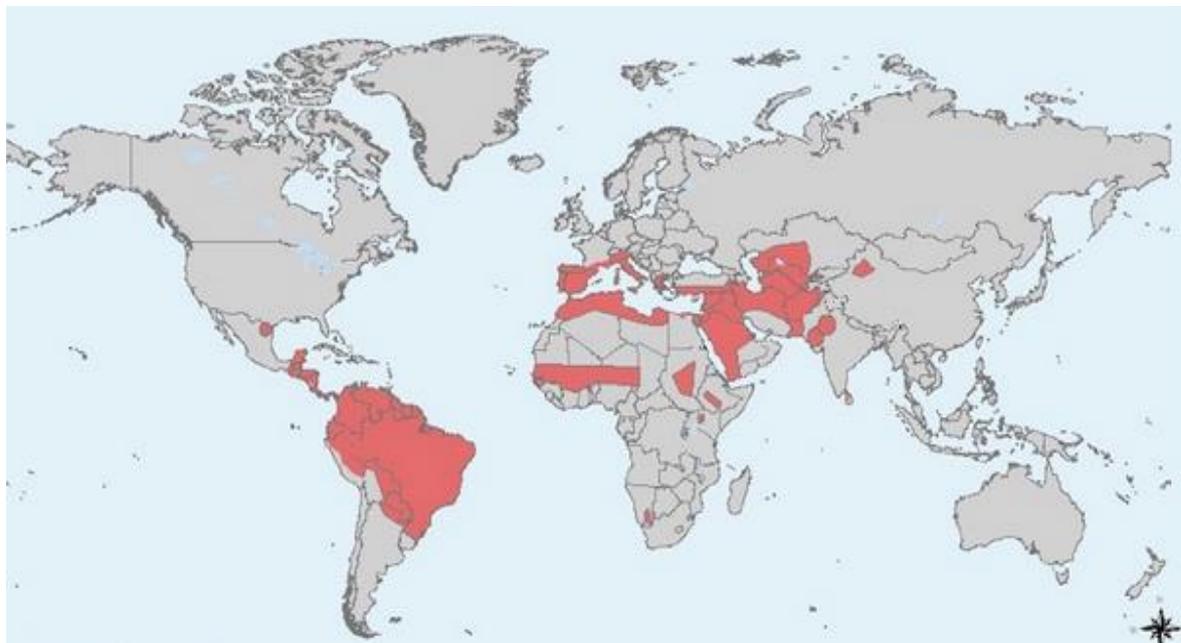
Dados mostram que no mundo são investidos para o tratamento de doenças negligenciadas menos de um dólar por dia, enquanto que doenças globais como diabetes e doenças cardiovasculares há investimento de 103 e 63 dólares por dia, respectivamente (SINGH et al., 2013). Mostrando o descaso em investimento para pesquisa de fármacos para doenças que acometem principalmente a população pobre, como a leishmaniose.

Figura 4. Distribuição da LV no Velho e Novo Mundo.



Fonte: WHO, 2007.

Figura 5. Distribuição da LTA no Velho e Novo Mundo.

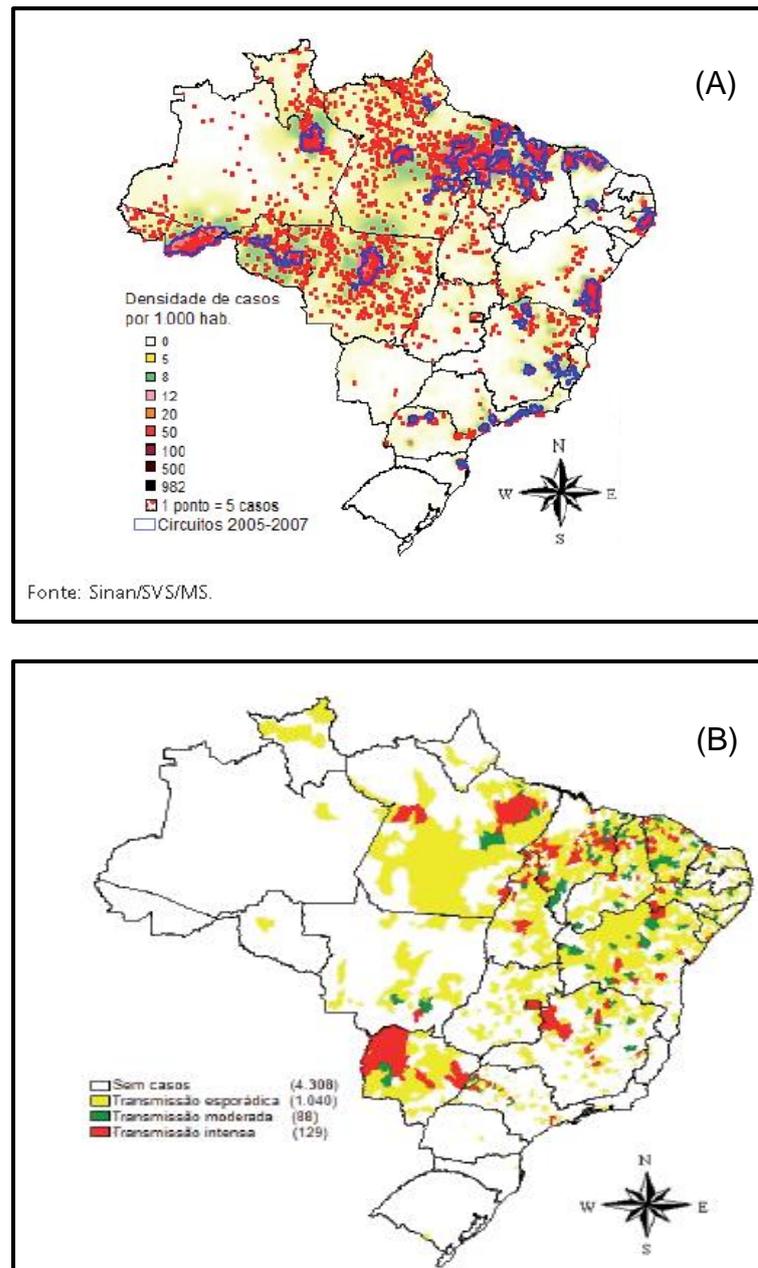


Fonte: WHO, 2007.

No Brasil, a doença é endêmica e de elevada incidência. Dessa forma, é considerada um problema de saúde pública, uma vez que no período de 2005 a

2010 foram registrados no Brasil 134.826 de LT e 21.923 casos LV. Apenas no ano de 2011, no Brasil foram confirmados 22.113 casos de LT e 3.775 casos de LV (dados sujeitos a alterações). Sendo que, no decorrer destes anos, observou-se uma tendência crescente da endemia (Figura 6A e 6B) (SINAM, 2013).

Figura 6. Distribuição de casos de LV (A) e LTA (B) no Brasil de 2005 a 2007.



Fonte: Ministério da Saúde, 2010.

A região Norte vem contribuindo com os coeficientes médios mais elevados de LT (39,6%), seguido da região Nordeste com incidência de 31,2% do total de casos registrados no período de 2005 a 2010. Porém, quando se trata de LV é a região Nordeste que detém o maior percentual de casos registrados no país (49,7%) com taxa de letalidade de 46,22%. Somente no estado de Alagoas, entre 2005 e 2010, foram notificados 399 casos confirmados de LT e 228 casos de LV (SINAM, 2013).

2.3 Coinfecção *Leishmania*-HIV

A LV e a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) são consideradas de grande importância para a Saúde Pública devido a sua magnitude, transcendência e expansão geográfica. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), ambas as infecções estão entre os eventos de maior relevância no mundo. Na América Latina, 1,7 milhões de pessoas estão infectadas pelo HIV. A prevalência de infecções no Brasil é estimada em 630.000, com aproximadamente 34.500 novos casos de AIDS por ano. O primeiro caso de coinfecção *Leishmania*-HIV foi descrito em 1985, no sul da Europa, e atualmente, há registro de sua presença em 35 países (DESJEUX, 2004). Pacientes com coinfecção *Leishmania*-HIV normalmente apresentam complicações como esplenomegalia e hepatomegalia, podendo evoluir para o óbito. Houve um aumento do número de casos na faixa etária de 20 a 49 anos com letalidade de aproximadamente 23,0% nos indivíduos maiores de 50 anos. Estes dados apontam para maior exposição da população às duas infecções (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

2.4 Resposta imune do hospedeiro

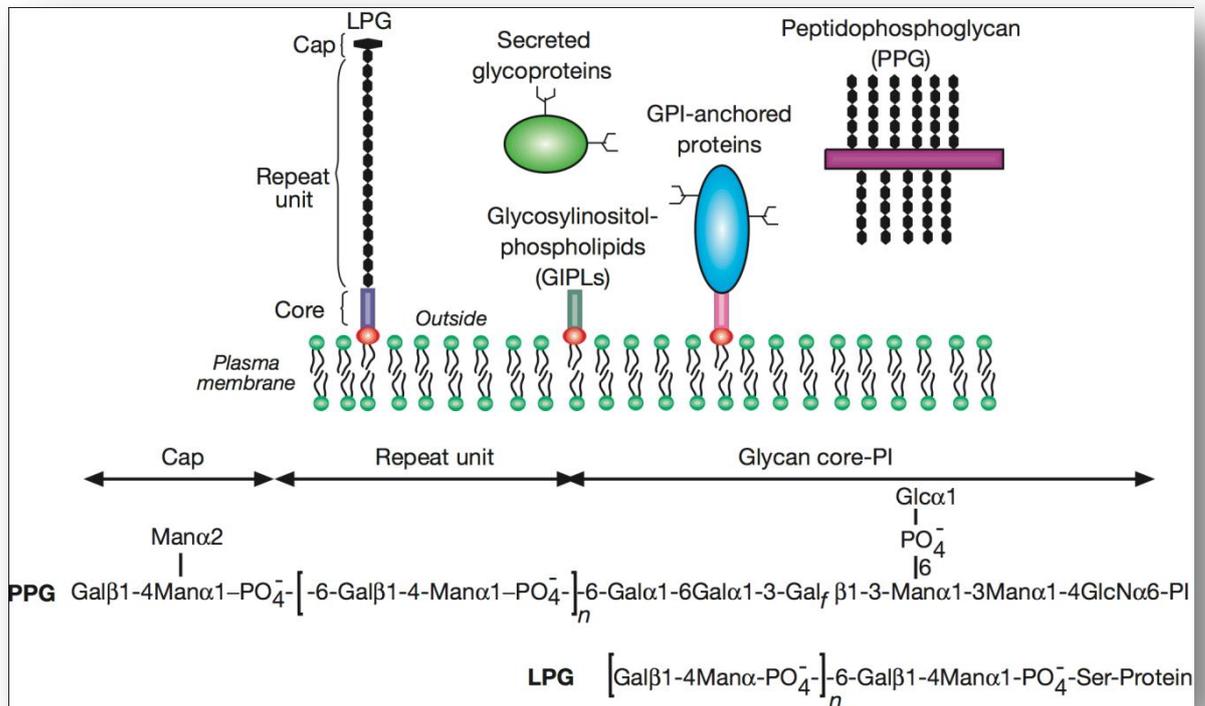
Os eventos iniciais, que ocorrem após a transmissão de promastigotas pelo inseto vetor são cruciais no estabelecimento da infecção e envolvem a participação do sistema complemento, de neutrófilos, de células NK ("natural killer"), dos macrófagos e de fatores de crescimento. São estes elementos, dentre outros, que

formam a primeira barreira à infecção, dificultando a sua instalação e que, ao mesmo tempo, constituem elementos que auxiliam a evasão do parasito da resposta protetora do hospedeiro. Acredita-se que o processo de internalização seja dependente principalmente de receptores de imunoglobulinas, como FcRI e FcRII, e parte por receptores do complemento tipo 3 (CR3). (WOELBING et al., 2006).

A etapa de adesão ocorre pelo flagelo ou pelo corpo celular. Envolve o reconhecimento de moléculas presentes na superfície da membrana do parasito, como o lipofosfoglicano (LPG) e a glicoproteína (gp63), que se liga a diferentes receptores encontrados na superfície dos macrófagos (CUMMINGS; TURCO, 2009).

A adesão estágio-específica é mediada pela variação estrutural que envolve LPG de superfície, o que contribui para a sobrevivência do parasito no ambiente hidrolítico do intestino médio. Em muitas espécies, as repetições PG contêm substituições adicionais que medeiam às funções-chave na adesão estágio-específico. Por exemplo, em *L. major*, há diferenciação de LPG por LPG estruturalmente modificado onde resíduos α 1-2 arabinosil são modificados por β 1-3 fosfoglicano, dando origem a uma estrutura que não se liga ao receptor de galectina no intestino, facilitando assim a separação do parasito do intestino médio de flebotomíneos (figura 7). A abundância de LPG na superfície do parasito, que é o local da principal interface com o hospedeiro, sugere um papel central para glicoconjugados em ciclo infeccioso do parasito. LPG também tem sido implicado na resistência das células à lise mediada por complemento após inoculação no hospedeiro mamífero, a ligação e absorção pelos macrófagos, modulação de macrófagos na transdução de sinal, a resistência ao ataque por oxidação, assim, permitindo estabelecer infecções bem sucedidas, assim a membrana do macrófago começa a envolver a promastigota, formando um funil, que culmina na entrada do parasito em um vacúolo (CUMMINGS; TURCO, 2009) (Figura 8).

Figura 7. Representação esquemática da superfície glicoconjugada do parasito *Leishmania*.



Fonte: CUMMINGS; TURCO, 2009.

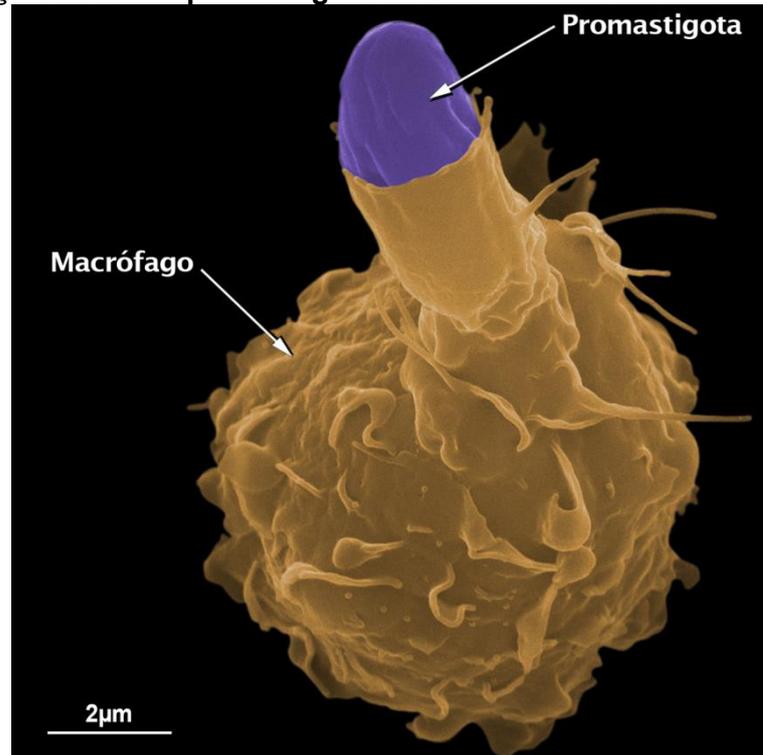
Nota: - LPG (lipofosfoglicano) composto por:

- (i) uma âncora lipídica de 1-O-alkil-2-liso-fosfatidilinositol;
- (ii) um núcleo central ('core') formado por um heptassacarídeo $\text{Gal}(\alpha 1,6)\text{Gal}(\alpha 1,3)\text{Gal}_f(\beta 1,3)[\text{Glc}(\alpha 1)-\text{PO}_4]\text{Man}(\alpha 1,3)\text{Man}(\alpha 1,4)\text{GlcN}(\alpha 1,3)$;
- (iii) uma região de repetições de dissacarídeos fosforilados $\text{Gal}(\beta 1,4)\text{Man}(\alpha 1)-\text{PO}_4$;
- (iv) um pequeno oligossacarídeo neutro formando uma estrutura do tipo 'cap'.

- PPG (proteofosfoglicano) - proteínas secretadas como proteofosfoglicano de mucina livre, constituídos de unidades repetidas de dissacarídeos e estrutura 'cap' ligada a uma proteína.

- GPIPLs (glicosilinositolfosfolípido) pcompsto de uma estrutura lipídica que funciona como âncora fixando uma unidade de sacarídeos (manose e galactose) fosfatados.

Figura 8. Interação de forma promastigota de *Leishmania* com macrófagos de cultura.



Fonte: DIRCEU ESDRAS TEIXEIRA et al., 2013.

Na infecção com *Leishmania*, os macrófagos são indispensáveis para a sobrevivência, replicação e diferenciação do mesmo. Após a infecção inicial, macrófagos e neutrófilos são recrutados para o local da infecção e sua interação com os parasitos influenciam significativamente o resultado de infecção (RIBEIRO-GOMES et al., 2007). No entanto, estudos recentes sugerem que os neutrófilos são mais recrutados para o local da infecção e estas células são muito eficientes na internalização do parasito. Como os neutrófilos são fagócitos de curta duração, acredita-se que sirvam como células hospedeiras intermediárias (PETERS; SACKS, 2009).

Uma vez que os macrófagos fagocitam os parasitos livres (formas promastigotas) (figura 8), ocorre a diferenciação em formas amastigotas dentro dos fagolisossomos. A fagocitose ocorre pela extensão da membrana plasmática em torno de uma partícula extracelular, seguido por internalização. (WOELBING et al., 2006). Após a internalização, inicia-se uma cascata de sinalização intracelular, promovendo assim, expressão dos antígenos para as células T, através do complexo de histocompatibilidade tipo II (MHC II), e desencadeando uma resposta adaptativa

mediante intensificação da produção de citocinas inflamatórias (CAPARROS et al., 2005). A resposta fagocitária está associada a outros eventos celulares que impedem a ativação de agentes antimicrobianos, como o óxido nítrico (NO) e citocinas, que são necessários para o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz. Isto permite ao parasito evadir a resposta imune inata e multiplicar-se dentro do fagolisossomo do macrófago, do qual ele pode se espalhar e propagar a doença dentro do hospedeiro (RAVICHANDRAN; LORENZ, 2007).

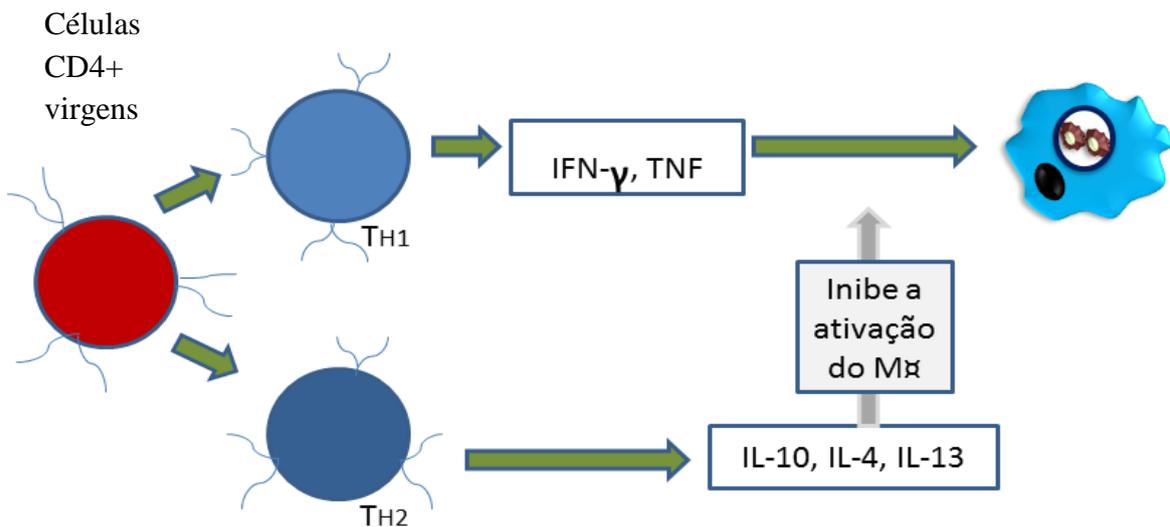
O parasito é alterado pelas enzimas lisossomais e se transforma em amastigota que fica aderida à membrana do vacúolo, preferencialmente pela região posterior. Inicia-se uma intensa multiplicação no interior do vacúolo parasitóforo e dezenas de amastigotas são encontrados. A resistência da célula é esgotada e ocorre a lise celular com a liberação de centenas de parasitos que são fagocitados por células do sistema fagocítico (macrófagos, neutrófilos, etc) (TEIXEIRA et al., 2013).

A resposta imune desencadeada pela leishmaniose induz uma reação de hipersensibilidade tardia e uma expansão de linfócitos T circulantes antígeno-específicos (SOLBACH; LASKAY, 2000). A resposta imune celular parece desempenhar um papel fundamental no curso evolutivo da infecção. Indivíduos que vivem em áreas endêmicas mostram-se mais resistentes ao desenvolvimento da doença, quando comparados com indivíduos que se deslocam para estas áreas. Isso ocorre provavelmente devido a um processo gradual de adaptação do sistema imune, conferindo imunidade contra o parasito por uma exposição prévia a picada do vetor e, conseqüentemente exposição à saliva (ANDRADE et al., 2007).

A evolução para cura está associada com a indução de resposta Th1, que caracteriza-se por células dendríticas apresentadoras de antígenos, células T CD4 e T CD8 e secreção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ). Citocinas supressoras como a interleucina-10 (IL-10), interleucina-4, interleucina-13 e o TGF- β 1 caracterizam a resposta Th2, que desativam macrófagos e impedem a produção excessiva de citocinas protetoras (Figura 9). A IL-10 e o TGF- β 1 são produzidas em grandes quantidades por células T regulatórias (Treg) encontradas nas lesões de pele de paciente com LC causada por *L. braziliensis*. Dessa forma, células T regulatórias são importantes, pois podem determinar resistência ou susceptibilidade a leishmaniose. A resposta Th2 é

importante, pois provavelmente é responsável por impedir a destruição exacerbada do tecido. No entanto esta desativação dos macrófagos promove a progressão da infecção intracelular (REITHINGER et al., 2007).

Figura 9. Papel das células T e das citocinas na determinação da susceptibilidade e resistência à infecção.



Fonte: Adaptado de ABBAS, 2011.

A resposta imune contra *Leishmania* vem sendo estudado em diversos modelos murinos. Em modelos experimentais com BALB/c infectados por diferentes espécies de *Leishmania*, observou-se manifestações clínicas distintas, que aparecem na forma de lesões superficiais até uma possível viscerização da doença. Isto se deve a susceptibilidade do hospedeiro à carga parasitária inoculada, demonstrando um modelo de resposta imune celular do tipo Th2 (LIPOLDOVÁ et al., 2002). Entretanto, quando se utiliza *L. major* em camundongos das linhagens C57BL/6, C3H e CBA, ocorre um maior controle da infecção primária, sendo considerados, então, como modelos de resistência, evidenciando resposta imune celular do tipo Th1 (AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004) (Figura 9).

2.5 Terapia da leishmaniose

Apesar do uso medicinal de compostos de antimônio já ser conhecido desde a antiguidade para fins terapêuticos, somente em 1912, Gaspar Vianna observou que os antimoniais trivalentes eram eficazes na terapêutica da LTA, usando o tártaro emético de sódio e antimônio (PONTE-SUCRE et al., 2006). Por ser tóxico, o tártaro emético foi substituído pelos compostos pentavalentes, menos tóxicos do que os trivalentes. Estes foram desenvolvidos há mais de 60 anos, sobre duas formas: o antimoniato de N-metilmeeglumina (Glucantime[®]) e o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) (ASHUTOS; SUNDAR; GOYAL, 2007). Ambos apresentam toxicidade e casos de falha do tratamento são comuns, tanto por resistência de determinadas cepas do parasito, quanto por baixa atividade em pacientes imunodeprimidos ou descontinuidade do tratamento por parte do paciente devido aos efeitos adversos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Os antimoniais pentavalentes parecem atuar no mecanismo bioenergético das formas amastigotas da *Leishmania*, por meio de glicólise e beta-oxidação, que ocorrem nas organelas denominadas glicossomas. Outro mecanismo aventado é o de ligação com sítios sulfidrílicos, deflagrando a morte destes protozoários (BERMAN, 1997).

O antimonial é indicado para tratamento de todas as formas de LTA, embora as formas mucosas exijam maior cuidado, podendo apresentar respostas mais lentas e maior possibilidade de recidivas. Os efeitos colaterais mais frequentes são mialgia, inapetência, cefaleia, febre, vômitos, tontura e inchaço no local da aplicação. A cardio, nefro e hepatotoxicidade dos antimoniais constituem uma importante limitação ao seu uso. Além disso, apresenta elevado custo, sendo muitas vezes difícil sua obtenção em regiões endêmicas. Em algumas regiões como a Índia, tem se tornado comum a resistência a essa droga, tornando o seu uso pouco efetivo (WHO, 2012).

A Anfotericina B e pentamidina são fármacos de segunda escolha na terapêutica. A anfotericina B é um antibiótico macrolídico da classe dos polienos, derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, é usada extensivamente no caso de falhas no tratamento com compostos antimoniais. Em caso de gestantes, a anfotericina B é considerada o fármaco de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. É mais tóxico que o Pentostam[®] e o Glucantime[®] e a cardio e nefrotoxicidade causada durante o seu uso, impedem que o tratamento seja

realizado fora do ambiente hospitalar. A fim de reduzir a toxicidade, novas formulações de anfotericina B foram desenvolvidas, como a forma liposomada (AmBisome[®]), a forma complexada em lipídeos (Abelcet[®]) e uma anfotericina B em dispersão coloidal (Amphocil[®]). (GONTIJO; CARVALHO, 2003).

O AmBisome[®] é um sistema de liberação de fármaco liposomal com bicamada única. Os lipossomas são vesículas esféricas, fechadas, formadas por uma variedade de substâncias anfófilas tais como fosfolipídios e colesterol, de forma que estes se rearranjam em múltiplas membranas com bicamadas concêntricas quando hidratados em solução aquosa. A parte lipofílica da molécula de anfotericina B permite que o fármaco se arranje entre a dupla camada de lipossomos. O encapsulamento liposomal ou incorporação em um complexo lipídico pode afetar substancialmente as propriedades funcionais de um fármaco em relação ao fármaco não encapsulado. Portanto, foi demonstrado que vesículas contendo ergosterol, lipossomas e encapsulando a anfotericina B eram menos tóxicas do que a apresentação convencional, o que permite a utilização de doses mais elevadas e mais eficazes (ADLER-MOORE; PROFFIT, 2002). Entretanto, estas possuem custos elevados e por este motivo têm sido utilizadas apenas para tratamento da LV. Devido a menor problemática da LTA, poucos esforços têm sido despendidos para avaliar o uso de formulações em seu tratamento (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

A pentamidina é uma poliamina aromática de grande interesse no tratamento de LV e LM refratária a antimoniais pentavalentes. No entanto, a alta toxicidade deste fármaco, com relatos de morte súbita é fator limitante de seu emprego terapêutico. Dentre os principais efeitos adversos ou colaterais, estão a hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH et al., 2003). Portanto, a utilização de anfotericina B e pentamidina são questionáveis em virtude da eficácia variável entre as espécies de *Leishmania*, o alto custo, a via de administração parenteral e a elevada toxicidade e morte súbita. Além disso, há relatos de resistência devido a baixas dosagens e tratamento descontínuos (OLIVEIRA et al., 2005). A anfotericina B interage especificamente com o ergosterol, esteroide da membrana da *Leishmania*, causando aumento de permeabilidade e morte do parasito. Já a pentamidina, provavelmente, age interferindo na síntese do DNA, alterando morfológicamente o cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial (BERMAN, 1997).

A alternativa mais recente é a miltefosina, a qual foi inicialmente desenvolvida para uso em tratamento de câncer de mama. É um antineoplásico alquilfosfolipídico, que apresenta a grande vantagem de ser o primeiro fármaco efetivo com administração oral para o tratamento da leishmaniose, porém, este medicamento tem meia-vida longa (150 horas) e a resistência do parasito é facilmente induzida *in vitro* (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

O mecanismo de ação da miltefosina contra *Leishmania* ainda é bastante controverso. Lux et al., (2000) mostraram que a síntese de LPG e gp63 está inibida em parasitos tratados com este fármaco. Estes mesmos autores observaram a inibição da enzima 1-acil-2-lisoglicero-3-fosfocolina aciltransferase em promastigotas tratadas com diferentes concentrações de miltefosina. Entretanto, a relevância de tais achados no tratamento clínico ainda não foi evidenciada. É possível que este fármaco atue em *Leishmania* assim como atua em células tumorais, induzindo a apoptose e alterando as vias de sinalização celular mediada por lipídeos (ARTHUR; BITTMAN, 1998). Outros estudos sugeriram que este fármaco possui propriedades imunomodulatórias. Entretanto, mesmo em camundongos imunodeficientes, este fármaco apresenta atividade antitumoral e leishmanicida, sugerindo que sua atividade não está relacionada com uma resposta imune dependente de célula T (MURRAY et al., 2000).

A paramomicina é fruto do surgimento de estruturas de desenvolvimento de medicamentos para doenças negligenciadas. No estado de Bihar, a paramomicina injetável (15 mg/kg sob a forma de sulfato, equivalente a 11 mg de base/kg IM X 21 dias) não foi significativamente menos eficaz do que a anfotericina B deoxicolato. Observou-se, toxicidade coclear reversível rara (2%) e nenhuma elevação significativa da creatinemia neste grupo, que incluía 38% de crianças com menos de 15 anos (SUNDAR et al., 2007). A comercialização da paramomicina nesta indicação está autorizada na Índia desde dezembro de 2006. No Leste da África, a eficácia do mesmo esquema terapêutico mostrou-se inferior e tem sido utilizada principalmente em associações, como a pomada de paramomicina e gentamicina, onde estudos como de SOSA et al. (2013) e RAVIS et al. (2013) mostraram que essa associação é capaz de diminuir de forma estatisticamente significativa as lesões cutâneas causadas pela leishmaniose tegumentar.

A quimioterapia usualmente utilizada para o tratamento da leishmaniose está longe de ser satisfatória. Deve-se levar em conta o custo, o longo período de tratamento, a via de administração, os graves efeitos colaterais, as contraindicações e a resistência, que é um fenômeno crescente em todas as formas de leishmaniose, com relatos cada vez mais frequentes de tratamentos não responsivos (GONZALEZ et al., 2009). Diante desse quadro, é necessário buscar estratégias para solucionar esta questão, pois apesar dos avanços no conhecimento das bases moleculares e celulares das patologias, o desenvolvimento de novas drogas para tratar esta doença avança a passos lentos (NWAKA; RIDLEY, 2003).

2.6 Considerações sobre combretastatina A-4

Os membros da família Combretaceae são amplamente distribuídos no sul da África, sendo utilizados como produtos naturais para diversas finalidades terapêuticas como cânceres, hanseníase, febre tropical e hepatite. Também são utilizadas para fins medicinais no resto da África e da Ásia para cerca de 90 indicações medicinais, muitas delas relacionadas com o tratamento de infecções (ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008).

O esforço em curso do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos para identificar agentes anticancerígenos de origem natural levou à identificação das combretastatinas, que foram isoladas inicialmente do arbusto sul-africano *Combretum caffrum* (Figura 10) (DORR et al., 1996).

Figura 10. Arbusto *Combretum caffrum*.



Fonte: MIKE THOMPSON, 2013.

Existem diversos tipos de combretastatinas, porém a que se destaca por apresentar potente atividade citotóxica frente a diversas linhagens tumorais e em linhagens que apresentam resistência aos fármacos disponíveis na terapêutica é a combretastatina A-4 (CA-4) (TRON et al., 2006). A CA-4 é um agente antimetabólico que induz morte celular por apoptose ao se ligar ao sítio da colchicina da β -tubulina através de ligação reversível, resultando em perturbações nos microtúbulos e interrupção do ciclo celular na transição da metáfase para a anáfase (CHAUDHARY et al., 2007). Também já foi demonstrado que CA-4 exerce efeitos altamente seletivos na proliferação de células endoteliais (NAM, 2003). Mais recentemente, a CA-4 tem sido apontada como indutora de proteínas cinases ativadas por AMP (AMPK) e estimuladora de proteínas cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e proteína cinase ativada por mitógeno p38 (MAPK p38) (COCCEI et al., 2010).

Um fato interessante observado é que alguns fármacos ou substâncias bioativas que alteram de alguma maneira a dinâmica dos microtúbulos, quando administrados em menores concentrações apresentam atividade específica sobre a vasculatura tumoral e, portanto, são considerados agentes perturbadores vasculares (VDAs, do termo em inglês *vascular disrupting agents*). (KANTHOU; TOZER, 2009).

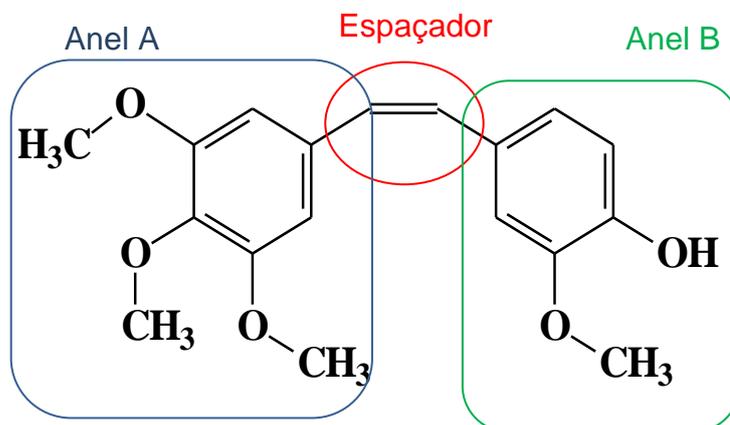
A polimerização da tubulina e despolimerização de microtúbulos são alvos importantes para a descoberta de agentes medicinais para o tratamento de infecções helmínticas (TARABOLETTI; GIAVAZZI, 2004). Como o parasito *Leishmania* apresenta abundantes microtúbulos que estão envolvidos em funções distintas, como locomoção, transporte intracelular, manutenção da forma da célula e divisão celular (FONG; LEE, 1988) e a CA-4 apresenta como principal mecanismo de ação a inibição de microtúbulos, este fármaco é um importante alvo para o tratamento da leishmaniose. Infelizmente, a CA-4 tem baixa biodisponibilidade e uma fraca solubilidade em meios biológicos. Além disso, a CA-4 apresenta elevada toxicidade, causando uma série de efeitos colaterais como: toxicidade para medula óssea, problemas neurológicos, problemas cardiovasculares, causando modificações no ritmo cardíaco e picos hipertensivos em uma proporção relevante de pacientes que fizeram seu uso (GALBRAITH et al., 2003).

Existe uma homologia de cerca de 80% entre a tubulina da *Leishmania* e a do ser humano. A diferença na sequência pode ser usada como base para direcionar os compostos quimioterápicos para o esqueleto da *Leishmania* (FONG; LEE, 1988).

Portanto, modificações moleculares na CA-4 são importantes para a descoberta de novos fármacos leishmanicidas eficazes e menos tóxicos.

Composta por dois anéis aromáticos e um espaçador etilênico (Figura 11), a CA-4 tem sido amplamente utilizada como protótipo para modificações moleculares na busca de compostos sintéticos que apresentem potência equivalente, melhores parâmetros farmacocinéticos e reduzidos efeitos colaterais (COMBES et.al., 2011). Nos últimos anos, foram realizadas diversas modificações na estrutura da CA-4, baseadas em modificações nos anéis A e/ou B, e no espaçador etilênico (TRON et al., 2006).

Figura 11. Subunidades que constituem a CA-4.



Fonte: Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio -UFRJ).

Os anéis aromáticos da CA-4 não são dispostos de forma plana entre si. Dessa forma, as modificações moleculares realizadas no espaçador etilênico visam manter a distância e os ângulos entre os dois anéis eliminando a possibilidade de isomerização e consequente mudança da disposição espacial propícia para a atividade citotóxica (FURST et.al., 2009). Dentre as modificações estruturais realizadas, merecem destaque aquelas realizadas por Ducki et al. (1998), tendo como base o trabalho publicado por Edwards et al. anos antes (1990), que sintetizaram e avaliaram a atividade citotóxica de oito chalconas sobre a linhagem de leucemia K562 e identificaram que a chalcona correspondente à CA-4 mantém potente atividade citotóxica. Segundo Ducki et al. (1998), a justificativa para a

atividade citotóxica observada para um derivado com estereoquímica *E*, em nível da ligação dupla, com consequente manutenção da inibição da polimerização dos microtúbulos, estaria associada a fatores conformacionais e à preferência pela conformação *s-trans* das chalconas testadas quando em solução.

O aumento da incidência da leishmaniose associado às limitações do tratamento desta doença negligenciada, a torna um importante alvo para novas pesquisas com objetivo de buscar novas terapêuticas. Nesse sentido, o Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio-UFRJ) desenvolveu análogos da CA-4, com finalidade de encontrar novos protótipos de fármacos leishmanicida.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade leishmanicida e o potencial citotóxico de duas séries de derivados *N*-acilhidrazônicos e semicarbazônicos da combretastatina A-4, contribuindo, assim, para o estudo de protótipos de fármacos leishmanicidas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar o potencial citotóxico dos derivados da CA-4 para a célula hospedeira (Macrófagos da linhagem J774);
- ✓ Investigar a atividade dos derivados da CA-4 sobre formas promastigotas extracelulares de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* em ensaio *in vitro*;
- ✓ Verificar a atividade leishmanicida *in vivo* em camundongos BALB/c pelo acompanhamento do curso da infecção e determinação da carga parasitária;
- ✓ Realizar a dosagem de alanino aminotransferase (ALT/TGP), aspartato aminotransferase (AST/TGO), creatinina e ureia nos grupos de camundongos BALB/c do ensaio *in vivo*;
- ✓ Avaliar alteração de peso no baço dos grupos de camundongos do ensaio *in vivo*, através de pesagem em balança analítica.

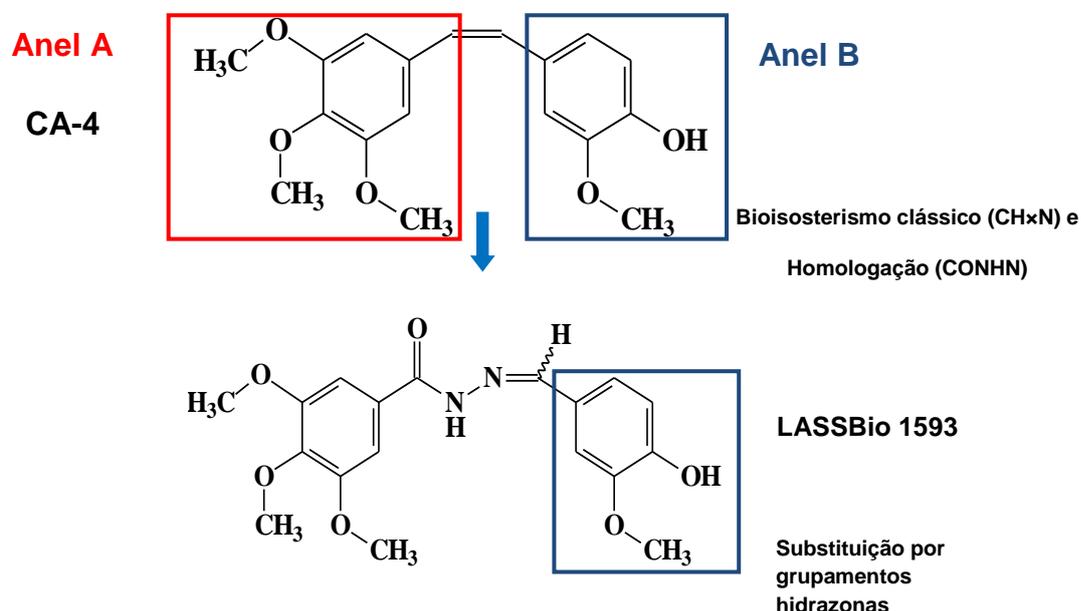
4 METODOLOGIA

4.1 Planejamento dos derivados *N*-acilhidrazonas e semicarbazônicos da CA-4

Os derivados da CA-4 foram planejados pelo grupo de pesquisa dos professores Dr. Eliezer de Jesus Barreiro, Dra. Lídia Moreira Lima e o doutorando Daniel do Nascimento Amaral do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Biotivas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (LASSBio-UFRJ).

Foram planejadas duas séries de derivados da CA-4. Inicialmente realizou-se uma estratégia de homologação sobre a estrutura do protótipo CA-4, representada pela inserção do grupo CONHN (hidrazona) como espaçador entre as subunidades aromáticas do protótipo CA-4, de modo a permitir a construção de um análogo direto do protótipo selecionado, o LASSBio 1593 (Figura 12).

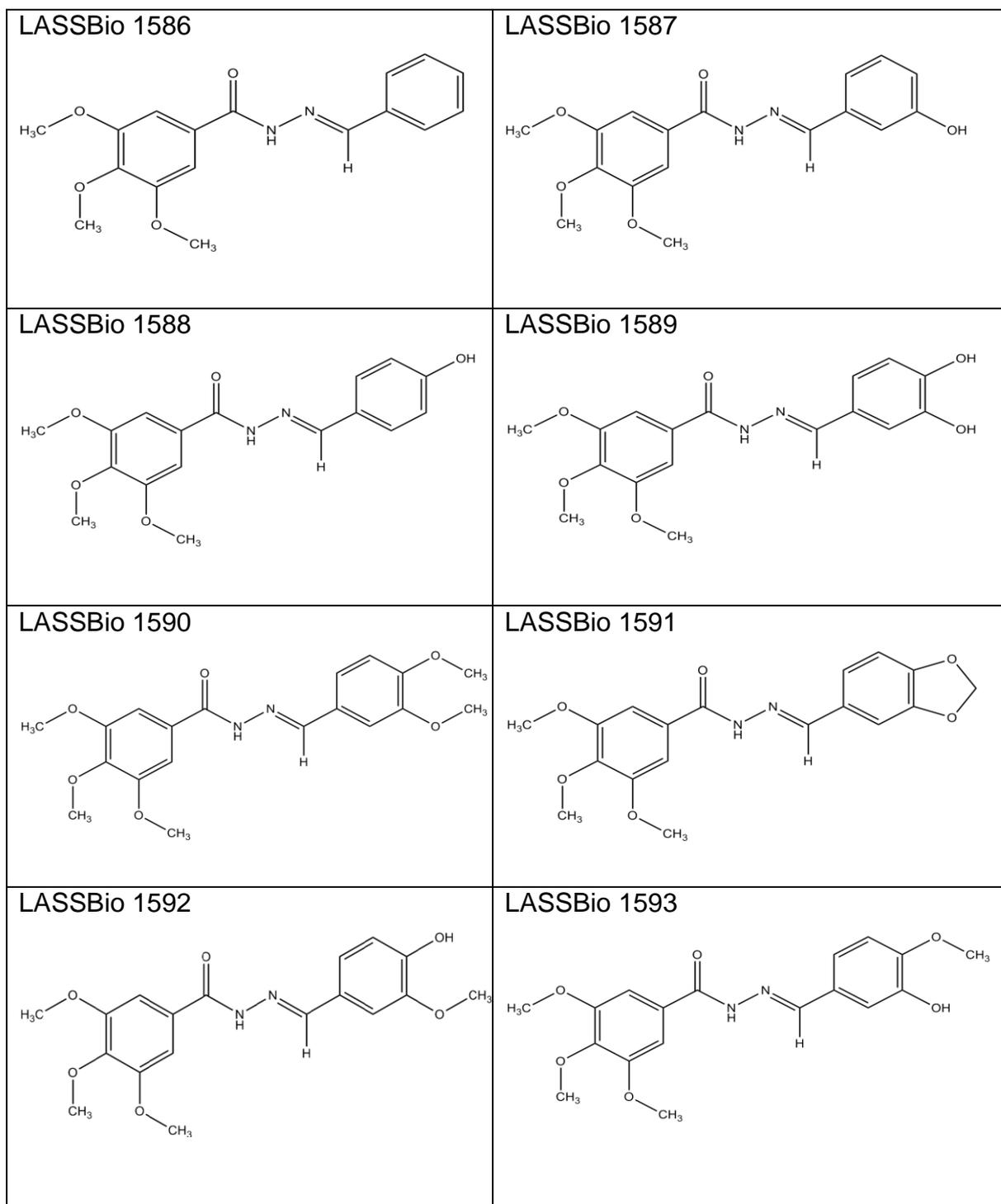
Figura 12. Construção de série congênere 1.

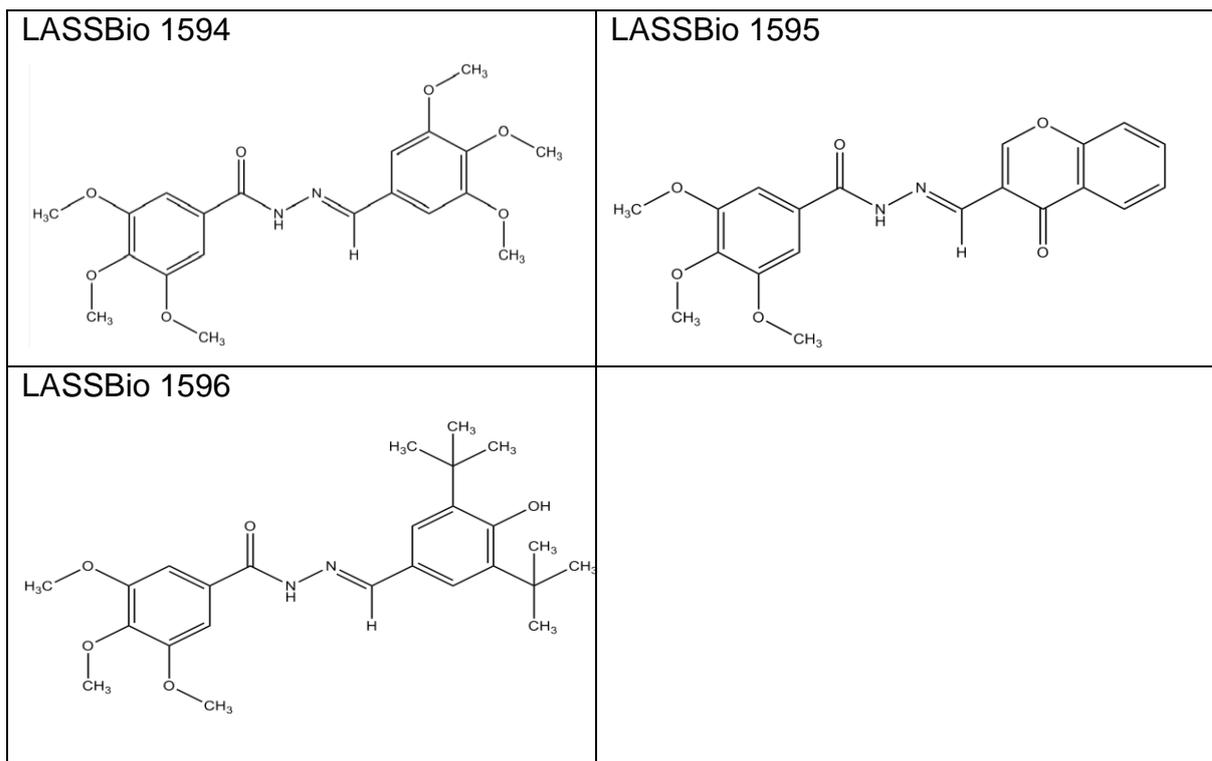


Posteriormente foi planejada a adição de substituintes nas posições *meta* e *para* do anel B, explorando diferentes padrões de oxigenação, tamanho e propriedades oxi-redutivas/ antioxidantes dos substituintes, resultando no

planejamento de 11 compostos *N*-acilhidrazônicos e 3 semicarbazônicos (Figura 13 e figura 14, respectivamente).

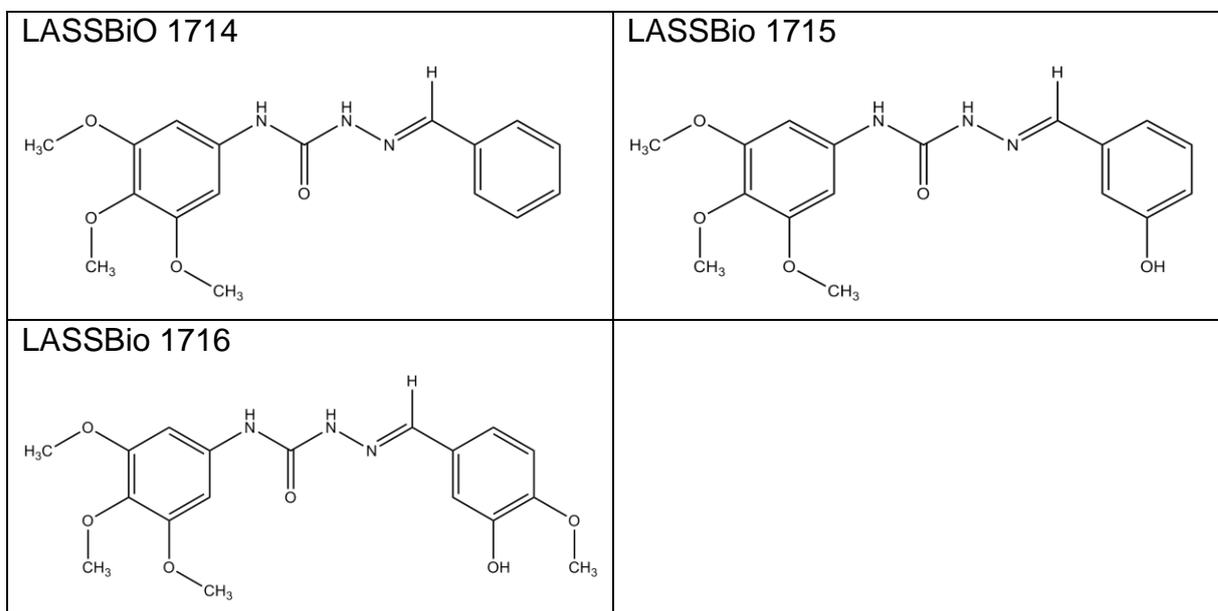
Figura 13. Representação dos análogos *N*-acilhidrazônicos (série congênere 1).





Fonte: Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ). Responsável pela síntese: Msc. Daniel do Nascimento Amaral (LASSBio-UFRJ).

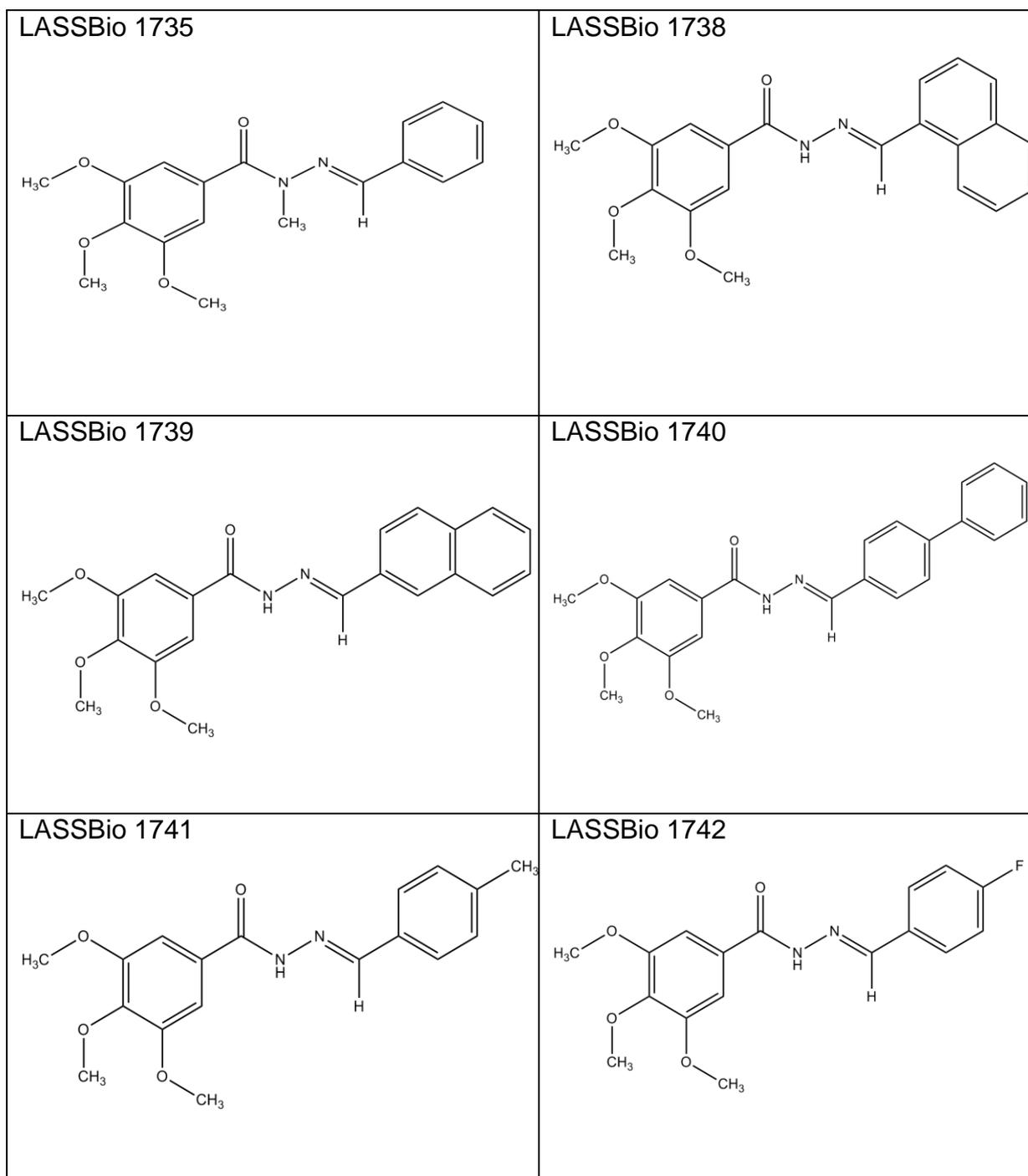
Figura 14. Representação dos análogos semicarbazônicos (série congênere 1).

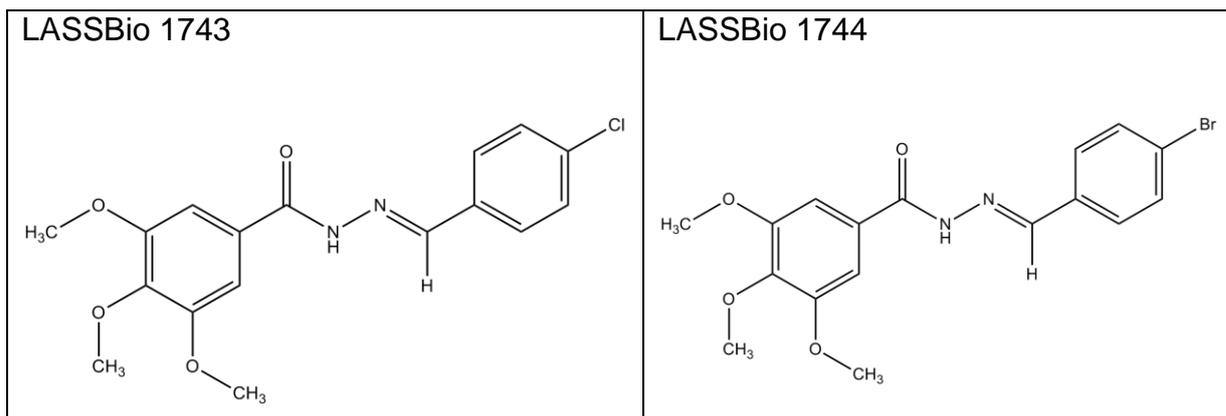


Fonte: Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ). Responsável pela síntese: Msc. Daniel do Nascimento Amaral (LASSBio-UFRJ).

Foi observado que o sítio de reconhecimento molecular de LASSBio-1586, derivado mais potente e seletivo em ensaios para atividade anticâncer da série 1 (dados do LASSbio-UFRJ), é essencialmente dependente da participação de aminoácidos hidrofóbicos. Partindo deste pressuposto, oito novos derivados *N*-acilhidrazônicos foram planejados, permitindo, assim, a construção da série congênere 2 (Figura 15).

Figura 15. Representação dos análogos *N*-acilhidrazônicos (série congênere 2).





Fonte: Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio-UFRJ). Responsável pela síntese: Msc. Daniel do Nascimento Amaral (LASSBio-UFRJ).

4.2 Preparação dos derivados da CA-4

Os derivados da CA-4 foram solubilizados em dimetilsulfóxido a 0,1% (DMSO) formando a solução estoque I (100. μM). No momento dos experimentos, foi realizada diluição seriada para obtenção das concentrações de 100 a $10^{-7}\mu\text{M}$ e foram plaqueados em triplicata em placas de 96 poços. Os derivados da CA-4 apresentaram pouca solubilidade, portanto, eram homogeneizados em aparelho vortex antes de serem usados para os experimentos para maior solubilização nos meios utilizados nos experimentos.

4.3 Experiências *in vitro*

4.3.1 Manutenção de linhagem de células

Foram utilizados macrófagos da linhagem J774 para os ensaios *in vitro* de determinação da viabilidade celular e de infecção. Essas células foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com soro fetal bovino (SFB) a 10%. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

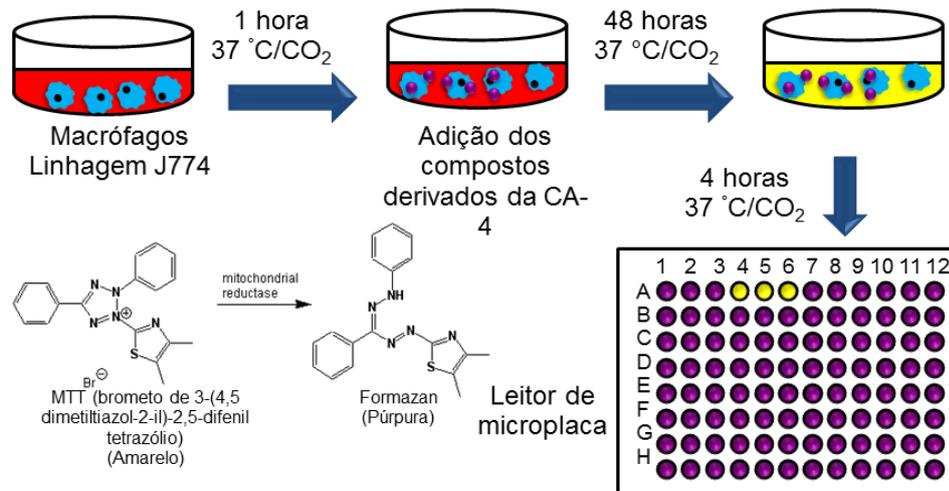
4.3.2 Manutenção dos parasitos

As espécies *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788), *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/77/LTB0016) e *L. chagasi* (cepa MCAN/BR/89/BA262) foram utilizadas para avaliação da atividade leishmanicida. As formas promastigotas foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio Schneider (sigma) com 10% de SFB em estufa BOD, a 27 °C. No momento do uso, os parasitos foram colocados em tubos Falcon e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspenso em meio Schneider (sigma). Fez-se, então, a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer, para posterior plaqueamento e realização dos experimentos.

4.3.3 Ensaio de viabilidade celular

O estudo de viabilidade de macrófagos frente aos compostos derivados da CA-4 foi realizado utilizando o método de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Neste ensaio, os macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados (5×10^5 /por poço) e expostos a diferentes concentrações dos compostos (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 μ M) por um período de 48 horas. Os poços controles continham células cultivadas somente com meio de cultura e células cultivadas na presença do diluente das substâncias DMSO. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 200 μ L da solução de MTT (10% em meio DMEM) em cada poço. As placas foram então reincubadas durante 4 horas em estufa a 37°C e a 5% de CO₂ e realizada a leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Os resultados foram expressos como percentual de morte celular, considerando como controle 100% a contagem de células viáveis em culturas não estimuladas (MOSMANN, 1983) (Figura 16).

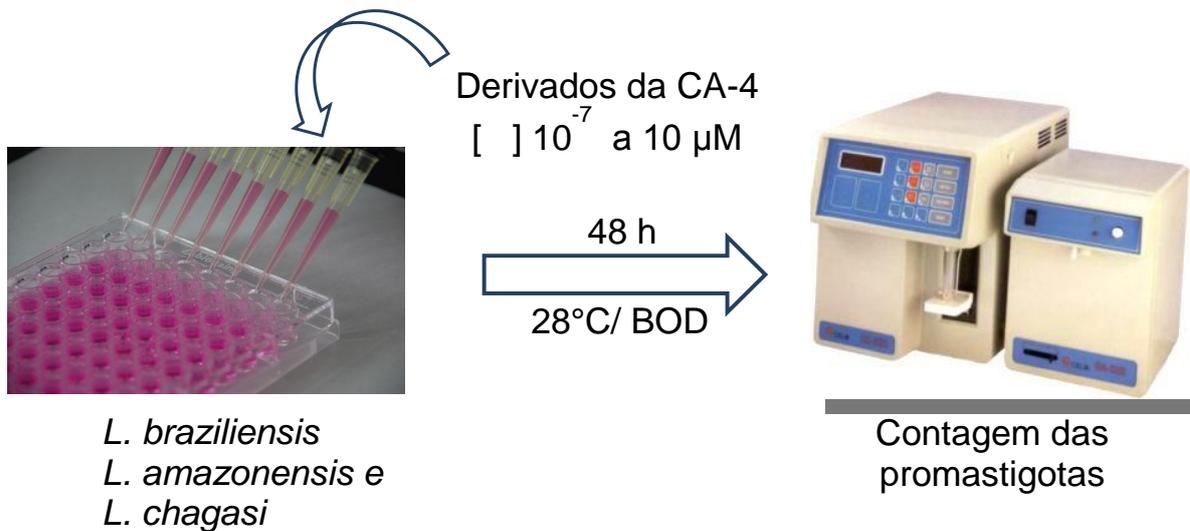
Figura 16. Ilustração do ensaio de redução de MTT.



4.3.4 Ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*

As formas promastigotas das espécies de *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram plaqueadas (5×10^6 parasitos/poço num volume de 100 μ L) em triplicatas em placa de 96 poços com meio Schneider (sigma) suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina e 2% de urina humana e expostas a diferentes concentrações dos compostos derivados da CA-4 (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 0,1, 1, 10 μ M). Em seguida, a placa foi incubada em estufa BOD a 27 °C por 48 horas. Após esse período, os parasitos foram homogeneizados e 20 μ L da suspensão foi transferida para um tubo contendo 10 mL de isoton, sendo o número de parasitos determinado em contador automático de células (Coulter, modelo Z₁) (ÁVILA et al., 1997) (Figura 17).

Figura 17. Ilustração do ensaio de viabilidade dos parasitos *in vitro*.



4.4 Experiências *in vivo*

4.4.1 Procedimentos éticos adotados nos experimentos

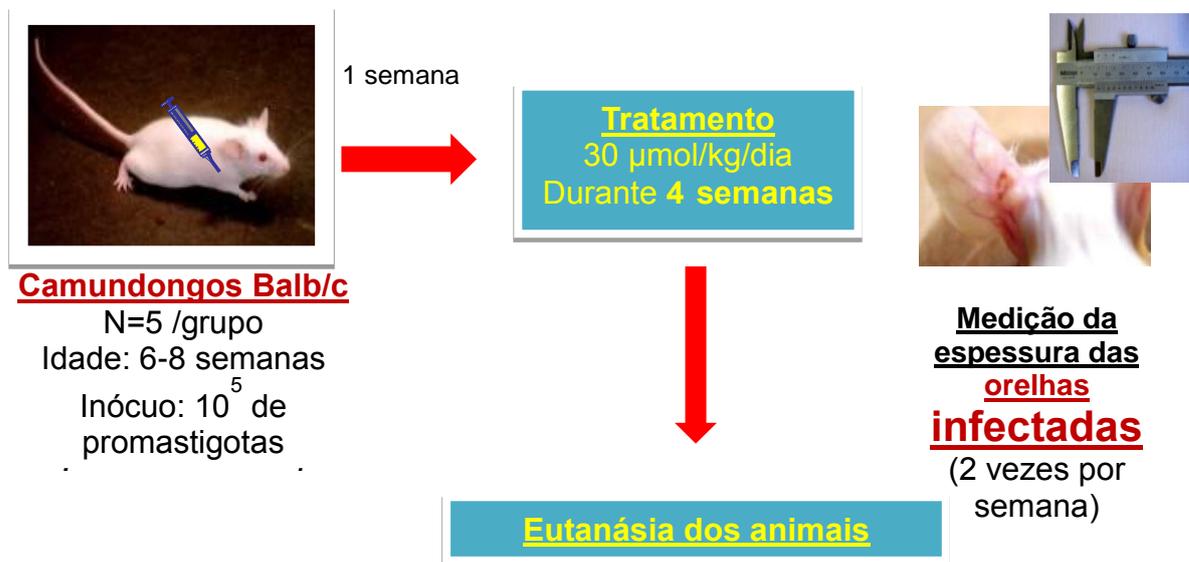
Foram utilizados Vinte e cinco camundongos da linhagem BALB/c (20-25g) machos, adultos jovens, com 6 a 8 semanas de idade, para determinar o efeito terapêutico dos compostos selecionados no modelo *in vitro*. Os animais foram provenientes do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), cedidos pelo Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha e foram manipulados de acordo com normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Utilização de Animais de Laboratório da UFAL. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da UFAL (no. 003570/2011/63)

4.4.2 Ensaio *In vivo* de infecção com promastigotas na orelha de camundongos BALB/c– Adaptado de Pereira et al., (2010)

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) (1×10^5 células em 10 μ L) foram inoculadas por via subcutânea na orelha de camundongos Balb/c. Foram utilizados 5 animais por grupo, estes resumem-se a grupos tratados com o fármaco padrão glucantime (sintetizado e cedido pelo grupo de pesquisa do professor Dr. Mário Roberto Meneghetti/UFAL), com o derivado LASSBio 1588 e com o derivado LASSBio 1738. Além, do grupo infectado/não tratado e grupo não infectado. Após uma semana de infecção, os animais foram tratados com os derivados LASSBio 1588 e LASSBio 1738, previamente selecionados a partir de ensaios *in vitro* de viabilidade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e com o fármaco padrão glucantime por via ip na dose de 30 mg/kg (O LASSBio 1588 foi selecionado devido a semelhança com o LASSBio 1589, derivado ativo contra promastigotas de *L. amazonensis*, porém que é tóxico para células de mamíferos - dados cedidos pelo grupo de Pesquisa do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas, e o derivado LASSBio 1738 foi selecionado devido a eficácia e potência contra promastigotas de *L. amazonensis*).

O tratamento foi realizado em uma única dose diária por dia, durante 28 dias. O tamanho da lesão foi medido em mm duas vezes por semana durante o período de tratamento, utilizando um paquímetro digital e expresso através da diferença entre a orelha infectada e a não infectada (Figura 18). Além disso, os animais foram pesados durante o período do tratamento para verificar se houve alteração significativa no peso do animal. Após as quatro semanas de tratamento os animais foram anestesiados para realização da punção cardíaca, o sangue coletado foi centrifugado a 1500 rpm por cinco minutos para obtenção do soro, e com este, foi realizada a dosagem das concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanino aminotransferase (ALT), creatinina e ureia, para análise de possíveis alterações enzimáticas. Posteriormente, as orelhas infectadas e os linfonodos drenantes foram assepticamente excisados e macerados em Schneider (sigma) para determinação da carga parasitária através da análise de diluições limitantes e o baço foi retirado para pesagem em balança analítica.

Figura 18. Ensaio *in vivo* (Modelo de infecção na orelha de animais BALB/c com *L. amazonensis*).



4.4.3 Dosagem da enzima ALT

A determinação da atividade de alanino aminotransferase (ALT/TGP) foi realizada através do kit ALT/TGP (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, adiciona-se 100 μL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (10 μL do plasma dos animais infectados com *L. amazonensis* utilizados no ensaio *in vivo*) e, logo após 30 segundos, é realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 340 nm. O reagente de trabalho consiste em uma solução de alanina, 2-oxoglutarato, lactato desidrogenase (LDH) e coenzima NADH. A AST catalisa a transferência do grupo amino do alanino para 2-oxoglutarato com a formação de piruvato e glutamato e, posteriormente, o piruvato é reduzido a lactato por ação da LDH, e paralelamente a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A coenzima NADH tem um coeficiente de absorção molar elevado em 340 nm, sendo quase nula a absorção de NAD. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da ALT. A atividade enzimática é calculada através da diminuição da absorbância da solução de NADH em 340nm.

4.4.4 Dosagem da enzima AST

A determinação da atividade de aspartato aminotransferase (AST/TGO) foi realizada através do kit AST/TGO (Doles), segundo metodologia especificada pelo fabricante. Para tanto, adiciona-se 100 μL do reagente de trabalho do kit em cada poço contendo as amostras (10 μL do plasma dos animais infectados com *L. amazonensis* utilizados no ensaio *in vivo*) e, logo após 30 segundos, é realizada a leitura da absorbância na placa de 96 poços a 340 nm. O reagente de trabalho consiste em uma solução de aspartato, 2-oxoglutarato, malato desidrogenase (MDH) e coenzima NADH. A AST catalisa a transferência do grupo amino do aspartato para 2-oxoglutarato com a formação de oxalacetato e glutamato e, posteriormente, o oxalacetato é reduzido a malato por ação da MDH, e paralelamente a coenzima NADH é oxidada a NAD^+ . A coenzima NADH tem um coeficiente de absorção molar elevado em 340 nm, sendo quase nula a absorção de NAD. A oxidação de NADH é diretamente proporcional à atividade da AST. A atividade enzimática é calculada através da diminuição da absorbância da solução de NADH em 340nm.

4.4.5 Diluições limitantes

Para quantificação dos parasitos nas orelhas infectadas e linfonodos drenantes foi utilizada a técnica de diluição limitante (TASWELL, 1986). As orelhas infectadas e linfonodos drenantes foram retirados assepticamente e macerados em 1 mL de meio Schneider (sigma) com 10% de soro fetal bovino até a formação de uma suspensão. Posteriormente, 200 μL do macerado de cada amostra foi transferido para placa de cultura de fundo chato de 96 poços, em duplicata, representando a diluição de 1:5. Realizou-se 11 diluições seriadas do macerado, utilizando a proporção de 1:10. As placas foram incubadas em estufa BOD à 26°C por 14 dias. No décimo quarto dia de cultura, a quantidade de parasitos foi calculada multiplicando o fator de diluição, cujo valor era 5, por 10 elevado a potência referente ao número da última diluição que havia presença de pelo menos um parasito.

4.4.6 Pesagem do baço

Após os animais serem eutanasiados, o baço foi retirado para pesagem em balança analítica e os grupos tratados foram comparados com o grupo controle.

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média ($M \pm E.P.M.$) após análise estatística empregando-se análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo pós-teste de Dunnett, onde as diferenças entre as médias foram consideradas significantes quando $p < 0,05$ ao ser comparado ao grupo controle.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de citotoxicidade celular

Inicialmente, investigou-se a citotoxicidade dos compostos derivados da CA-4 sobre macrófagos J774 através do método de MTT. Este método avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) realizada pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase associadas ao NADPH e ao NADH, que resulta na produção de cristais de formazan (coloração arroxeadada e insolúvel em água), permitindo, assim, avaliar a atividade de desidrogenases mitocondriais, sendo quantificado através de espectrofotometria.

Ao ser investigado a citotoxicidade dos derivados da CA-4 em diferentes concentrações (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 μM) observou-se que os derivados LASSBio 1586, LASSBio 1587, LASSBio 1588, LASSBio 1589, LASSBio 1590, LASSBio 1592, LASSBio 1594, LASSBio 1595 e LASSBio 1716 não apresentaram efeito tóxico até a concentração máxima utilizada (100 μM). No entanto, os derivados LASSBio 1591, LASSBio 1593, LASSBio 1596, LASSBio DNA 1586, LASSBio 1714, LASSBio 1715, LASSBio 1738, LASSBio 1739, LASSBio 1740, LASSBio 1741, LASSBio 1742, LASSBio 1743 e LASSBio 1744 apresentaram efeito tóxico significativo ($p < 0,01$) para os macrófagos da linhagem J774, quando comparado ao controle DMSO 0,1%. Os compostos LASSBio 1735, LASSBio 1739, LASSBio 1741, LASSBio 1742, LASSBio 1743 e LASSBio 1744 apresentaram efeito tóxico semelhante ao protótipo de origem, a CA-4, que apresentou uma citotoxicidade máxima de $98,7 \pm 0,04\%$ (Tabela 1). Vale destacar que o veículo utilizado para solubilizar todas as substâncias (DMSO 0,1%) não apresentou efeito tóxico significativo para a célula, quando comparado ao controle negativo (células cultivadas apenas em meio de cultura). Desta forma, a toxicidade das substâncias não pode ser atribuída a presença de DMSO na cultura.

Tabela 1. Efeito dos derivados da CA-4 sobre a viabilidade de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT.

| SUBSTÂNCIA | CL ₅₀ (µM) ^a | CITOTÓXICIDADE MÁXIMA (%) ^b |
|--------------|------------------------------------|--|
| Pentamidina | 96,5 ± 1,5 | 52,5 ± 8,5** |
| C-A4 | 0,63 ± 0,03 | 98,7 ± 0,04** |
| LASSBio 1586 | > 100 | NT |
| LASSBio 1587 | > 100 | NT |
| LASSBio 1588 | > 100 | NT |
| LASSBio 1589 | > 100 | NT |
| LASSBio 1590 | > 100 | NT |
| LASSBio 1591 | 81,25 ± 11,25 | 52,4 ± 9,7** |
| LASSBio 1592 | > 100 | NT |
| LASSBio 1593 | > 100 | 45,7 ± 3,8** |
| LASSBio 1594 | > 100 | NT |
| LASSBio 1595 | > 100 | NT |
| LASSBio 1596 | > 100 | 47,6 ± 1,9** |
| LASSBio 1714 | 0,67 ± 0,14 | 82,7 ± 3,8** |
| LASSBio 1715 | > 100 | 46,4 ± 2,1** |
| LASSBio 1716 | > 100 | NT |
| LASSBio 1735 | 0,47 ± 0,07 | 98,9 ± 0,26** |
| LASSBio 1738 | 0,63 ± 0,1 | 87,6 ± 5,9** |
| LASSBio 1739 | 0,65 ± 0,09 | 94,0 ± 8,9** |
| LASSBio 1740 | 0,67 ± 0,03 | 50,2 ± 2,1** |
| LASSBio 1741 | 0,1 ± 0,01 | 99,1 ± 0,1** |
| LASSBio 1742 | 3,7 ± 0,6 | 98,2 ± 0,1** |
| LASSBio 1743 | 0,57 ± 0,03 | 98,5 ± 0,4** |
| LASSBio 1744 | 0,6 ± 0,06 | 94,2 ± 7,5** |

Os resultados referem-se a: ^a Concentração Letal de 50 % (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^bMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando **p* < 0,05, ***p* < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não apresenta atividade letal significativa para célula até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

Pode-se observar que dos derivados da série 1, apenas os derivados LASSBio 1591, LASSBio 1593 e LASSBio 1596 foram citotóxicos para os macrófagos J774, demonstrando que a adição de substituintes nas posições *meta* e *para* do anel B, com diferentes padrões de oxigenação, tamanho e propriedades oxirredutivas/antioxidantes, resultaram em uma série de derivados com baixa citotoxicidade, diferente do seu composto protótipo (CA-4). No entanto, dos derivados semicarbazônicos da série 1 apenas a toxicidade do derivado LASSBio 1716 não foi influenciado com a inserção de substituintes.

Em contrapartida, a segunda série foi mais citotóxica do que a primeira série planejada, isto pode estar relacionado ao fato da inserção de substituintes hidrofóbicos na estrutura do protótipo de origem LASSBio 1586, realizando modificações conformacionais na estrutura dos anéis A e/ou B e no espaçador etilênico da CA-4. Esses dados sugerem que as substituições por grupamentos lipofílicos, como halogênios, conferiram aos novos derivados uma alta citotoxicidade, fato não observado com o protótipo desta segunda série, o LASSBio 1586. No entanto, como observado na Tabela 1, o derivado LASSBio 1735 apresentou uma alta citotoxicidade. Pode-se atribuir esse efeito a ausência de substituintes no anel B, presente em todos os outros congêneres da série.

5.2 Ensaio de viabilidade de parasitos *in vitro*

Com o objetivo de verificar uma possível atividade leishmanicida direta sobre o parasito, calculou-se a concentração inibitória 50% (CI₅₀) do crescimento de promastigotas dos derivados da CA-4 e pentamidina contra promastigotas das espécies de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi* (10⁻⁷, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴, 10⁻³, 10⁻², 0,1, 1, 10 µM). O ensaio foi realizado com os compostos em concentrações baixas por serem altamente tóxicos e ativos até na ordem de nanomolar nos ensaios para atividade contra células cancerígenas (dados cedidos pelo Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas)

Os resultados obtidos na avaliação da atividade anti-promastigota contra *L. braziliensis* evidenciaram que os derivados LASSBio 1594, LASSBio 1714, LASSBio 1715, LASSBio 1716, LASSBio 1735, LASSBio 1738, LASSBio 1739, LASSBio 1740, LASSBio 1741, LASSBio 1742 e LASSBio 1744 apresentaram efeito leishmanicida,

com destaque para as substâncias LASSBio 1714, LASSBio 1735 e LASSBio 1740, que apresentaram efeito máximo (E.M.) contra o crescimento de promastigotas de *L. braziliensis* de $72,94 \pm 0,5$, $68,6 \pm 3,0$, e $68,0 \pm 8,0\%$, com CI_{50} de $0,005 \pm 0,001$, $0,07 \pm 0,003$, e $0,004 \pm 0,002 \mu\text{M}$, respectivamente. Além disso, os derivados LASSBio 1714, LASSBio 1738, LASSBio 1739, LASSBio 1740, LASSBio1741, LASSBio 1742 e LASSBio 1744 foram ativos na ordem de nanomolar (10^{-9}), com CI_{50} 5 ± 1 , $0,08 \pm 0,01$, $0,08 \pm 0,01$, 4 ± 2 , $0,7 \pm 0,3$, $0,09 \pm 0,003$ e $0,08 \pm 0,004$ e efeito máximo de $72,94 \pm 0,5$, $59,6 \pm 2,9$, $55,5 \pm 4,3$, $59,4 \pm 2,6$, $57,1 \pm 4,0$, $68,0 \pm 8,0$ e $57,0 \pm 4,0\%$, respectivamente. Ademais, o protótipo padrão CA-4 induziu E.M. de $56,1 \pm 2,4$ com CI_{50} de $0,49 \pm 0,2 \mu\text{M}$, deste modo, exibindo potência inferior aos seus derivados (Tabela 2).

Tabela 2. Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis*

| SUBSTÂNCIA | CI ₅₀ ^a | E.M. ^b (%) | SUBSTÂNCIA | CI ₅₀ ^a | E.M. ^b (%) |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------------|-----------------------|
| Pentamidina | 6,8 ± 0,3 µM | 76,7 ± 2,0** | LASSBio 1596 | >100 | NA |
| C-A4 | 0,49 ± 0,2 µM | 56,1 ± 2,4** | LASSBio 1714 | 5 ± 1 nm | 72,94 ± 0,5** |
| LASSBio 1586 | >100 | NA | LASSBio 1715 | >100 | 42,5 ± 2,0* |
| LASSBio 1587 | >100 | NA | LASSBio 1716 | >100 | 44,1 ± 5,7** |
| LASSBio 1588 | >100 | NA | LASSBio 1735 | 0,07 ± 0,003 µM | 68,6 ± 3,0** |
| LASSBio 1589 | >100 | NA | LASSBio 1738 | 0,08 ± 0,01 nm | 59,6 ± 2,9** |
| LASSBio 1590 | >100 | NA | LASSBio 1739 | 0,08 ± 0,01 nm | 55,5 ± 4,3** |
| LASSBio 1591 | >100 | NA | LASSBio 1740 | 4 ± 2 nm | 68,0 ± 8,0** |
| LASSBio 1592 | >100 | NA | LASSBio 1741 | 0,7 ± 0,3 nm | 59,4 ± 2,6** |
| LASSBio 1593 | >100 | NA | LASSBio 1742 | 0,09 ± 0,003 nm | 57,1 ± 4,0** |
| LASSBio 1594 | 5,1 ± 1,0 µM | 64,9 ± 2,3** | LASSBio 1743 | >100 | NA |
| LASSBio 1595 | >100 | NA | LASSBio 1744 | 0,08 ± 0,004 nm | 57,0 ± 4,0** |

Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI₅₀) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

Por sua vez, no ensaio contra o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, os derivados LASSBio 1589, LASSBio 1593, LASSBio 1738, LASSBio 1740, LASSBio 1741 induziram atividade contra o parasito. As substâncias LASSBio 1589 e LASSBio 1738 se destacaram com CI₅₀ de 6,6 ± 0,4 µM e 5 ± 1 nm e E.M. de

75,0 ± 5,1 e 63,7 ± 1,3%, respectivamente. O protótipo CA-4 não apresentou atividade significativa contra promastigotas de *L. amazonensis* (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*

| SUBSTÂNCIA | CI ₅₀ ^a | E.M. ^b (%) | SUBSTÂNCIA | CI ₅₀ ^a | E.M. ^b (%) |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|--------------|-------------------------------|-----------------------|
| Pentamidina | 2,6 ± 0,4 | 92,2 ± 0,4** | LASSBio 1596 | >100 | NA |
| C-A4 | >100 | NA | LASSBio 1714 | >100 | NA |
| LASSBio 1586 | >100 | NA | LASSBio 1715 | >100 | NA |
| LASSBio 1587 | >100 | NA | LASSBio 1716 | >100 | NA |
| LASSBio 1588 | >100 | NA | LASSBio 1735 | >100 | NA |
| LASSBio 1589 | 6,6 ± 0,4 | 75,0 ± 5,1** | LASSBio 1738 | 5 ± 1 nm | 63,7 ± 1,3** |
| LASSBio 1590 | >100 | NA | LASSBio 1739 | >100 | NA |
| LASSBio 1591 | >100 | NA | LASSBio 1740 | >100 | 41,6 ± 0,4* |
| LASSBio 1592 | >100 | NA | LASSBio 1741 | >100 | 37,5 ± 4,1* |
| LASSBio 1593 | >100 | 40,8 ± 5,5** | LASSBio 1742 | >100 | NA |
| LASSBio 1594 | >100 | NA | LASSBio 1743 | >100 | NA |
| LASSBio 1595 | >100 | NA | LASSBio 1744 | >100 | NA |

Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI₅₀) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média ± erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 até a concentração de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

Ao referir sobre o ensaio contra formas promastigotas de *L. chagasi*, os derivados LASSBio 1586, LASSBio 1587, LASSBio 1588, LASSBio 1589, LASSBio 1590, LASSBio 1591, LASSBio 1592, LASSBio 1593, LASSBio 1596, LASSBio 1715,

LASSBio 1735, LASSBio 1738 e LASSBio 1740 foram eficazes contra o parasito, destacando-se os derivados LASSBio 1586, LASSBio 1587, LASSBio 1588, LASSBio 1590, LASSBio 1591 e LASSBio 1592, com E.M. de $64,3 \pm 1,3$, $66,3 \pm 4,5$, $54,5 \pm 2,4$, $55,1 \pm 4,3$, $57,9 \pm 5,0$ e $63,7 \pm 3,0\%$, com CI_{50} de 3 ± 1 nm, $0,09 \pm 0,02$ μ M, $0,08 \pm 0,006$ μ M, 8 ± 1 nm, $0,5 \pm 0,2$ μ M e $0,02 \pm 0,008$ μ M, respectivamente. O protótipo CA-4 exibiu efeito máximo de $43,4 \pm 3,7\%$ e a pentamidina (fármaco padrão) não apresentou atividade contra formas promastigotas de *L. chagasi*.

Tabela 4. Efeito leishmanicida da pentamidina, CA-4 e compostos derivados da CA-4 contra o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi*

| SUBSTÂNCIA | CI_{50}^a | E.M. ^b (%) | SUBSTÂNCIA | CI_{50}^a | E.M. ^b (%) |
|--------------|--------------------------|-----------------------|--------------|-------------|-----------------------|
| Pentamidina | >100 | NA | LASSBio 1596 | >100 | $31,7 \pm 6,2^*$ |
| C-A4 | >100 | $43,4 \pm 3,7^{**}$ | LASSBio 1714 | >100 | NA |
| LASSBio 1586 | 3 ± 1 nm | $64,3 \pm 1,3^{**}$ | LASSBio 1715 | >100 | $38,0 \pm 3,8^*$ |
| LASSBio 1587 | $0,09 \pm 0,02$ μ M | $66,3 \pm 4,5^{**}$ | LASSBio 1716 | >100 | NA |
| LASSBio 1588 | $0,08 \pm 0,006$ μ M | $54,5 \pm 2,4^{**}$ | LASSBio 1735 | >100 | $43,4 \pm 1,0^{**}$ |
| LASSBio 1589 | >100 | $45,3 \pm 0,2^{**}$ | LASSBio 1738 | >100 | $39,3 \pm 3,1^*$ |
| LASSBio 1590 | 8 ± 1 nm | $55,1 \pm 4,3^{**}$ | LASSBio 1739 | >100 | NA |
| LASSBio 1591 | $0,5 \pm 0,2$ μ M | $57,9 \pm 5,0^{**}$ | LASSBio 1740 | >100 | $40,2 \pm 3,1^*$ |
| LASSBio 1592 | $0,02 \pm 0,008$ μ M | $63,7 \pm 3,0^{**}$ | LASSBio 1741 | >100 | NA |
| LASSBio 1593 | >100 | $45,08 \pm 4,3^{**}$ | LASSBio 1742 | >100 | NA |
| LASSBio 1594 | >100 | NA | LASSBio 1743 | >100 | NA |
| LASSBio 1595 | >100 | NA | LASSBio 1744 | >100 | NA |

Os resultados referem-se a: ^a Concentração inibitória de 50 (CI_{50}) do crescimento de promastigotas calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média \pm erro padrão da média; ^b Efeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima \pm erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de E.M. foram considerados significativos quando $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ até a concentração de 100 μ M em relação ao grupo DMSO.

Em um estudo de Del Rey et al. (1999) sobre a atividade leishmanicida de análogos e heteroanálogos da CA-4 contra formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* nas concentrações de 50, 25 e 10 µg/mL, foi observado que alguns análogos causaram a lise total das promastigotas na concentração de 50 µg/mL e cerca de 90% de lise na concentração de 10 µg/mL. Conformações stilbenóides heterocíclicas, constituem sistemas esqueléticos úteis para apoiar a atividade leishmanicida, representando compostos de alta potência antileishmaniana (DEL REY et al., 1999).

Em relação ao tipo de substituintes, foi observado que os análogos que possuíam o grupo substituinte 3,4,5 trimetoxifenil apresentavam boa atividade. Logo foram sintetizados derivados incorporando em todos os casos trimetoxifenil com outros grupos, destes os que mostraram-se mais promissores como agentes leishmanicidas foram 2-naftilo 3,4 – metilenodioxifenilo, assim colaborando para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas (DEL REY et al., 1999). Este estudo corrobora com os resultados desse trabalho onde os derivados da CA-4 sintetizados pelo LASSBio/UFRJ apresentam substituintes metoxi em sua estrutura e mostraram-se promissores em atividade leishmanicida. O estudo de Del Rey et al. (1999) mostra que os análogos não foram seletivos para as espécies de *Leishmania* estudadas. Isto confirma que diferentes substituintes podem induzir seletividade para uma determinada espécie de *Leishmania*, como reproduzido nesse trabalho, onde derivados da CA-4 com diferentes substituintes apresentaram seletividade para as espécies de *Leishmania* em estudo.

Outros trabalhos, também com stilbenóides, apontam alguns derivados com significativa atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. infantum*, apoiando o fato de stilbenóides representarem alvos a serem estudados para atividade antileishmaniana, além disso, o derivado *cis*-stilbenóide foi menos ativo que o isômero *trans* correspondente (TOLOMEIO et al., 2013). Este dado confirma a ideia de Ducki et al. (1998) que a atividade citotóxica, com consequente manutenção da inibição da polimerização dos microtúbulos, estaria associada a fatores conformacionais e à preferência pela conformação *s-trans* das chalconas testadas quando em solução, identificando assim, que a chalcona correspondente a CA-4 mantém melhor atividade citotóxica, consequentemente, mudanças na conformação podem ocasionar aumento de atividade de substâncias.

Em um estudo de Benítez et al. (2013), onde investigou-se a atividade de *N*-acilhidrazonas sobre promastigotas de *L. major*, mostrou que o protótipo de origem não apresentou-se ativo contra esta espécie, assim como o derivado da CA-4, LASSBio 1743, de estrutura semelhante que não induziu atividade contra promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Já o complexo ligante vanadil apresentou atividade significativa (BENÍTEZ et al., 2013), isto pode ser devido a maior absorção pelas células ou a uma maior interação com o DNA do parasito. Portanto, a inserção de grupamentos na estrutura de um stilbenóide pode conferir a este, perfil de ação multialvo.

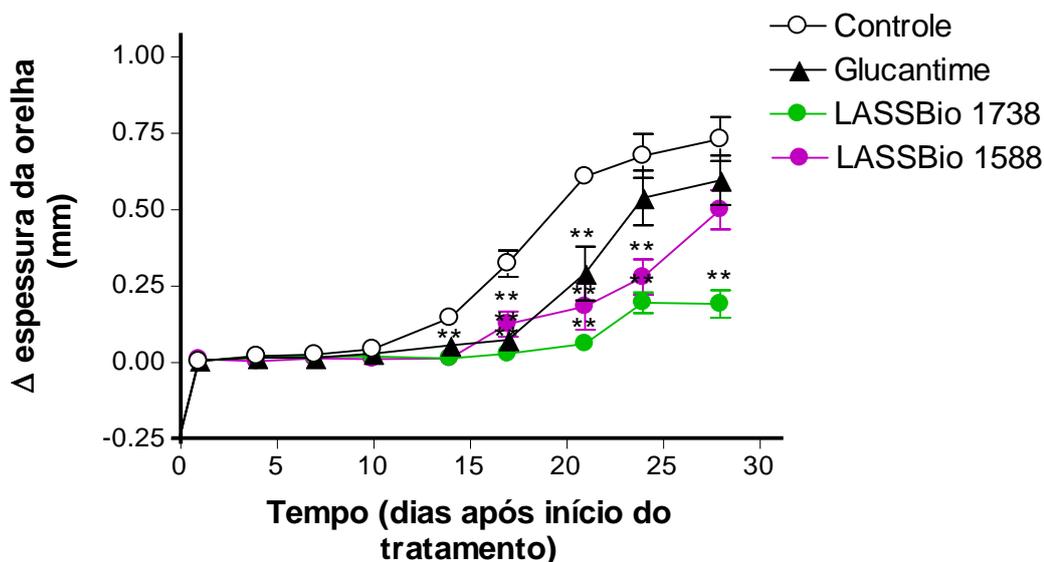
Após o ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas, foram selecionados 2 derivados da CA-4 para o ensaio de infecção *in vivo* com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os derivados selecionados, foram o LASSBio 1588 e o LASSBio 1738. O LASSBio 1738 apresentou potência elevada contra *leishmania*, já o LASSBio 1588, apesar de não apresentar atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, apresenta estrutura semelhante ao LASSBio 1589 que mostrou-se ativo, porém que é muito tóxico para células do mamífero.

5.3 Ensaio de infecção *in vivo*

No ensaio de infecção *in vivo*, foi observado durante o curso da lesão de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania*, que os derivados LASSBio 1588 e LASSBio 1738 apresentaram significativa diminuição da lesão quando comparado ao controle. O LASSBio 1588 exibiu atividade semelhante ao fármaco controle o glucantime, não conseguindo manter a lesão controlada nos últimos dias do tratamento. Já o derivado LASSBio 1738 foi capaz de controlar a lesão durante todo o tratamento (Figura 19) (Figura 21). Estes dados corroboram com o estudo de Nakayama et al. (2009), que investigou dois derivados da CA-4 no ensaio de infecção *in vivo* com *L. amazonensis* na pata de animais BALB/c, neste observou-se que um dos derivados SAAS-59, correspondente a estrutura 5-metoxi-2-(5-metilfurano)-3-(3,4,5-trimetoxifenol) foi capaz de reduzir o tamanho da lesão de forma semelhante por via oral e intralesão, porém por via subcutânea apresentou um melhor perfil leishmanicida, atingindo a redução do tamanho da lesão em mais de 21% (na dose de 50 mg/kg). Estes dados sugerem, que a via de administração

interferiu na absorção. Além disso, o derivado SAAS-59 apresenta o substituinte metoxi, que é importante para a atividade leishmanicida.

Figura 19. Efeito leishmanicida em BALB/c dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime.



Efeito *in vivo* do tratamento com LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias sobre o curso da lesão de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. Lesões foram monitoradas semanalmente. Os resultados são representados pela média \pm e.p.m. da espessura da lesão de cinco animais em cada grupo experimental.

No ensaio *in vivo* foi possível quantificar a carga parasitária encontrada nas orelhas e linfonodos. Neste, o LASSBio 1738 foi capaz de reduzir a carga parasitária de *L. amazonensis* na orelha do animal (Figura 20A), em contrapartida, no linfonodo não reduziu a carga parasitária de forma estatisticamente significativa (Figura 20B). O LASSBio 1588, não foi capaz de reduzir a carga parasitária de *L. amazonensis* na orelha e linfonodo dos animais BALB/c (Figura 18A e 18B). Isso pode ser explicado devido a uma reação inflamatória local que ocorre na leishmaniose tegumentar, com atuação de células de defesa do sistema imune contra a infecção e inflamação, levando a uma diminuição da lesão.

No trabalho de Nakayama et al. (2009) os animais tratados com o derivado SAAS-59 administrado por via oral e intralesão não foram capazes de controlar a carga parasitária de *L. amazonensis*. Quando administrado por via subcutânea

houve redução da carga parasitária do animal, indicando que diferentes vias de administração podem alterar a atividade de substâncias.

Figura 20. Efeito leishmanicida em BALB/c dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a carga parasitária em orelhas (A) e linfonodos (B).

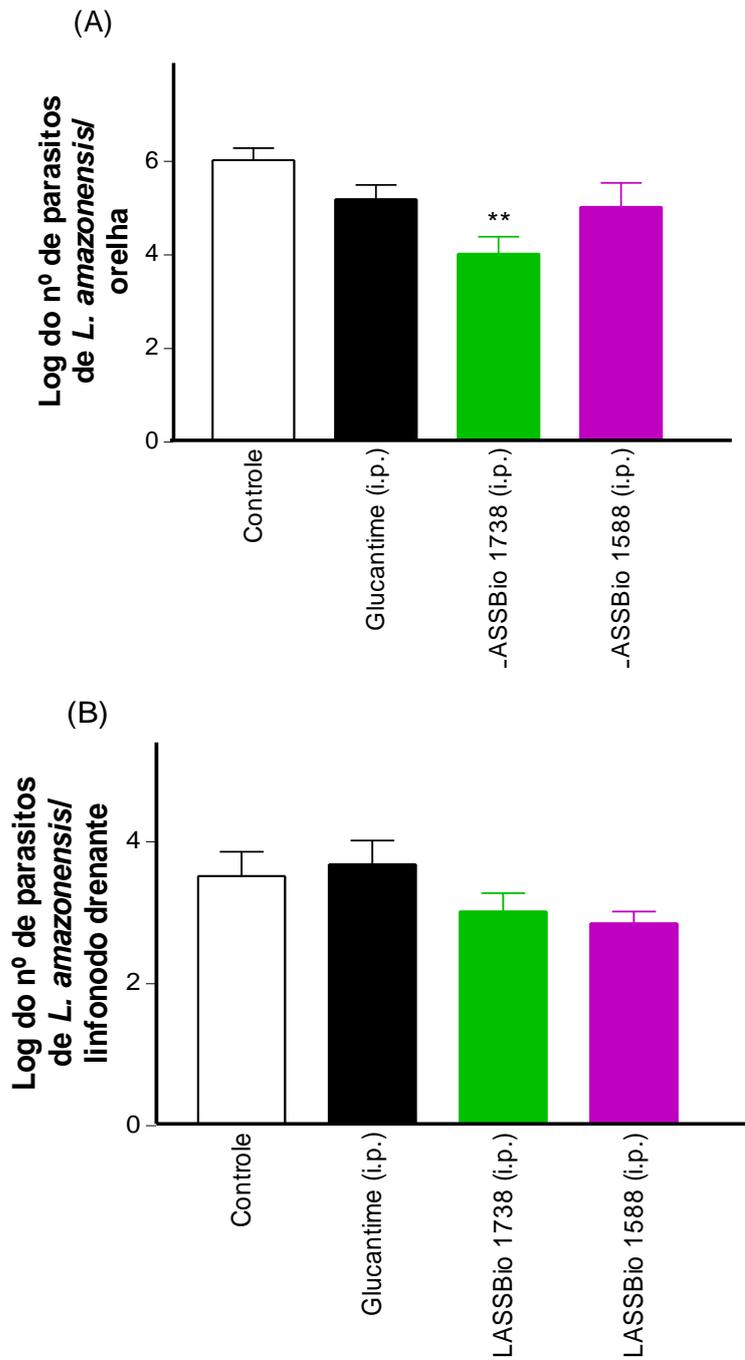


Figura 21. Fotografias das orelhas infectadas e tratadas no 28º dia pós-infecção.



Controle infectado



Controle não infectado



Glucantime



LASSBio 1588

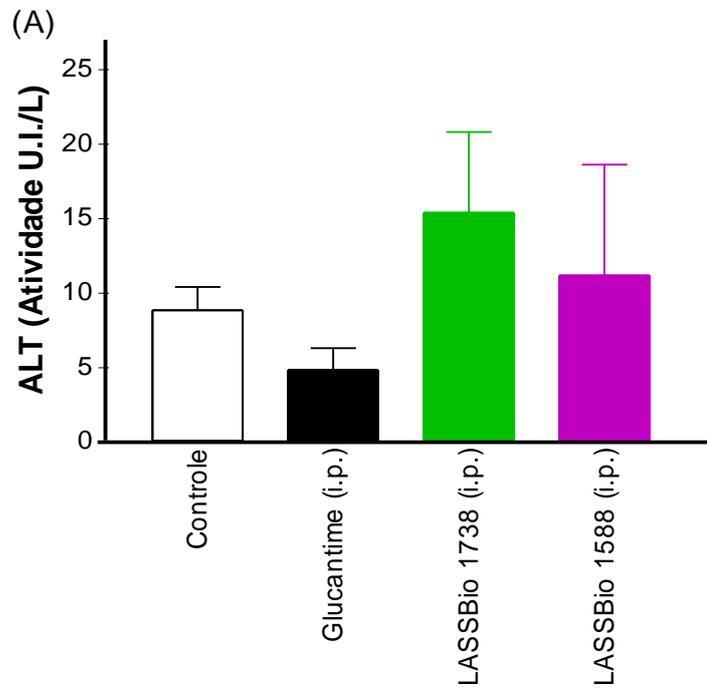


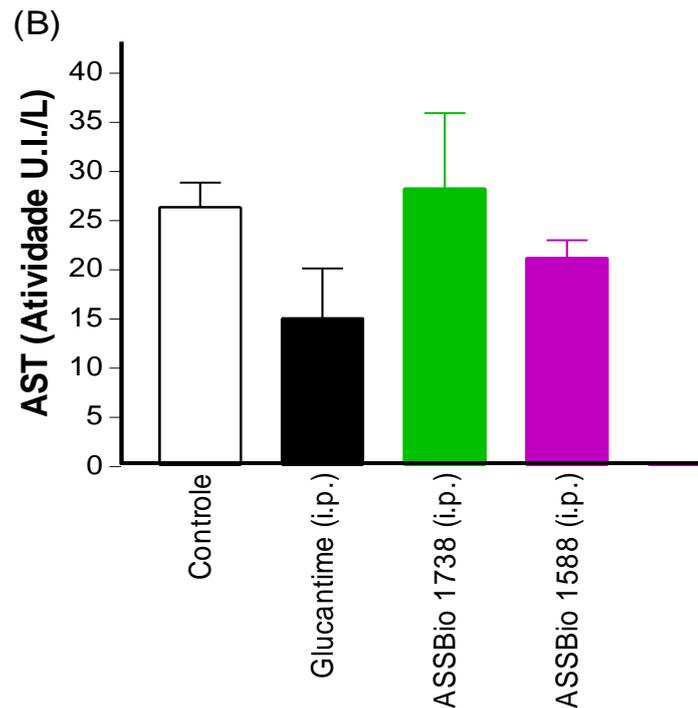
LASSBio 1738

As enzimas desidrogenases transferases podem ser encontrados em quantidades no soro, mas não são de origem do fluido extracelular. Ao serem encontradas em quantidades elevadas no fluido extracelular, ocorrem como resultado de danos no tecido ou célula, rompendo membranas que levam ao vazamento de tais enzimas a partir do tecido, assim tornam-se elevadas no soro (MORRONE et al., 2009). Portanto, medição da enzima sérica é uma ferramenta valiosa no diagnóstico clínico, pois fornece informações sobre o efeito e natureza dos danos patológicos nos tecidos. Como alanina transaminase (ALT) é uma enzima específica do fígado, ao ser encontrada em quantidades elevadas pode-se sugerir uma doença hepatobiliar. No entanto, o aumento de aspartato transaminase (AST), também pode estar relacionado a danos no coração ou no músculo esquelético, bem como no parênquima hepático. Conseqüentemente, atividade elevada de ALT e AST, pode ser um indicativo de doença hepática causada pelo tratamento (WANG et al., 2012).

No ensaio de infecção *in vivo* com *L. amazonensis* foi observado que os derivados LASSBio 1588 e LASSBio 1738 não aumentaram as enzimas hepáticas ALT e AST (Figura 22 A e B). Como essas enzimas são utilizadas como biomarcadores de lesão hepática, podendo ser causadas por alterações no metabolismo do fígado causada pelo tratamento (UBOH et al., 2005), níveis normais destas, nos leva a sugerir que o tratamento não causou danos ao fígado durante o período avaliado.

Figura 22. Efeito do tratamento dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a atividade das enzimas hepáticas ALT (A) e AST (B).

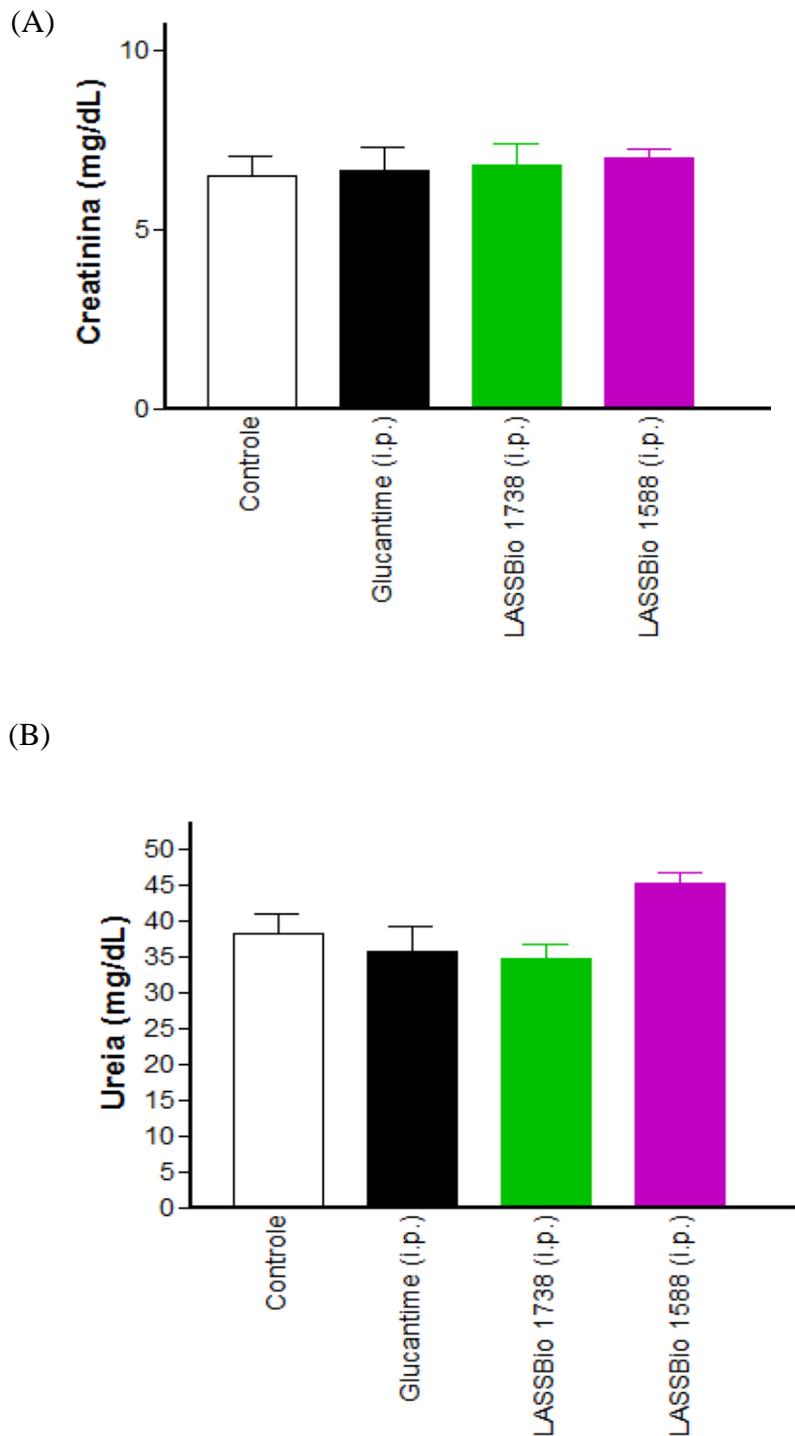




Efeito *in vivo* do tratamento sobre os níveis de ALT e AST no soro de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle.

A lesão renal aguda, também conhecida como insuficiência renal aguda, é uma síndrome caracterizada pela rápida perda da função excretora do rim e é tipicamente diagnosticada pela acumulação de produtos finais do metabolismo do nitrogênio, como ureia e creatinina (BELLOMO; KELLUM; RONCO, 2012). Através do ensaio de infecção *in vivo* foi possível determinar os níveis de creatinina e ureia nos grupos tratados e infectados, nestes não houve alteração estatisticamente significativa (Figura 23 A e B), levando-nos a sugerir que o tratamento não causou danos renais.

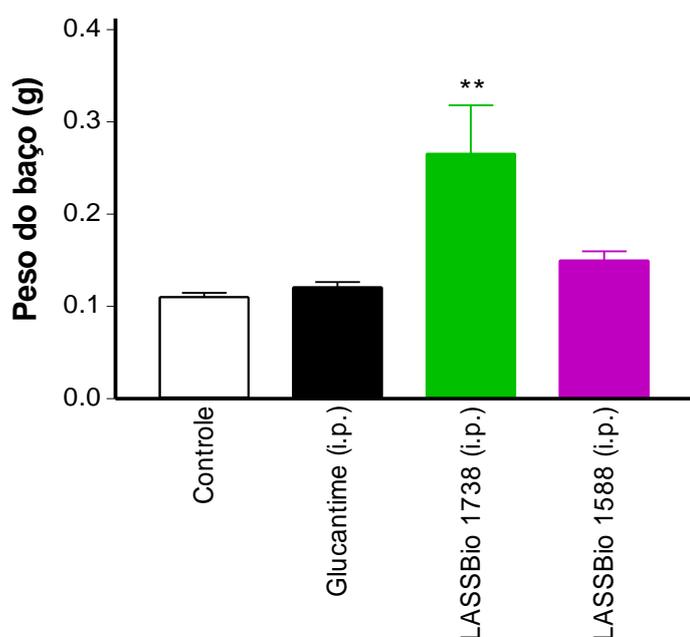
Figura 23. Efeito do tratamento dos derivados LASSBio 1588, LASSBio 1738 e glucantime sobre a atividade de creatinina (A) e ureia (B).



Efeito *in vivo* do tratamento dos derivados sobre os níveis de creatinina e ureia no soro de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle.

Ainda no ensaio *in vivo*, foi analisado o peso do baço dos grupos. O grupo tratado com o derivado LASSBio 1738 induziu aumento do baço de forma estatisticamente significativa (Figura 24). A hipertrofia do baço pode ser devido a um aumento da função imune, que pode ser causada por uma possível função imunoestimulatória do derivado LASSBio 1738, como também inchaço e inflamação com possível edema devido a toxicidade. Em relação ao peso dos animais, não houve alteração estatisticamente significativa entre os grupos (dados não mostrados).

Figura 24. Efeito do tratamento sobre o peso do baço dos animais tratados.



Efeito *in vivo* do tratamento sobre o peso do baço de animais infectados com *L. amazonensis* na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias, vo. Os resultados referem-se à média \pm erro padrão da média de cinco animais de um experimento representativo. Os valores foram considerados significativos quando $*p < 0,05$ versus o grupo controle.

Os derivados da CA-4 não apresentaram toxicidade para os macrófagos na concentração de 0,01 μM . Este dado é promissor, tendo em vista que os derivados foram ativos para formas promastigotas de *Leishmania* até a concentração de nanomolar. Além disso, os derivados apresentam seletividade para cada espécie estudada, sendo para *L. braziliensis*, os derivados LASSBio 1592, 1714, 1735, 1738,

1739, 1740, 1741, 1742 e 1744, para *L. amazonensis*, os derivados LASSBio 1589 e LASSBio 1738 e para *L. chagasi* os derivados LASSBio 1586, 1587, 1588, 1590, 1591 e 1592. Além disso, ao ser realizado o ensaio de infecção *in vivo* com formas promastigotas de *L. amazonensis* na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias (i.p.), foram selecionados dois derivados o LASSBio 1588 e LASSBio 1738, estes possuíram efeito sobre o curso da infecção da orelha e não alteraram enzimas hepáticas, creatinina e ureia. O grupo tratado com o LASSBio 1738, apresentou aumento do tamanho do baço, podendo ser um indicativo de substância imunoestimulatória ou de toxicidade.

6 CONCLUSÕES

No estudo da atividade leishmanicida de derivados da Combretastatina A-4, pode-se concluir que:

- Os derivados da CA-4 não foram tóxicos na concentração de 0,01 μM ;
- Os derivados LASSBio 1592, 1714, 1735, 1738, 1739, 1740, 1741, 1742 e 1744 apresentam elevada atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. braziliensis*;
- Os derivados LASSBio 1589 e LASSBio 1738 apresentam atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. amazonensis*;
- Os derivados LASSBio 1586, 1587, 1588, 1590, 1591 e 1592 apresentam elevada atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. chagasi*;
- Os derivados LASSBio 1588 e LASSBio 1738 possuem efeito sobre o curso da infecção da orelha *in vivo* com *L. amazonensis* na dose de 30 $\mu\text{mol/kg/dia}$ x 28 dias (i.p.), sem alterar enzimas hepáticas, creatinina e ureia. Porém, o derivado LASSBio 1738 alterou o tamanho do baço de forma estatisticamente significativa, podendo ser um indicativo de substância imunoestimulatória ou de toxicidade.

REFERÊNCIAS

ADLER-MOORE, J.; PROFFIT, R. T. AmBisome: liposomal formulation, structure, mechanism of action and pre-clinical experience. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 21-30, 2002.

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DEN BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos one**, V. 7, p. 1-12, 2012.

AMATO, V.; S.; NICODEMO, A. C.; AMATO, J. G.; BOULOS, M.; NETO, V. A. Mucocutaneous leishmaniasis associated with HIV infection treated successfully with liposomal amphotericin B (AmBisome). **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 341-342, 2000.

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

ANDRADE, B. B.; OLIVEIRA, C. L.; BRODSKYN, C. L.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2-3, p. 122-127, 2007.

ARTHUR, G.; BITTMAN R. The inhibition of cell signaling pathways by antitumor ether-lipids. **Biochemica et Biophysica Acta**, v. 1390, p. 85-102, 1998.

ASHUTOS, H.; SUNDAR S.; GOYAL, N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. **Journal Medical Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 143-53, 2007.

ÁVILA, J.L.; ÁVILA, A.; POLEGRE, M. A.; MÁRQUEZ, V.E. Specific inhibitory effect of 3-deazaneplanocin A against several *Leishmania Mexicana* and *L. braziliensis* strains. **Journal Tropical Medicine Hygiene**, V. 57, p. 407-412, 1997.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania infection*. **Indian Journal Medical Research**, v. 110, p. 238-258, 2004.

BELLOMO, R.; KELLUM, J. A.; RONCO, C. Acute kidney injury. **Lancet**, v. 380, p. 756-766, 2012.

BENÍTEZ, J.; QUEIROZ, A. C.; CORREIA, I.; ALVES, M. A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; BARREIRO, E. J.; LIMA, L. M.; VARELA, J.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; MORENO, V.; PESSOA, J. C.; GAMBINO, D. New oxidovanadium(IV) N-acylhydrazone complexes: Promising antileishmanial and antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 20-27, 2013.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infections Diseases**, v. 24, p. 684-703, 1997.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, p. 313, 2008.

BLENDLE, J. J.; OUTLAW, A.; KUMAR, A.; BOYKIN, D. W.; PATRICK, D. A.; TIDWELL, R. R.; WERBOVETZ, K. A. Antileishmanial activities of several classes of aromatic dication. **Antimicrobial agents chemotherapy**, v. 46, p. 797-807, 2002.

CAMACHO, M. D. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; SOLIS, P. N.; MARSHALL, S. J.; GHAZANFAR, S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. **Journal Ethnopharmacology**, v. 89, p. 185-191, 2003.

CAPARROS, E.; SERRANO, D.; PUIG-KROGER, A.; RIOL, L.; LASALA, F.; MARTINEZ, I.; VIDAL-VANACLOCHA, F.; DELGADO, R.; RODRIGUEZ-FERNANDEZ, J. L.; RIVAS, L.; CORBI, A. L.; COLMENARES, M. Role of the C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN in *Leishmania* interaction with host phagocytes. **Immunobiology**, v. 210, p. 185-193, 2005.

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

CHAUDHARY, A.; PANDEYA, S. N.; KUMAR, P.; SHARMA, P.; GUPTA, S.; SONI, N.; VERMA, K. K.; BHARDWAJ, G. Combretastatin a-4 analogs as anticancer agents. **Mini-Review in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 1186, 2007.

CLEM, A. A. current perspective on leishmaniasis. **Journal of global infectious diseases**, v. 2, p. 124-126, 2010.

COCCHETTI, P.; MONTANO, G.; LOMBARDO, A.; TRIPODI, F.; ORSINI, F.; PAGLIARIN, R. Synthesis and biological evaluation of combretastatin analogs as

cell cycle inhibitors of the G1 to S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 2780-2784, 2010.

COMBES, S.; BARBIER, P.; DOUILLARD, S.; MCLEER-FLORIN, A.; BOURGAREL-REY, V.; PIERSON, J. T.; FEDOROV, A. Y.; FINET, J. P.; BOUTONNAT, J.; PEYROT, V. Synthesis and biological evaluation of 4-arylcoumarin analogues of combretastatin. Part 2. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.54, p.3153-3162, 2011.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**, v. 375, p. 239–247, 2010.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis in Brazil Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 149-153, 2007.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Tropical Medicine International Health**, v. 6, p. 899–905, 2001.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Review**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CUMMINGS, R.; TURCO, S. Parasitic Infections,. **Cold Spring Harbor**, 2º edição, 2009.

DEL REY, B.; RAMOS, A. C.; CABALLERO, E.; INCHAUSTTI, A.; YALUFF, G.; MEDARDE, M.; ARIAS, A. R.; SAN FELICIANO, A. leishmanicidal activity of combretastatin analogues and heteroanalogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 9 p. 2711-2714, 1999.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Immunology Microbiology Infectious Disease**, v.27, p.305–318, 2004.

DONG, L.; UZONNA, E. J. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, vol. 2, n. 82, 2012.

DORR, R. T.; DVORAKOVA, K.; SNEAD, K.; ALBERTS, D. S.; SALMON, S. E.; PETTIT, G. R. Antitumor activity of combretastatin-A4 phosphate, a natural product tubulin inhibitor, **Invest New Drugs**, v.14, p. 131-137, 1996.

DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T.; RENNISON, D. Potent Antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, p. 1051-1056, 1998.

EDWARDS, M. L.; STEMERICK, D. M.; SUNKARA, P. S. Chalcones: A new class of antimitotic agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v.33, p. 1948-1954, 1990.

ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; MCGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, p. 686-699, 2008.

FONG, D.; LEE, B. Beta tubulin gene of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.31, p. 97-106, 1988

FÜRST, R.; ZUPKÓ, I.; BERÉNYI, A.; ECKER, G. F.; RINNER, U. Synthesis and antitumor-evaluation of cyclopropyl-containing combretastatin analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 6948-6951, 2009.

GALBRAITH, S. M.; MAXWELL, R. J.; LODGE, M. A.; TOZER, G. M.; WILSON, J.; TAYLOR, N. J.; STIRLING, J. J.; SENA, L.; PADHANI, A. R.; RUSTIN, G. J. Combretastatin A4 phosphate has tumor antivasculature activity in rat and man as demonstrated by dynamic magnetic resonance. **Journal of Clinical Oncology**, v.21, p. 2831-2842, 2003.

GIGLEY, J. P.; BHADRA, M.; MORETTO, M. M.; KHAN, I. A. T cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, V. 28, n. 9, 2012.

GONTIJO B.; CARVALHO M. L. R. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 71-80, 2003.

GONZALEZ, U.; PINART, M.; RENGIFO-PARDO, M.; MACAYA, A.; ALVAR, J.; TWEED, J. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). **Cochrane Database System Review**, p.9-31, 2009.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.8, p.419-433, 2010.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 363-370, 2000.

HOLZMULLER, P.; BRAS-GONÇALVES, R.; LEMESRE, J. R. Phenotypical characteristics, biochemical pathways, molecular targets and putative role of nitric oxidemediated programmed cell death in Leishmania. **Parasitology**, v. 132, p. 19-32, 2006.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; OTTESEN, E.; EHRLICH SACHS, S.; SACHS, J. D. Incorporating a Rapid-Impact Package for Neglected Tropical Diseases with Programs for HIV/AIDS, Tuberculosis, and Malaria. **PLoS Medicine**, v. 3, p. 102, 2006.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Review Microbiology**, v. 9, p.604–615, 2011.

KANTHOU, C.; TOZER, M.T. Microtubule depolymerizing vascular disrupting agents: novel therapeutic agents for oncology and other pathologies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, p. 284-294, 2009.

LIPOLDOVÁ, M.; SVOBODOVÁ, M.; HAVELKOVÁ, M.; KRULOVÁ, H.; BADALOVÁ, J.; NOHYNKOVÁ, E.; HART, A. A.; SCHLEGEL, D.; VOLF, P.; DEMANT, P. Mouse genetic model for clinical and immunological heterogeneity leishmaniasis. **Immunogenetics**, V.54, n. 3, p. 174-183, 2002.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Molecular Biochemistry. Parasitology**, v. 111, p. 1-8, 2000.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. AIDS 2009: versão preliminar. **Boletim Epidemiológico: AIDS/DST**, v. 6, p. 3-63, 2009. Disponível em <http://www.aids.gov.br/sites/default/files/publicacao/2009>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica **Boletim Epidemiológico**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manu_leishman.pdf, 2010.

MIKE THOMPSON, Combretastatina A4, C₁₈H₂₀O₅. Disponível em qnint.sbq.org.br, acesso em: 02 de julho de 2013.

MORRONE, F. B.; SPILLER, F.; EDELWEISS, M. I. A.; MEURER, L.; ENGROFF, P.; BARRIOS, C. H, et al. Effect of temozolomide treatment on the adenine nucleotide hydrolysis in blood serum of rats with implanted gliomas. **Applied Cancer Research**, p. 118-124, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MURRAY, H. W.; MONTELIBANO, C.; PETERSON, R.; SYPEK, J. P. Interleukin-12 regulates the response to chemotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 1497-1502, 2000.

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

MURBACK, N. D. N.; HANS-FILHO, G.; NASCIMENTO, R. A. F.; NAKAZATO, K. R. O.; DORVAL, M. E. M. C. Leishmaniose Tegumentar Americana: estudo clínico, epidemiológico e laboratorial realizado no Hospital Universitário de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Anal Brasileiro de Dermatologia**, V. 86, p. 55-63, 2011.

NAKAYAMA, H.; CABALLERO, E.; MALDONADO, M.; TORRES, S.; SERNA, E.; SANABRIA, L.; MEDARDE, M.; FERREIRA, M. E.; ARIAS A. R.; SAN FELICIANO, A. *In vivo* antileishmanial efficacy of combretastatin heteroanalogues. **Revista Latino Americana de Química**, v. 37, p. 53-64, 2009.

NAM, N. Combretastatin A4 analogues as antimetabolic antitumor agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p.1697-1722, 2003.

NWAKA, S.; RIDLEY, R.G. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public–private partnerships. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 11, p. 919 - 928, 2003.

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

PASSOS, V. M. A.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI, A. C.; GONTIJO, C. M. F.; FALCÃO, A. L.; LIMA-COSTA, M. F. F. Leishmaniose tegumentar na região metropolitana de Belo Horizonte: aspectos clínicos, laboratoriais, terapêuticos e evolutivos (1989-1995). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 5-12, 2001.

PEREIRA, J. C. M.; CAREGARO, V.; COSTA, D. L.; SANTANA DA SILVA, J.; CUNHA, F. Q.; FRANCO, D. W. Antileishmanial activity of ruthenium(II)tetraammine nitrosyl complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 4180-4187, 2010.

PETERS, N. C.; SACKS, D. L. The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. **Cellular Microbiology**, v. 11, p. 1290–1296, 2009.

PONTE-SUCRE, A.; VICIK, R.; SCHULTHEIS, M.; SCHIRMEISTER, T.; MOLL, H. Aziridine- 2,3-Dicarboxylates, Peptidomimetic Cysteine Protease Inhibitors with Antileishmanial Activity. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2439–2447, 2006.

WANG, Y.; HAN, J.; XIONG, W.; YUAN, Q.; GU, Y.; LI, J.; ZHU, Z.; ZHANG, H.; WANG, C. Activities of sodium aescinate injection liquid. **Molecules**, v. 17, p. 10267-10275, 2012.

WHO. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em 11 de novembro de 2012.

WHO, World Health Organisation: Control of Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en>. Acesso em 16 de dezembro de 2007.

WOELBING, F.; KOSTKA, S. L.; MOELLE, K.; BELKAID, Y.; SUNDERKOETTER, C.; VERBEEK, S.; WAISMAN, A.; NIGG, A. P.; KNOP, J.; UDEY, M. C.; VON, S. E. Uptake of *Leishmania major* by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **Journal Experimental of Medicine**, v. 203, p. 177-188, 2006.

RAVIS, W. R.; LLANOS-CUENTAS, A.; SOSA, N.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; KOPYDLOWSKI, K. M.; NIELSEN, C.; SMITH, K. S.; SMITH, P. L.; RANSOM, J. H.; LIN, Y. J.; GROGL, M. Pharmacokinetics and Absorption of Paromomycin and Gentamicin from Topical Creams Used to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 1, p. 1-19, 2013.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C, Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose; estado da arte. **Química nova**, v. 26, p. 550-555, 2003.

RAVICHANDRAN, K., S.; LORENZ, U. "Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal." **Nature Reviews Immunology**, vol. 7, n. 12, p. 964–974, 2007.

RIBEIRO-GOMES, F. L.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; DIAS, W. B.; LOPES, M. F.; NUNES, M. P.; LUNGARELLA, G.; DOS REIS, G.A. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. **Journal Immunology**, v. 179, p. 3988–3994, 2007.

ROBERTS, M. T. M. Current Understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **British Medical Bulletin**, v. 75/76, p. 115-130, 2006.

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

SENGUPTA, P. C. History of kala-azar in India. **Indian Medical Gazette**, v. 82, p. 281–286, 1947.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Tabulação de dados. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acesso em Janeiro de 2013.

SOLBACH, W.; LASKAY, T. The host response to *leishmania infection*. **Advances in immunology**, v. 74, p. 275-317, 2000.

SUNDAR, M. D. S.; JHA, M. D.; THAKUR, M. D. C. P.; SINHA, M. D. P. K. Injectable Paromomycin for Visceral Leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, V. 356, P. 2571-2481, 2007.

SINGH, N.; GAUTUM, S.; KUMAR, R.; NYLEN, S.; SACKS, D.; SUNDAR, S. IFN Neutralization promotes parasite growth in visceral leishmaniasis patients.

Worldleish5, Fifth World Congress on Leishmaniasis, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil, Maio de 2013.

SOSA, N.; CAPITÁN, Z.; NIETO, J.; NIETO, M.; CALZADA, J.; PAZ, H.; SPADAFORA, C.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; KOPYDLOWSKI, K.; ULLMAN,

D.; MCCARTHY, W. F.; RANSOM, J.; BERMAN, J.; SCOTT, C.; GROGL, M. Randomized, Double-Blinded, Phase 2 Trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama. **American Journal of Tropical hygiene**, 2013.

TARABOLETTI, G.; GIAVAZZI, R. Modelling approaches for angiogenesis. **European Journal of Cancer**, v. 40, p.881-889, 2004.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the separation, characterization and quantification of biologically active particles and their clonal progeny. in: T.C. Pretlow, T.P. Pretlow (Eds.), Cell Separation: Methods and Selected Applications. **Academic Press**, p. 109-145, 1986.

TEIXEIRA, D.; E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, F. L.; SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclos de vida da Leishmania**, 1ª edição, V. 2013.

TOLOMEO, M.; ROBERTI, M.; SCAPOZZA, L.; TARANTELLI, C.; GIACOMINI, E.; TITONE, E.; SAPORITO, L.; DI CARLO, P.; COLOMBA, C. TTAS a new stilbene derivative that induces apoptosis in *Leishmania infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 37-43, 2013.

TRON, G. C.; PIRALI, T.; SORBA, G.; PAGLIAI, F.; BUSACCA, S.; GENAZZANI, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3033-3044, 2006.

UBOH, F. E.; AKPANABIATU, M. I.; EYONG, E. U.; EBONG, P. E.; EKA, O. O. Evaluation of toxicological implications of inhalation exposure to kerosene fumes and petrol fumes in rats. **Acta Biologica Szegediensis**, p. 19-22, 2005.

VERMA, G. K.; VERMA, S.; SHANKER, V.; SINGH, G.; TEGTA G. R. A rare case of diffuse cutaneous leishmaniasis in an immunocompetent patient from Sub Himalayan India. **Tropical Doctor**, 2012.

ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto pelo Comitê de Ética - UFAL



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Maceió – AL, 02/09/2011

Senhor (a) Pesquisador (a), Magna Suzana Alexandre Moreira
Morgana Vital de Araújo

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), em 12/08/2010 e com base no parecer emitido pelo (a) relator (a) do processo nº 003570/2011-63 sob o título **Estudo da atividade leishmanicida de uma série de derivados da cambretastatina A4: Uma proposta para novas estratégias no tratamento da leishmaniose**, vem por meio deste instrumento comunicar a aprovação do processo supra citado, com base no item VIII.13, b, da Resolução nº 196/96.

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 196/96, item V.4).

É papel do(a) pesquisador(a) assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e sua justificativa. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o(a) pesquisador(a) ou patrocinador(a) deve enviá-los à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem incluídas ao protocolo inicial (Res. 251/97, item IV. 2.e).

Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos no Cronograma do Protocolo e na Res. CNS, 196/96.

Na eventualidade de esclarecimentos adicionais, este Comitê coloca-se a disposição dos interessados para o acompanhamento da pesquisa em seus dilemas éticos e exigências contidas nas Resoluções supra - referidas.

Esta aprovação não é válida para subprojetos oriundos do protocolo de pesquisa acima referido.

(*) Áreas temáticas especiais

Válido até: Abril de 2013

