

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



200207021

Sandra Cristina Barão

" EFEITO DO IMUNOESTIMULADOR 8BROMOGUANOSINA NO TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE MURINA "

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) SANDRA CRISTINA BARÃO e aprovada pela Comissão Julgadora.

Selma Giorgio

UNICAMP BIBLIOTECA CENTRAL SEÇÃO CIRCULANTE

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Orientadora: Profa. Dra. Selma Giorgio

Campinas / 2001

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	B 231e
V.	
T.	47708
PROC.	837102
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$11,00
DAT.	08-02-02
N.º CPU	

CM00162941-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

B231e **Barão, Sandra Cristina**
Efeito do imunoestimulador 8bromoguanosina no tratamento da leishmaniose murina/Sandra Cristina Barão . -- Campinas, SP:[s.n.], 2001

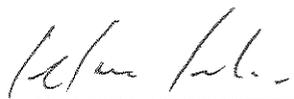
Orientadora: Selma Giorgio
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.

1. Leishmaniose. 2. Macrófago. 3. Imunoterapia. I. Giorgio, Selma. II. Universidade Estadual de Campina. Instituto de Biologia. III. Título.

Data da Defesa: 30/11/2001

Banca Examinadora

Profa. Dra. Selma Giorgio (Orientadora):



Profa. Dra. Clara Lúcia Barbieri Mestriner:

Clara Lúcia Barbieri Mestriner

Profa. Dra. Urara Kawazoe:



Prof. Dr. Sérgio Albuquerque:

Profa. Dra. Carolina Guilherme Prestes Beyrodt:

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo:

ÍNDICE

FOLHA DE ROSTO	i
FICHA CATALOGRÁFICA	ii
BANCA EXAMINADORA	iii
ÍNDICE	iv
AGRADECIMENTOS	v
DEDICATÓRIA	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SÍMBOLOS	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	01
OBJETIVOS	32
MATERIAIS E MÉTODOS	33
RESULTADOS	42
INVESTIGAÇÃO <i>IN VITRO</i>	42
INVESTIGAÇÃO <i>IN VIVO</i>	49
INVESTIGAÇÃO HISTOLÓGICA DE 8BRGUO EM CAMUNDONGOS	68
INVESTIGAÇÃO ENZIMÁTICA E HEMOTOLÓGICA	72
DISCUSSÃO	75
CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Selma Giorgio por conferir-me a oportunidade do aprendizado científico e pela confiança em mim depositada.

À Professora Doutora Maria Sílvia Viccari Gatti pelo apoio amigo.

Ao Professor Doutor Áureo Yamada pela contribuição prestada na análise histológica, cujo passo favoreceu importante conclusão contida neste trabalho.

À Professora Doutora Ohara Augusto pela disponibilidade de seu espaço de trabalho, assim como, apoio material e intelectual.

À Edilaine Linares pela parceria técnica e pela divisão de valores inestimáveis.

Ao Dr. Sidney Arcifa, do Laboratório Clínico Prevlab, pelo auxílio e orientação quanto a análise de materiais durante a fase final dos experimentos.

Ao amigo Luiz Francisco da Silveira pela contribuição incondicional que proporcionou avanços importantes no decorrer da pesquisa.

Ao Benilton de Sá Carvalho pela brilhante consultoria sobre os dados estatísticos.

Àqueles que, no anonimato, prestaram importante auxílio sem os quais tornar-se-ia inviável a realização deste trabalho.

À FAPESP pela concessão do auxílio pecuniário ao desenvolvimento desta pesquisa.

DEDICATÓRIA

DEDICO AS HONRAS DA MINHA VITÓRIA A TODOS QUE PARTILHARAM
COMIGO ESTA CAMINHADA: LÚCIA, LEAL, VICÊNCIA, FAUSTO, GIORDANO
E TONINHA.

"DETERMINE QUE ALGO PODE E DEVE SER FEITO;
ENTÃO VOCÊ ACHARÁ O CAMINHO PARA FAZÊ-LO"

ABRAHAM LINCOLN

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF	adjuvante completo de Freund
Ag	antígeno
CD ₄ ⁺	linfócito tipo CD ₄ ⁺
CD ₈ ⁺	linfócito tipo CD ₈ ⁺
ConA	concanavalina A
Guo	guanosina
8BrGuo	8-bromo-guanosina
8MeGuo	8-mercaptop-guanosina
HCl	ácido clorídrico
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina
IF	índice fagocítico
IFN	interferon
Ig	imunoglobulina
IL	interleucina
LPS	lipopolissacarídeo de origem bacteriana
Mφ	macrófago
NaOH	hidróxido de sódio
NK	célula "natural killer"
SFB	soro fetal bovino
TGF	"transforming growth factor" (fator de crescimento e diferenciação)
Th1	linfócito tipo "helper" 1
Th2	linfócito tipo "helper" 2
TNF	fator de necrose tumoral

RESUMO

A capacidade imunoestimulatória dos ribonucleosídeos sintéticos com substituições nas posições 7 e/ou 8 foi comprovada em experimentos *in vitro* e tratamentos experimentais. Diante da evidência de que os parasitas do gênero *Leishmania* infectam macrófagos, possuindo um complexo mecanismo de escape e, não raro, os tratamentos convencionais são ineficientes, o objetivo deste trabalho foi testar a possibilidade da utilização do ribonucleosídeo 8-Bromo-Guanosina (8BrGuo) no tratamento da leishmaniose utilizando o modelo murino. Testes *in vitro* comprovaram que este composto ativa macrófagos murinos infectados com formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, diminuindo a infecção em cerca de 70%. Também foram realizados experimentos *in vitro* com o objetivo de avaliar o mecanismo de ação deste composto na ativação de macrófagos e destruição dos parasitas. Foi analisada a produção de nitrito, um subproduto do óxido nítrico, composto com capacidade oxidativa e tóxica a microrganismos. Para os testes *in vivo*, com camundongos de linhagem isogênica CBA/J, utilizamos diferentes vias de inoculação e apresentação de 8BrGuo, sendo que o processo mais eficiente e menos agressivo foi o intraperitoneal e a melhor resposta foi em solução utilizando Tween 80[®] como adjuvante. Paralelamente, investigamos as dosagens de 8BrGuo, sendo que algumas mostraram resultados estatisticamente significativos relacionados à diminuição da infecção. Observamos que o composto mostrou toxicidade nas doses mais elevadas. Mas análises histológicas mostraram que o composto 8BrGuo não provocou alterações teciduais hepáticas e renais 24 horas após o tratamento, nem após 60 dias. Testes bioquímicos de enzimas

sangüíneas (transaminase glutâmico pirúvica e transaminase glutâmico oxaloacética), creatinina e hemograma completo mostraram-se normais quando comparados a animais controles. Podemos afirmar, inicialmente, que existe a possibilidade de tratamento da leishmaniose com a 8BrGuo. Contudo ainda há necessidade de maiores avaliações deste composto quanto aos comportamentos farmacocinéticos e farmacodinâmico.

ABSTRACT

Immunostimulatory ability of nucleosides substituted in either C8 or C8 and N7 positions has been tested in experimental *in vitro* treatments. Species belonging to the *Leishmania* genus parasitize macrophages displaying complex immune mechanism of escape, and treatments of leishmaniasis is often inefficient. The aim of this project was to test the 8BromoGuanosine (8BrGuo) in the treatment of cutaneous leishmaniasis in a murine model. The first tests confirmed that 8BrGuo activated murine macrophages infected with *Leishmania (L.) amazonensis* amastigotes *in vitro* leading to 70% of infection reduction. In order to study the action mechanism of 8BrGuo in the parasite destruction inside the macrophages, another *in vitro* experiments were carried out, such as the production of nitrite, a subproduct of nitric oxide, a powerful oxidative and toxic compound for microorganisms. These results encourage us to continue the investigations with 8BrGuo and isogenic mice CBA/J were for *in vivo* tests. Different administration routes of 8BrGuo were evaluated and the intraperitoneal route showed to be the most efficient and less aggressive to the animals tested. Treatment with 8BrGuo and Tween® as an adjuvant led to statistically significant decrease of *L. (L.) amazonensis* lesions. Although the drug presented animal toxicity at high doses, at concentrations of 8BrGuo used in the present work it was not observed tissue damages in liver and kidney from treated CBA/J mice. Our results suggest that 8BrGuo induced a therapeutic effect during the leishmaniasis infection in murine model. Future studies concerning time assimilation, half time, elimination, and degradation of 8BrGuo will provide additional clues for the function and potential use of this compound as a therapeutic agent against leishmaniasis.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma moléstia parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) há 350 milhões de indivíduos expostos ao risco de infecção, sendo que existem cerca de 12 milhões de pessoas infectadas e surgem anualmente mais 2 milhões de novos casos (WHO, 1996). No Brasil são notificados mais de 20 mil novos casos por ano (CVE, 1995). Embora esses números sejam subestimados, a OMS considera a doença entre as 6 parasitoses de maior importância mundial (Berman, 1987; WHO, 1985).

Atualmente as pesquisas sobre o parasita tem aumentado. É possível que isso se deva à inclusão da leishmaniose na lista de doenças oportunistas em indivíduos com imunodeficiência adquirida, bem como ao aumento da incidência dessa parasitose em diversos países (Berman, 1997).

Típica de regiões de clima tropical e subtropical, a *Leishmania* sp. é encontrada na Europa, Ásia, África e Américas (Laison & Shaw, 1992). Pertence taxonomicamente ao reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, sub-ordem Trypanosomatina e família Trypanosomatidae, cujos gêneros são todos parasitas.

Apesar do consenso quanto a origem monofilética, a classificação e a identificação das espécies do gênero *Leishmania* são complexas (Kerr, 2000), sendo baseadas em características intrínsecas como morfologia, aspectos bioquímicos e análise de DNA e, extrínsecas como aparência clínica das lesões e distribuição geográfica (Shaw, 1994; Ashford, 1997; Stevens & Gilson, 1999).

O gênero *Leishmania* compreende 27 espécies, que podem ser organizadas em dois grandes grupos: do Velho e do Novo Mundo; ou ainda em dois sub-gêneros: *Viannia* Laison & Shaw, 1987 e *Leishmania* Safjanova, 1982, classificações estas que não são reciprocamente excludentes. Assim o subgênero *Leishmania* é encontrado tanto no Velho quanto no Novo Mundo, porém o subgênero *Viannia* aparece apenas no Novo Mundo (Laison & Shaw, 1992). A distribuição entre o Velho e Novo Mundo considera apenas a localização geográfica onde são encontrados os parasitas, uma característica extrínseca. Enquanto a classificação por subgêneros avalia a posição do promastigota no tubo digestivo do vetor. Os promastigotas do subgênero *Viannia* são encontrados no intestino posterior do flebotomíneo, migrando para a parte anterior na fase de metaciclogênese; enquanto os promastigotas do subgênero *Leishmania* residem exclusivamente na região do intestino anterior (Laison & Shaw, 1992).

Além desta classificação, também foi criada a idéia de complexos, por Laison e Shaw em 1972, sugestão bem aceita mesmo não sendo uma unidade taxonômica (*apud* Shaw, 1994). Diante destas observações, o Brasil possui espécies pertencentes aos complexos *Leishmania mexicana*, *Leishmania guyanensis* e *Leishmania braziliensis* responsáveis por afecções cutâneas e mucocutâneas e *Leishmania donovani* envolvidas na leishmaniose visceral (WHO, 1990).

CICLO EVOLUTIVO DA *Leishmania* sp

O ciclo evolutivo da *Leishmania* spp é heteroxênico ou digenético, contudo não há divisão entre hospedeiros definitivos e intermediários uma vez que o parasita

multiplica-se apenas por divisão binária nas duas formas evolutivas apresentadas: amastigota e promastigota.

A forma amastigota apresenta formato arredondado com 2 a 4 μ m e o flagelo reduzido restrito a bolsa flagelar que mantém-se fechada, sendo parasita de células do sistema mononuclear fagocitário, principalmente macrófagos (Rey, 1991; WHO, 1990).

Por outro lado, a forma promastigota é encontrada no tubo digestivo de fêmeas de dípteros flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae: *Phlebotomus* spp., *Lutzomya* spp. e *Psychodopygus* spp.) (Lainson & Shaw, 1992). Existem cerca de 32 espécies desses dípteros com capacidade de transmissão do parasita (WHO, 1990). O flebotomíneo contamina-se durante o repasto sangüíneo ao ingerir, junto com o sangue, macrófagos repletos de formas amastigotas. No tubo digestivo do flebotomíneo forma-se uma membrana peritrófica, onde os amastigotas diferenciam-se em promastigotas e após 2 dias a membrana se rompe. Em seguida, os promastigotas aderem-se à parede do intestino, multiplicam-se e, durante os próximos 7 dias cessam a divisão e diferenciam-se em formas metacíclicas (Sacks & Perkins, 1984). Quanto a fase metacíclica dos promastigotas, Sacks & Perkins (1984) demonstraram que estes são morfologicamente iguais aos promastigotas em fase procíclica, sendo impossível diferenciá-los (Sacks & Perkins, 1984). Os promastigotas metacíclicos migram para a região anterior do aparelho digestivo, entre o esôfago e a faringe, onde permanecem até o próximo repasto sangüíneo (Sacks & Perkins, 1984; Schlein, 1993).

Durante um repasto sangüíneo, o inseto, infectado ou não, rompe a epiderme do mamífero e quando infectado regurgita promastigotas juntamente com sua saliva devido a danos provocados pelos promastigotas na válvula cardíaca (Schlein, 1993). Esta saliva injetada inicialmente, tem função vasodilatadora que facilita a alimentação do

flebotomíneo (Ribeiro *et al*, 1989) e, ainda auxilia no estabelecimento da infecção, pois estimula uma reação irritativa e sinaliza a migração de macrófagos para a área (Ribeiro, 1987 e 1989; Titus & Ribeiro, 1988). Já os promastigotas inoculados são em número reduzido e sensíveis a resposta humoral, sendo que a maioria destes é eliminada pela ação dos componentes do sistema complemento (Puentes *et al*, 1988). Na população inoculada, os promastigotas metacíclicos são mais resistentes que os promastigotas em fase procíclica (Franke *et al*, 1985; Sacks, 1989). Esta diferença é creditada a quantidade de diversos fosfoglicanos, lipofosfoglicanos (LPG) e glicolípídeos expostos na membrana dos promastigotas, os quais modificam sua conformação durante esta transformação (Sacks & Silva, 1987; Sacks, 1989; Sacks, *et al*, 1995). Além dessas moléculas, a glicoproteína de peso molecular de 63 Kd (gp63) (Chang & Chang, 1986; Chang *et al*, 1986) é considerada outra importante molécula protetora contra a ação do sistema complemento. A gp63 atua sobre a cascata do sistema complemento, impedindo a conexão dos componentes a partir do C5 ao C9, pela clivagem da porção C3b e, a conseqüente lise da membrana plasmática do parasita. Pode ocorrer também, a hidrólise da porção C3b gerando C3a e C5a que são quimiotácteis para monócitos jovens e estimulam a migração destas células à região onde os parasitas se encontram (Olafson *et al*, 1990; Handman, 2000a).

As espécies de *Leishmania* não promovem uma entrada do tipo ativa na célula hospedeira como como o *Trypanosoma cruzi* ou o *Toxoplasma gondii*, por exemplo (Mauél, 1996). Assim, com a opsonização dos promastigotas com a porção do complemento iC3b restante e o envolvimento do receptor CR3 e outros receptores de membrana da célula hospedeira como manose-fucose, fibronectina, CR1 e CR4, os

parasitas são fagocitados sem induzirem a ativação dos macrófagos (Mauël, 1996; Solbach & Laskay, 2000).

Com o englobamento do parasita pelo macrófago forma-se um vacúolo que tem sua fusão com os lisossomos postergada pelos promastigotas, por um período de tempo suficiente para que ocorra a transformação dos promastigotas em amastigotas. Após essa diferenciação, o parasita em sua forma amastigota será mais resistente à ação das enzimas como hidrolases, catalepsinas e β -glucoronidase e ao pH de aproximadamente 5,0 que será formado mediante a fusão do vacúolo com os lisossomos, originando o vacúolo parasitóforo (Zilberstein & Shapira, 1994; Veras, 1996; Rabinovich, 1996). E então, as formas amastigotas multiplicam-se dentro dos vacúolos.

Até recentemente, acreditava-se que após a proliferação do parasita, ocorreria o rompimento da membrana celular do macrófago. Assim, os amastigotas alcançariam novamente o meio extracelular e infectariam outros macrófagos próximos. Contudo, atualmente, acredita-se que o parasita induz a fusão da membrana do vacúolo parasitóforo com a membrana celular, deixando o macrófago viável. Esta verificação pressupõe que o parasitismo protela a apoptose do macrófago, o que pode caracterizar a cronicidade da doença (*apud* Bogdan & Röllinghoff, 1999; Bogdan *et al*, 2000; Handman, 2000a).

De qualquer forma, os amastigotas alcançam novas células competentes e são fagocitados. Ao contrário da fagocitose de promastigotas, a fagocitose de amastigotas ainda não está bem descrita. Contudo, alguns autores demonstraram a importância de glicolipídeos (Barbieri *et al*, 1993; Straus *et al*, 1993) e proteoglicanos (Love *et al*, 1993) expostos na membrana dos amastigotas durante a infecção.

Finalmente, o ciclo se completa quando o mamífero infectado é picado por outro flebótomo sadio que, junto ao sangue, ingere macrófagos parasitados durante o repasto sangüíneo.

FORMAS CLÍNICAS DE LEISHMANIOSE

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma da doença de maior prevalência em todo o mundo (WHO, 1985). Esta parasitose pode manifestar diferentes aspectos clínicos e períodos de incubação, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida. A incubação varia de alguns dias a 2 ou 3 meses para o surgimento da lesão inicial no local da picada do flebotomíneo. Esta lesão inicial é geralmente pápulo-vesiculosa com aproximadamente 1 cm de diâmetro, recoberta por uma crosta e após a perda desta camada a pápula formada sofre ulceração e passa a apresentar as características típicas da lesão leishmaniótica: ulceração crônica e indolor, contorno regular e bordas salientes talhadas a pique, com fundo avermelhado e granuloso, recoberto ou não de exsudato seroso ou serosanguinolento (Rey, 1991; CVE, 1995). Simultaneamente ou posteriormente a formação da lesão inicial pode ocorrer disseminação linfática ou hematogênica produzindo metástases cutânea, subcutânea ou mucosa (Neves *et al*, 2000). As diferenças patológicas que caracterizam as várias formas clínicas da doença refletem um balanço entre a multiplicação do parasita e a resposta imunológica do hospedeiro (WHO, 1990). Após a cura sempre ocorre a formação de cicatrizes atróficas, isto é, cicatrizes com depressão e pigmentação alterada (WHO, 1990; Berman, 1998).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é uma forma rara da doença, causada por *L. (L.) aethiopica*, no Velho Mundo, e espécies do complexo mexicana, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis*, no Novo Mundo (WHO, 1990; Becker *et al*, 1999). Estes casos de infecção crônica e progressiva atingem 3% dos indivíduos infectados por estas espécies. Não há diferenças entre as lesões causadas pelas espécies do Velho e as do Novo Mundo. Essas lesões não são ulceradas, formando uma placa, pápula ou verruga que apresentam-se repleta de parasitas subcutâneos que disseminam-se especialmente pelo rosto (WHO, 1990). O tratamento apresenta dificuldades, mostrando-se, a LDC, refratária a medicação convencional com antimoniato (Becker *et al*, 1999). O paciente, mesmo quando alcança alguma melhora, pode manifestar recaídas (Convit *et al*, 1989). Segundo a OMS este quadro afeta 30% dos indivíduos atingidos por este tipo de leishmaniose (WHO, 1992).

Na forma mucocutânea (LMC) há o comprometimento cutâneo e da mucosa naso-faríngea. Isso ocorre provavelmente através da disseminação de amastigotas pela via linfática, aparecendo mesmo após alguns anos da cicatrização da lesão cutânea primária. Este perfil da leishmaniose só ocorre no Novo Mundo e, acredita-se que a única espécie responsável seja a *L. (V.) braziliensis*, que causa seqüelas e estigmas sociais. Entretanto, existem raras descrições deste tipo de comprometimento por *L. (V.) guyanensis* (WHO, 1988). O problema só não é pior porque é de baixa incidência, segundo a OMS mantém-se entre 1% a 2% dos casos de leishmaniose cutânea, podendo alcançar 10% em determinados grupos populacionais (WHO, 1996). Entretanto o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo afirma que este valor chega a 5% dos casos no Brasil (CVE, 1995).

Em casos de leishmaniose visceral (LV) o parasita está presente em macrófagos de órgãos internos como baço, fígado e medula óssea (Herwaldt, 1999; WHO, 1985). Ao contrário da forma cutânea, a LV não tem cura espontânea e, geralmente leva a óbito quando não tratada (WHO, 1985 e 1996). Portanto, é um problema de saúde pública mais difícil que os casos cutâneos (WHO, 1996). Porém, em alguns casos apresenta-se, por muito tempo, assintomático ou subclínico (Berman, 1997), e ainda há indícios de casos com cura espontânea em áreas endêmicas (Berman, 1988; WHO, 1996). Os sintomas mais comuns da LV são febre e emagrecimento, escurecimento da pele e, em um estágio mais avançado percebe-se hepatoesplenomegalia, anemia e hipergamaglobulinemia (Berman, 1988; WHO, 1990). As complicações devido ao estado geral do paciente levam a óbito 15% a 30% dos indivíduos infectados (WHO, 1996; Berman, 1997). Todos os agentes responsáveis por este quadro são parasitas pertencentes ao complexo donovani, no Velho Mundo - *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* e *L. (L.) archibaldi* - e no Novo Mundo, há apenas uma espécie, *L. (L.) chagasi*. Os parasitas deste complexo podem provocar o processo de leishmaniose cutânea pós-calazar, caracterizada por máculas, pápulas ou nódulos múltiplos na pele (WHO, 1990).

ESPÉCIES DE *Leishmania* sp MAIS COMUNS NO BRASIL

Leishmania (L.) amazonensis, a espécie utilizada em nosso estudo, está presente em florestas primárias e secundárias, alagadas e até em reflorestamentos. Porém não é restrita à região amazônica, estendendo-se a outras regiões do Brasil como Maranhão, Bahia, Ceará, Mato Grosso, Minas Gerais e Espírito Santo (WHO,

1992). Até mesmo em regiões mais ao sul do país, como Maringá _ Paraná, já foi confirmado um caso autóctone desta espécie (Silveira *et al*, 1990). Os reservatórios naturais mais importantes são *Proechimys guyanensis* e *Oryzomys capito* e algumas espécies de marsupiais foram encontradas infectadas, porém não apresentavam lesões. No homem a doença é pouco freqüente, sendo considerado hospedeiro acidental. Nestes casos, o vetor é o *Lutzomyia flaviscutellata* (WHO, 1985; CVE, 1995).

A *Leishmania (V.) guyanensis* fica restrita a bacia amazônica _ Pará, Roraima e norte do Mato Grosso _ região de floresta úmida, tendo como reservatórios silvestres principalmente edentados como o tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e preguiça (*Choloepus didactylus*), roedores (*Proechimys guyanensis*) e, finalmente, em áreas desmatadas, os gambás (*Didelphis marsupialis*) (Lainson & Shaw, 1992). Os vetores são *Lutzomyia umbratilis*, que prefere troncos de árvores sendo abundante na região de chuvas e *Lu. whitmani* (Lainson & Shaw, 1992; WHO, 1985).

Também a *L. (V.) braziliensis* é amplamente distribuída por todo país, desde a região amazônica até a região sul em Santa Catarina e Rio Grande do Sul, sendo mais freqüente no norte e nordeste. No Estado de São Paulo tem aumentado o número de casos e cidades atingidas, até mesmo em locais onde anteriormente inexistia (CVE, 1995). Nas regiões endêmicas os vetores desta espécie são diferentes. Assim, *Lu. wellcomei* e principalmente o *Psychodopygus wellcomei*, espécies altamente antropofílicas, são encontradas na região amazônica (Lainson & Shaw, 1992) e *Lu. whitmani* na região cacoeira na Bahia. *Lu. intermedia*, no estado do Rio de Janeiro, é considerado um vetor em potencial, entretanto não está comprovado seu envolvimento na transmissão. A *L. (V.) braziliensis* é encontrada em cães e, também em eqüinos nos estados do Ceará, Rio de Janeiro e Bahia e, em roedores (*Rattus frugivorus* e

Proechimys guyanensis) no Ceará (*Akodon arviculoides*) e Minas Gerais (CVE, 1995; WHO, 1985).

A *L. (L.) chagasi* é encontrada na maioria dos estados brasileiros, com notificação em 20 deles (WHO, 1985). Mas é a região nordeste que apresenta a maior prevalência, acumulando cerca de 70% dos casos de leishmaniose visceral brasileiros, sendo que a maior incidência ocorre em crianças abaixo de 5 anos (WHO, 1985; Laison & Shaw, 1992). Esta espécie é transmitida por *Lutzomia longipalpis*, que possui um hábito peridomiciliar e tem espécies de raposas (*Cerdocyon thous* e *Lycalopex vetulus*) como principais reservatórios naturais, também há descrição de uma espécie de gambá infectado (*Didelphis albiventris*), mas é considerada uma infecção acidental (CVE, 1995; Laison & Shaw, 1994; WHO, 1985). A leishmaniose visceral canina apresenta-se em expansão e, em alguns locais a incidência da infecção atinge mais de 20% dos cães urbanos (WHO, 1985) o que evidencia um fator de preocupação para a saúde pública.

Outras espécies são descritas no Brasil, tais como:

Leishmania (L.) enriettii em porco da Índia (*Cavia porcellus*) no Paraná.

Leishmania (L.) deanei em porco espinho no Piauí.

Leishmania naiffi em tatus (*Dasypus novemcinctus*) no Pará, com dois vetores, *Lu. ayrozai* e *Lu. paraensis* e, com descrição de casos humanos no Amazonas.

Leishmania (V.) lainsoni em pacas (*Agouti paca*), com registro de casos humanos em Tucuruí, no Pará. Acredita-se que o vetor desta espécie seja *Lu. ubiquitalis*, porém nunca foi encontrado um exemplar infectado (Lainson & Shaw, 1992).

Leishmania shawi em preguiças (*Choloepus didactylus* e *Bradypus tridactylus*), macacos (*Cebus apella* e *Chiropotes satanas*) e quatis (*Nasua nasua*) cujo vetor é *Lu. whitmani*. Casos humanos foram descritos no Acre e Pará.

As relações ecológicas de hospedeiros naturais e vetores são particulares para cada uma delas, não sendo objetivo desse trabalho avançar Nesse tipo de abordagem. Convém lembrar que alguns vetores são mais antropofílicos e outros melhor adaptados a ambientes alterados pelo homem.

RESPOSTA IMUNOLÓGICA A *Leishmania*

O sistema imunológico é um sistema difuso, descentralizado, com células circulantes cujo fim é proteger o organismo contra quaisquer materiais estranhos chamados genericamente de antígenos (Ag). Assim sendo, quando o Ag é um vírus os linfócitos do tipo T CD8⁺ detectam a presença destes invasores através da apresentação de epítomos virais pelas moléculas de histocompatibilidade principal da classe I (MHC-I) na membrana das células infectadas. Quando o antígeno é uma bactéria ou outro elemento extracelular, ocorre a endocitose deste, pelos macrófagos que os processam e os apresentam aos linfócitos TCD4⁺. Assim a apresentação do epítomo será por meio de moléculas de histocompatibilidade principal da classe II (MHC-II). Esta resposta ainda pode ser dividida em dois subtipos T "helper" 1 (Th1) e T "helper" 2 (Th2), que se diferenciam pelo tipo de citocinas envolvidas. Os linfócitos responsáveis pela resposta Th1 produzem citocinas como as interleucina-2 (IL-2), IL-12 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), enquanto os linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e o "transforming growth factor- β " (TGF- β) (Abbas *et al*, 1994; Nacy *et al*, 1993; Scott & Farrell, 1998).

No caso da infecção por *Leishmania* spp., um parasita intracelular de macrófagos, a resposta imunológica envolve linfócitos TCD4⁺ e pode direcionar-se tanto para Th1 quanto para Th2, dependendo de inúmeros fatores (Abbas *et al*, 1994; Scott & Farrell, 1998).

No fim da década de 1980 Locksley e colaboradores (1987) verificaram que a resistência e a suscetibilidade de camundongos estavam relacionadas à expansão e proliferação de linfócitos T diferentes, respectivamente Th1 e Th2.

A resistência ao parasita é determinada pela resposta tipo Th1 e envolve a ação de diversas citocinas produzidas por macrófagos. O resultado final da interação dessas citocinas é a ativação dos macrófagos e a morte dos amastigotas intracelulares. Várias citocinas estão envolvidas no processo de resistência ao gênero *Leishmania*.

Por exemplo, Nacy e colaboradores (1993) verificaram que a IL-2 mostrou ser um importante co-fator para a resolução da infecção. Estes pesquisadores observaram que indivíduos com baixos níveis desta citocina têm menor proliferação de linfócitos e baixa ativação dos macrófagos, assim como, macrófagos estimulados com IFN- γ e IL-2 resistem a infecção por mecanismos envolvendo TNF- α (Nacy *et al*, 1993).

Segundo Titus e colaboradores (1989) o TNF- α é uma das citocinas responsáveis pela resistência de camundongos C3H à infecção por *L. (L.) major*, os quais ao receberem anticorpo anti-TNF- α responderam de forma semelhante a camundongos BALB/c, que são extremamente suscetíveis. O TNF- α seria capaz de impedir o desenvolvimento das lesões e a multiplicação do parasita. Mas em BALB/c, infectados com *L. (L.) major*, apenas a administração de TNF- α não ativou macrófagos. A eliminação dos parasitas ocorreu apenas com a administração simultânea de IFN- γ

(Bogdan *et al*, 1990). Em testes realizados com *L. (L.) donovani*, por Tumang e colaboradores (1993), o TNF- α também apresentou dependência da IL-1. Belosevic e colaboradores demonstraram que o fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF) também colabora com a eliminação do parasita (*apud* Nancy *et al*, 1993).

Na resistência a *L. (L.) major*, Green e colaboradores verificaram que é, principalmente, o INF- γ que atua sobre macrófagos peritoneais murinos desencadeando a produção de reativos de oxigênio. O óxido nítrico (NO), o maior responsável pela ação leishmanicida nessas células, é sintetizado por mecanismos dependente da L-arginina e pela enzima óxido nítrico sintase 2 induzida (iNOS2). Os intermediários reativos de oxigênio também têm efeitos leishmanicidas e são produzidos por macrófagos ativados (Green *et al*, 1990a e 1990b; Augusto *et al*, 1996).

A *Leishmania* spp. possui moléculas envolvidas em mecanismos de escape a resposta imune. Proudfoot e colaboradores demonstraram que os glicoinositolfosfolípídeos (GIPL) inibem a expressão da enzima iNOS2 bloqueando assim a oxidação do nitrogênio e a produção de intermediários reativos de nitrogênio (*apud* Bogdan & Röllinghoff, 1998).

A suscetibilidade ao parasita é determinada pela resposta tipo Th2, sendo que a principal citocina presente nesta resposta é a IL-4 (Scott & Farrell, 1998). Assim como a resposta Th1, a Th2 não é determinada apenas pela IL-4.

Segundo Nancy e colaboradores (*apud* Nancy *et al*, 1993), o TGF- β também afeta a resposta imunológica uma vez que inibe a proliferação de linfócitos T dependentes de IL-2, linfócitos B e a secreção de Ig, entre outros efeitos. Ao analisar a produção de

TGF- β por macrófagos peritoneais, Nacy e colaboradores (1993) verificaram a ocorrência de baixa concentração em culturas saudáveis, mas em macrófagos infectados por *L. (L.) major* essa produção aumenta até 100 vezes em 24 a 48 horas. Entretanto, estes pesquisadores observaram que, o TGF- β não afeta a IL-4, sua ação é autócrina e, aumenta a sobrevivência dos parasitas dentro das células hospedeiras (*apud* Solbach & Laskay, 2000). Outra interleucina envolvida com a suscetibilidade a *Leishmania* é a IL-10. Sua produção é elevada em culturas de macrófagos infectados com *L. (L.) major*, mas existem pesquisas que mostram variações na concentração de IL-10 de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida (Bogdan & Rölinghoff, 1998). Esta citocina diminui a atividade de células NK e a resposta dos linfócitos T com a conseqüente diminuição da produção de IL-12 e IFN- γ (*apud* Bogdan & Rölinghoff, 1999).

Conclui-se que o mecanismo de ação do sistema imunológico não é único, pois exige uma interação equilibrada de diversas citocinas para determinar a resistência ou suscetibilidade a leishmaniose. A cronicidade da infecção por *Leishmania* spp. caracteriza-se pela interferência do parasita na resposta imunológica por diferentes vias: modular a produção de citocinas e a inibir a apresentação de antígenos (Handman, 2000a).

O próprio parasita inibe a produção de algumas citocinas. Weinheber e colaboradores (1998) mostraram que macrófagos murinos infectados com *L. (L.) mexicana* têm a produção de IL-12 diminuída. Além disso, a diminuição do "burst" oxidativo de macrófagos infectados não é causada por ação direta de uma citocina, mas pelo próprio parasita, que provoca uma diminuição na produção de reativos de oxigênio

como o peróxido de hidrogênio, hidroxila e superóxido (*apud* Nacy *et al*, 1993; Bogdan & Röllinghoff, 1998).

Na resistência a *Leishmania major*, Green e colaboradores (1990a e 1990b) verificaram que o IFN- γ atua sobre macrófagos peritoneais murinos desencadeando a produção de reativos de nitrogênio. Estes pesquisadores sugerem que o óxido nítrico (NO), o maior responsável pela ação leishmanicida, é sintetizado por mecanismo dependente da L-arginina e pela enzima óxido nítrico sintase 2 induzida (iNOS-2), sendo que este mecanismo tem influência direta do TNF- α , que atua de forma autócrina, potencializando o IFN- γ nas culturas de macrófagos infectados com *L. (L.) major* (Green *et al*, 1990a e 1990b).

Porém, *Leishmania* spp. possui outros mecanismos de escape. Os GIPLs, presentes na membrana de *L. (L.) major*, e a indução da síntese do TGF- β também alteram a produção de NO. O GIPL (Bogdan & Röllinghoff, 1998) inibe a iNOS2 e o TGF- β bloqueia a oxidação do nitrogênio em algum ponto da cadeia bioquímica mediada pelo TNF- α (Nacy *et al*, 1993).

VACINAS E IMUNOTERAPIAS CONTRA A LEISHMANIOSE

As primeiras práticas de imunização contra *Leishmania*, também chamada leishmanização, foram descritas no início do século XX, entretanto esta prática é mais antiga. A exposição deliberada ao parasita, através da picada do flebotomíneo em uma região do corpo pouco exposta, ainda na infância, já era largamente difundida pela

população na Rússia e Israel. Esta prática tinha a finalidade de desenvolver uma lesão e conseqüentemente a imunidade, evitando assim possíveis lesões na face, que poderiam até desfigurar. Até hoje esta técnica é utilizada no Irã e, está sendo testada para utilização em massa, em populações de risco (Gunders, 1987; Handman, 1997; Modabber, 1989).

Barral-Neto e colaboradores (1987) sugerem que os programas de imunização seriam importantes para conter a leishmaniose, uma vez que o controle do vetor com auxílio de inseticida é muito difícil. Tais campanhas, promovendo a imunidade contra reinfecções, seriam possíveis pois a doença ocorre em regiões restritas e populações específicas, conseguindo assim excluir os agentes quimioterápicos atuais.

A OMS classifica as vacinas experimentais contra leishmaniose em gerações. Na primeira geração estão as vacinas compostas por parasitas mortos e BCG (Bacilo Calmette-Guérin). Mas, inicialmente este tipo de imunização não continha BCG e, não era raro a indução de respostas do tipo Th2 e a exacerbação da infecção. No início da década de 90 uma vacina foi testada em voluntários no Irã, composta por promastigotas de *L. (L.) major* e BCG, que mostrou conversão da resposta dos testes intradérmicos de Montenegro. Mais tarde esta foi aplicada em 2600 indivíduos de regiões endêmicas e, em um ano foram registrados apenas 200 casos de infecção, sem nenhuma ocorrência de exacerbação (WHO, 1995-6).

No Brasil testa-se a Leishvacin, uma vacina preparada com promastigotas mortos de *L. (L.) amazonensis* e timerosal, que não contém BCG. Esta vacina já passou pelas fases I e II de testes, mostrou conversão dos testes intradérmicos em mais de 80% dos indivíduos que receberam 3 doses (Mayrink *et al*, 1985; WHO, 1995-6; Marzochi, 1998).

Nesta mesma categoria de vacinas, um grupo indiano vem realizando testes, em primatas, com promastigotas de *L. (L.) major*. Os resultados mostraram diminuição na letalidade da infecção por amastigotas de *L. (L.) donovani*. Estas observações mostraram que existe uma grande reação cruzada entre as espécies do gênero *Leishmania* (WHO, 1995-6).

Por outro lado, as chamadas vacinas de segunda geração utilizam processos mais sofisticados, como o desenvolvimento de linhagens de parasitas avirulentos, microrganismos modificados geneticamente ou subunidades com capacidade antigênica (WHO, 1995-6). A primeira técnica está em estudo, uma vez que o mecanismo de perda da virulência de *Leishmania* sp. é desconhecido e, há casos de reversão da virulência deste parasita. Nesta linha de pesquisa existe uma cepa de *L. (L.) major* que mesmo inoculada em doses maciças em camundongos BALB/c não provocou a formação de lesões e induziu proteção parcial nos animais inoculados. A manipulação gênica já produziu *Salmonella* expressando gene da gp63 e *Vaccinia* com gp46/M2 com bons resultados. Finalmente, as subunidades, que possivelmente teriam capacidade de imunização mas, necessitam ser purificadas e depois testadas em conjunto com adjuvantes. Dentro desta categoria existe a vacina de ácido nucleico, onde plasmídeos codificando os genes, das mesmas moléculas com capacidade antigênica acima _ gp63 e antígeno/gp46/M2 de *L. (L.) major* _ foram inoculados via intramuscular em camundongos suscetíveis, determinando proteção parcial da infecção (Hardman *et al*, 2000b; Liew & Xu, 1995).

Enquanto uma vacina eficaz não é desenvolvida, diferentes substâncias com efeito imunoestimulador são utilizadas como tratamentos alternativos em casos refratários humanos ou experimentais em camundongos.

Buscando uma alternativa para o tratamento de 17 pessoas portadoras de LV, que não apresentavam melhora com o tratamento convencional, Badaró e Johnson Jr. (1993) utilizaram o IFN- γ com bons resultados. Esta linfocina foi utilizada também em um paciente com LCD, causada por *L. (L.) amazonensis*, que após 2 anos de tentativas infrutíferas utilizando antimonialato, obteve cura sem recaída após um ano de acompanhamento.

Também já foi testada, em humanos, uma combinação de tratamento com antimonialato e imunestimulação com extrato de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* mortos pelo calor. Neste caso, foram utilizadas diferentes concentrações de BCG como adjuvante entretanto, não houve diferença significativa entre os pacientes tratados com o método tradicional e esta alternativa (Convit *et al*, 1989).

Barral-Neto e colaboradores (1987) submeteram camundongos BALB/c a testes de imunização com promastigotas inativados de *L. (L.) amazonensis*, inoculados por diferentes vias. Os melhores resultados foram obtidos pela via intravenosa. A quantidade e a forma de inativação por promastigotas também mostraram alterações na capacidade de imunização.

DIAGNÓSTICO DAS LEISHMANIOSES

Os métodos de diagnóstico comumente utilizados são a observação direta do parasita em esfregaço e o teste de Montenegro (Smits & Hartskeerl, 1995).

O esfregaço é preparado a partir de uma amostra de tecido coletado da borda da úlcera ou de aspirado de mucosa, ou ainda, em caso de leishmaniose visceral da

medula óssea. São realizadas a coloração, principalmente pelo método de Giemsa, e a observação em microscópio óptico, em imersão (Berman, 1997). Nesse caso observam-se células com parasita na sua forma amastigota. O resultado do teste depende de muitos fatores como a presença de parasitas na lesão, o que varia de acordo com a espécie de *Leishmania*, a qualidade e coloração do esfregaço e da perícia do observador, podendo apresentar uma sensibilidade de 20 a 70% (CVE, 1995).

O teste de Montenegro consiste na aplicação intradérmica de Ag de diferentes espécies de *Leishmania*, resultando em uma reação de hipersensibilidade do tipo tardia caracterizada por uma área de irritação (pápula) ao redor do ponto aplicado após 48 a 72 horas, em caso de positividade. Essa avaliação é muito utilizada pela simplicidade, mas que não apresenta bons resultados em imunossuprimidos. Este exame apresenta boa sensibilidade (WHO, 2000), acima de 93%, mas pode apresentar-se negativa em casos de leishmaniose cutânea difusa ou visceral (CVE, 1995).

Com o material obtido da biópsia ou punção é possível realizar também outros testes. A técnica da cultura de promastigotas é útil para o diagnóstico de leishmaniose visceral e, apesar de sensível, é pouco utilizada pela necessidade de ambiente e equipamentos especiais. O material é expandido e utilizado para análise de isoenzimas e/ou anticorpos monoclonais (Berman, 1997). Há, também, a inoculação de amostras em hamsters (Herwaldt, 1999). Este tipo de exame é demorado pois depende do acompanhamento das características das lesões em seu processo evolutivo no animal. Mas possibilita o isolamento e tipagem da espécie de *Leishmania* em questão. A eficácia chega a 100% em *L. (L.) amazonensis* e 40% para *L. (V.) braziliensis* (CVE, 1995).

A análise histopatológica das lesões oferece menos de 20% de eficácia (Berman, 1997), mas, segundo o CVE (1995), pode chegar a pouco mais de 60% pois necessita de profissionais experientes para realizá-la.

Quanto aos exames sorológicos os mais utilizados são o ELISA e o teste de aglutinação direta, que apresentam uma sensibilidade aproximada de 70% mas, baixa especificidade em LC, com melhores resultados para casos de LV. Em regiões endêmicas de LV os testes sorológicos podem atingir mais de 90% de sensibilidade (Berman, 1997).

O método de PCR (Polimerase Chain Reaction) oferece sensibilidade e especificidade desde que exista um par de sondas para cada espécie de *Leishmania* e desde que não haja contaminação por DNA do hospedeiro na amostra (Smits & Hartskeerl, 1995), e encontra-se ainda em fase de avaliação (Dereure, 1998).

TRATAMENTOS UTILIZADOS CONTRA A LEISHMANIOSE

Apesar dos diferentes quadros clínicos apresentados pelas espécies de *Leishmania*, o tratamento é basicamente com o mesmo composto, o antimoniato tri ou pentavalente, modificando a via, o número de doses e o tempo de duração (Martindale, 1996).

O antimoniato, segundo Marsden, foi aprovado para utilização no tratamento da leishmaniose em 1947 (*apud* Bernam, 1988; 1997). Os compostos trivalentes são mais tóxicos que os pentavalentes. O estibogluconato sódico (Pentostam® _ Wellcome) e o antimoniato de meglumina (Glucantime® _ Rhodia) (Martindale, 1996) são

pentavalentes e, ainda o etil-estibamina e a uréia-estibamina (Neostibosan® e Solustibosan® _ Bayer) mais antigos, são utilizados até hoje (Berman, 1997). Entretanto, já existe descrição de casos de leishmaniose visceral e cutânea difusa refratários ao tratamento convencional (Badaró *et al*, 1990; Badaró & Johnson Jr., 1993) e também a hipótese de resistência a esse tratamento para *L. (L.) mexicana* (Becker *et al*, 1999).

O tratamento pode variar de acordo com o tipo de lesão (cutânea, mucocutânea, difusa ou visceral), idade e peso do paciente. O composto é administrado por injeção intramuscular, que provoca dores características desta via de aplicação e, também, pode ser administrado por via intravenosa mas, há associação com tromboflebite (Martindale, 1996). A dosagem de antimoniato é de, no máximo, $20\text{mg Kg}^{-1}\text{ Dia}^{-1}$ (Herwaldt & Berman, 1992; Martindale, 1996; Berman, 1997) por 20 dias para leishmaniose cutânea, podendo, em raras vezes, ter cura efetuada em menos tempo e, 28 dias para mucocutânea e visceral (Chance, 1995). Em caso de gravidez exige-se suspensão no tratamento (Martindale, 1996; Herwaldt & Berman, 1992).

Os efeitos colaterais dessa droga são dores de cabeça e musculares, náuseas, vômito, anorexia e fadiga, podendo apresentar toxicidade cardíaca, com taquiarritmias, pancreatite e sérios efeitos hepáticos com alterações que levam a falência do órgão (Martindale, 1996; Herwaldt & Berman, 1992). Quanto as alterações renais, não há consenso sobre os efeitos do antimoniato, enquanto alguns pesquisadores afirmam ser tóxico apenas em casos em que há problemas preexistentes (Herwaldt & Berman, 1992), outros consideram-no lesivo mesmo em pacientes sem problemas renais anteriores (Veiga *et al*, 1983). Há consenso apenas no fato dessas alterações serem reversíveis após o término do tratamento (Veiga *et al*, 1983).

Os danos provocados pelo antimoniato levaram Roblero e colaboradores (1999) a buscar uma técnica *in vitro*, de relacionar a dose necessária à espécie de *Leishmania* a ser erradicada. Enquanto não se encontra essa relação outras tentativas na busca de melhores resultados terapêuticos com diferentes doses são realizadas. O tratamento com $5\text{mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foi aplicado em 143 pacientes com *L. (V.) brazilensis* conseguindo-se 84% de cura sem recaídas, acompanhados por 10 anos, mostrando que essa dose é menos tóxica e pode ser utilizada em crianças (Oliveira-Neto *et al*, 1997). Porém, existe a hipótese de que casos tratados inadequadamente, como a interrupção precoce ou a utilização de doses reduzidas, desenvolvam parasitas mais resistentes aos antimoniais, dificultando a terapêutica após uma recidiva (Becker *et al*, 1999). Já a tentativa de aumento da dose para $40\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ foi aplicada com objetivo de diminuir as recaídas de casos mucocutâneos sem alcançar os efeitos nefrotóxicos, porém este não ofereceu melhores resultados que os do tratamento convencional (Sampaio *et al*, 1997). Esta posologia ($40\text{mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) também foi utilizada em casos viscerais mas não apresentou melhores resultados que as doses mais baixas recomendadas pela OMS (Silveira *et al*, 1993).

A aplicação da Anfotericina B (Fungizon ®) vem sendo utilizada concomitantemente ou não ao antimoniato. Sua ação sobre esteróides do parasita forma poros na membrana plasmática, porém sua seletividade é baixa e, também reage com colesterol do hospedeiro (Chance, 1995) ocasionando efeitos colaterais que limitam sua maior aplicação (WHO, 1990). As doses variam entre 0,5 a $5,0\text{mg.kg}^{-1}$, nunca ultrapassando $40\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$, sendo mais indicada nos quadros cutâneo e mucocutâneo que no visceral (Berman,1988). A sua apresentação pode ser em dispersão coloidal, complexo lipídico e em lipossomas (Berman, 1997). A aplicação no

Brasil é feita apenas em casos refratários, principalmente, para manifestações mucosas (CVE, 1995), não sendo utilizada para a forma cutânea difusa até o momento. Na tentativa de diminuir os efeitos colaterais deste fármaco pesquisadores do Brasil, Kênia e Índia testaram em casos de LV a anfotericina B sob forma encapsulada em lipossomas (AmBisome - da NeXstar Pharmaceuticals Inc.) que é normalmente utilizada para tratamento de micoses profundas, todavia sem resultados relevantes. Observaram ainda, que as respostas são dependentes da espécie de *Leishmania* em questão, sendo que os parasitas da Índia são mais sensíveis que os do Kênia e, finalmente os do Brasil são os mais resistentes ao tratamento experimental (Berman *et al*, 1998).

Quanto a pentamidina esta é considerada um tratamento de 2^a linha pois apresenta toxicidade ao paciente e seus efeitos não são satisfatórios (WHO 1990). Na LV a melhora aparece rapidamente com 15 aplicações em 66% dos casos e, em 94% após 27 aplicações, mas há uma recaída de mais de 21%. Em casos cutâneos o tratamento chega a 96% de eficácia (Berman, 1997). As doses são de $4,0\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ por 5 a 25 semanas e os efeitos colaterais são diversos: mialgia, cefaléia, náuseas e vômitos, taquicardia, hipotensão, hipo ou hiperglicemia, não sendo administrada em indivíduos com diabetes melitus (Berman, 1997; CVE, 1995).

A paramomicina é um antibiótico que vem sendo utilizado, na Índia e no Kênia com resultados satisfatórios em casos de LV resistentes ao antimoniato. Entretanto, não é utilizada em regiões onde as espécies de *Leishmania* mostram-se sensíveis ao tratamento convencional (Berman, 1997). Com relação as espécies cutâneas americanas, do subgênero *Viannia*, como *L. panamensis* e *L. braziliensis* sua utilização é ineficaz (Chance, 1995). Em experimentos com camundongos, Grogl e colaboradores

(1999) constataram que sua aplicação tópica em conjunto com gentamicina mostrou bons resultados contra *L. (L.) major* e *L. (L.) mexicana*.

Nos últimos anos a terapêutica por via oral tem sido desenvolvida. Assim o aluporinol vem sendo testado e utilizado mas, há controvérsias sobre a sua capacidade terapêutica. No final da década de 80 este composto foi utilizado no tratamento de 110 pacientes, com *L. (V.) panamensis*, durante uma epidemia, com resultados de 80% de cura nos pacientes tratados com apenas $20\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ e 74% de cura, em outro grupo, que recebeu a mesma dose de alopurinol associado as injeções de antimoniato ($20\text{mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$) (Martinez & Marr, 1992). Contudo, outros testes mostraram pouca eficiência no tratamento de leishmaniose cutânea na Colômbia (Berman, 1997; WHO, 1990).

Outros tratamentos pela via oral como cetoconazol e itraconazol, estão sendo testados mas apenas para a forma cutânea com diferentes níveis de eficácia (Berman, 1988). O cetoconazol, 400mg dia^{-1} por 2 semanas a 3 meses, mostrou resultados em *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) panamensis*, mas pouca ação sobre a *L. (V.) braziliensis* (Chance, 1995; Berman, 1997) e foi ineficiente para *L. (L.) tropica*. O itraconazol mostra mais tolerância que o cetoconazol mas também é menos ativo que este (Berman, 1997).

A última novidade no tratamento oral é o Miltefosine® (ASTA Médica - genérico Miltex) que vem sendo testado em conjunto com a OMS na Índia, chegando a resultados acima de 90% em LV (TDR News, 1999). Este composto é um derivado de fosfolípídeo com ação anti-neoplásica que já era utilizado no tratamento de câncer de pele e mama (Martindale, 1996).

Resultados obtidos até o momento mostram que ainda é necessário continuar a pesquisa de novas drogas tanto para terapêutica quanto para a profilaxia da leishmaniose.

A 8BROMOGUANOSINA

O desenvolvimento de drogas cuja função é estimular o sistema imunológico oferece importante avanço no tratamento de infecções por microrganismos e, também, no câncer (Bonnet & Robins, 1993).

Os imunoestimuladores são substâncias com capacidade para desencadear ou potencializar uma resposta imunológica. Estes compostos podem ser endógenos ou exógenos. À exemplo de substâncias endógenas podemos citar as citocinas, linfocinas e prostaglandinas, que estão presentes normalmente nos indivíduos com o sistema imune preservado. Enquanto os exógenos que não são próprios do organismo, podem ser naturais, de origem biológica como extrato de *Corynebacterium parvum* e a BCG; ou sintéticos, como o MIMP (5'-metil-inosina-monofosfato), o levamisole (anti-helmíntico) e os ribonucleosídeos substituídos (Masihi, 1996). A notificação do uso de substâncias com capacidade imunoestimuladora data do final do século XIX por Coley, enquanto os compostos exógenos sintéticos, com tal capacidade, começaram a ser avaliados mais recentemente (Werner & Jollès, 1996).

Entre os imunoestimuladores sintéticos, os ribonucleosídeos derivados de purinas, substituídos nas posições N7 e/ou C8, como 8-bromo-guanosina (8BrGuo), 8-mercapto-guanosina (8-MGuo) e 7-metil-8-oxo-guanosina, pertencem a uma família de

derivados da guanosina, sintetizada por Robins e colaboradores em 1964 (Chen *et al*, 1994) e a 7-alil-8-oxo-guanosina (Loxoribine®) sintetizada por Come e colaboradores (Come *et al*, 1991) . O composto utilizado no presente trabalho foi a 8BrGuo cujas fórmulas estrutural e química são mostradas nas figuras 1a e 1b.

1a)

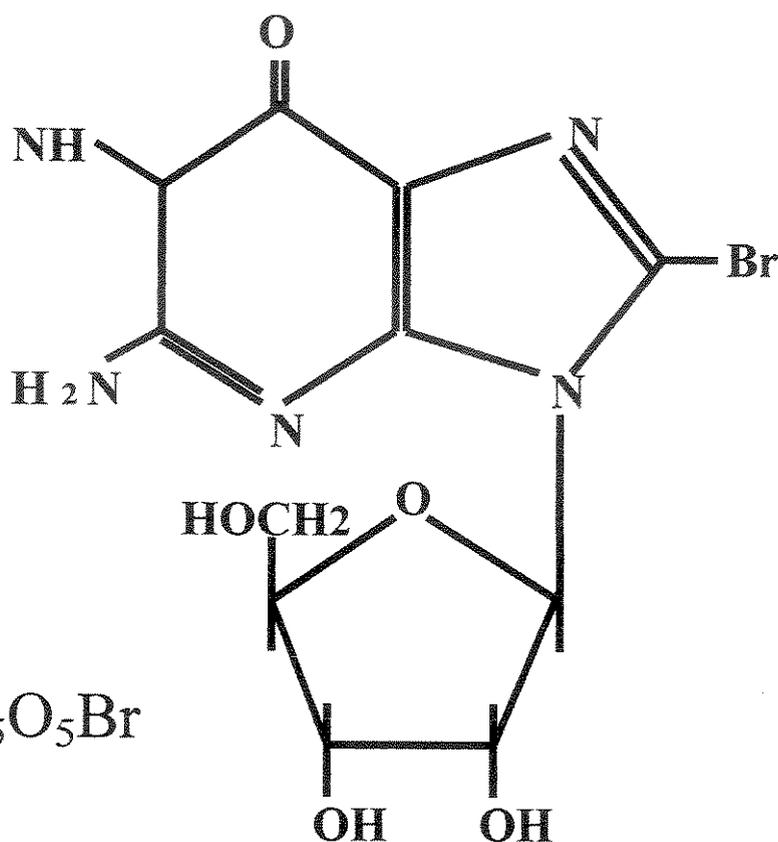
1b) $C_{10}H_{12}N_5O_5Br$

Figura 1: 8BrGuo _ 1a) Fórmula estrutural; 1b) Fórmula química.

Contudo, o efeito imunoestimulador da 8BrGuo foi descoberto apenas em 1980 por Goodman e Weigle (1981) ao utilizá-la como um controle em experimentos investigando a função do GMP-cíclico como segundo mensageiro (Goodman, 1991). Nos testes iniciais verificaram que este ribonucleosídeo disparou altos níveis de ativação linfocitária sem qualquer relação metabólica com o GMP-cíclico (Goodman & Weigle, 1981). Novos experimentos mostraram que a 8BrGuo passa facilmente, por

difusão, pela membrana da célula. Além destes dados, verificaram que a 8BrGuo induz a secreção policlonal de imunoglobulina de forma dose dependente (Goodman e Weigle, 1982a). Goodman e Weigle (1982b), também, verificaram que a 8BrGuo não altera enzimas responsáveis pela metabolização da guanosina e do GMP-cíclico, não havendo alteração destes compostos nem de suas concentrações intracelulares.

Goodman (1988b) testou também hipóteses possíveis para o destino da 8BrGuo após sua entrada nas células. Verificou que não ocorre aproveitamento da 8BrGuo, nem da 8-bromo-guanina, como substratos para hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT) na presença de fosforibosil pirofosfato nos linfócitos B, nem a incorporação da 8BrGuo no ácido nucleico. Já a 7-metil-8-oxo-guanosina testada em células de pacientes deficientes em HPRT mostrou aumento da resposta anticorpo específico. Goodman supõe que a 8BrGuo pode ser fosforilada pela deoxicitidina quinase (dCK) ou ainda, por outro sistema de enzima.

Outros testes utilizando o derivado do ribonucleosídeo 8MeGuo também foram realizados. A 8MeGuo demonstrou efeitos semelhantes a 8BrGuo, como a ativação linfocitária dose dependente, sendo mais eficiente em concentração de 10mM e diminuindo os efeitos em doses mais elevadas. Goodman e Weigle, verificaram que a 8MeGuo promove um sinal semelhante ao dos linfócitos T para linfócitos B estimulados com Ag. Só então os autores apresentaram os nucleosídeos derivados da guanosina como uma nova classe de adjuvantes para resposta *in vitro*, reafirmando a capacidade de ativar linfócitos B, induzindo proliferação linfocitária e a secreção de imunoglobulina. Segundo estes pesquisadores, os ribonucleosídeos substituídos passam pela membrana celular por transporte simples devido ao baixo peso molecular e, ainda disparam respostas ativando sítios intracelulares. Esta verificação confirmaria a

capacidade da 8BrGuo estimular linfócitos diferentemente do mecanismo clássico através de receptores de membrana. Com os experimentos *in vivo*, Goodman e Weigle observaram o aumento da resposta imune relacionada com o estímulo antigênico oferecido a camundongos imunocompetentes e imunodeficientes. Goodman e Weigle sugerem que estes ribonucleosídeos são capazes de restaurar a resposta imune a níveis normais em modelos de camundongos imunodeficientes. E, que a ação do 8BrGuo, *in vivo* também é altamente dose e tempo dependente (Goodman & Weigle, 1983a; 1983b; 1983c; 1983d).

Nas investigações seguintes, Goodman e Weigle (1984a) demonstraram o comportamento da 8BrGuo em relação a membrana celular, verificando que o composto atravessa a membrana, inicialmente com fluxo unidirecional, com diferenças cinéticas dose dependentes e, após alcançar um equilíbrio interno, torna-se bidirecional. Também compararam o efeito da ativação na expressão de proteínas de membrana de linfócitos B estimulados por LPS e 8BrGuo, verificando que a 8BrGuo durante as primeiras horas após o estímulo não altera tais proteínas como faz o LPS, mas após 12 horas não há diferenças entre estes mitógenos.

Entretanto, Feldbush e Ballas (1985) ao analisar apenas os efeitos da 8MeGuo *in vitro*, verificaram que este composto não é capaz de estimular proliferação em linfócitos B de ratos, mostrando que existe restrições à ação deste ribonucleosídeo. Verificaram, também, que ocorre ativação dose-dependente de linfócitos T, em concentrações entre 0,2 e 0,3mM, mas que concentrações mais altas podem ser tóxicas e pouco eficientes.

Concomitantemente a Feldbush e Ballas, Scheuer e colaboradores (1985a; 1985b) confirmaram que a 8BrGuo atua predominantemente em linfócitos B maduros e, verificaram também, que eleva a resposta imune humoral *in vivo* para antígenos

protéicos (gamaglobulina humana - HGG) sendo mais eficiente 1 a 2 dias após a inoculação em camundongos A/J. Estes pesquisadores verificaram ainda a quebra do estado de tolerância, provocado por HGG, para um estado imunogênico (responsivo) após o tratamento com 8BrGuo. Levantaram a hipótese de existir um mecanismo indireto pelo qual a ação da 8BrGuo sobre os linfócitos T seria um processo no qual o ribonucleosídeo poderia converter a tolerância para o estado imunogênico através de um efeito em macrófagos que subseqüentemente atuariam sobre as células T. Portanto, a ação da 8BrGuo sobre linfócitos T seria indireta.

Em 1985, Goodman e Weigle (1985a; 1985b) observaram que a 8MeGuo estimula proliferação das células B, de camundongos da linhagem SJL, mas não induz a diferenciação destas, como nas demais linhagens até então testadas, concluindo que o estímulo da 8MeGuo em linfócitos B é semelhante a sinalização de linfócitos T ("T-like"). Demonstram ainda que outro ribonucleosídeo substituído, a 7-metil-8-oxo-guanosina (7M8OGuo), atua sinergisticamente com a IL-2 em cultura de linfócitos T humanos elevando a resposta primária a antígenos de hemácia de carneiro.

Wicker e colaboradores (1987), compararam os efeitos da 8BrGuo e da 8MeGuo sobre linfócitos murinos em diferentes estágios de desenvolvimento. Estes pesquisadores verificaram que a 8BrGuo e a 8MeGuo induziram a proliferação e diferenciação de linfócitos B, mas a resposta de pequenos linfócitos B é menor. Estes pequenos linfócitos apresentaram apenas proliferação e não se diferenciaram. Houve ainda um aumento na expressão de molécula "Ia" na superfície da membrana celular dos pequenos linfócitos tratados, demonstrando indícios do começo de ativação celular. Esses pesquisadores afirmaram que a ativação dos linfócitos B é o primeiro alvo de

ação da 8BrGuo, mas acreditam também que este ribonucleosídeo pode estimular macrófagos que, por sua vez, estimulariam os linfócitos B.

Dosch e colaboradores (1988) investigaram os efeitos dos mesmos ribonucleosídeos mono-substituídos, 8BrGuo e 8MeGuo, em linfócitos B humanos. Seus resultados indicaram que tanto a 8BrGuo quanto a 8MeGuo são capazes de induzir a proliferação e a resposta policlonal de linfócitos B humanos, afirmando que a resposta foi semelhante, mas não igual, a dos linfócitos B murinos.

O primeiro teste do efeito da 8BrGuo sobre células diferentes de linfócitos foi descrito por Koo e colaboradores (1988), que investigaram os efeitos da 8BrGuo em células "natural killer" (NK) e macrófagos. Culturas de células esplênicas murinas incubadas com 8BrGuo mostraram aumento da citotoxicidade de NK para células YAC-1. Em culturas de macrófagos peritoneais murinos 8BrGuo provocou indução de atividade lítica destas células de maneira semelhante a induzida pelo $\text{INF-}\alpha\beta$ ou $\text{IFN-}\gamma$ e LPS ou pelo $\text{IFN-}\gamma$ mais "polyIC" (ácido poliribosínico poliribocitidílico). Devido às células NK e macrófagos serem ativados pelo $\text{IFN-}\gamma$, Koo e colaboradores (1988) testaram ainda a possibilidade do $\text{IFN-}\gamma$ ser o intermediador da ação da 8BrGuo. Para tanto, utilizaram anticorpos anti- $\text{IFN-}\gamma$ e anti- $\text{IFN-}\alpha\beta$ em culturas tratadas com 8BrGuo e verificaram uma drástica redução tanto da atividade das células NK como na atividade citolítica dos macrófagos, indicando uma ação semelhante ao $\text{IFN-}\gamma$, como suposto inicialmente.

Ojo-Amaize e colaboradores (1989/1990) avaliaram a capacidade dos ribonucleosídeos 8BrGuo, 8MeGuo, 7m8oGuo e 7-tia-8-oxo-guanosina influenciarem o "burst" oxidativo de macrófagos peritoneais murinos, além da geração de espécies

reativas de oxigênio. Estes pesquisadores verificaram que também há resposta dose dependente da 8BrGuo em fagócitos, sendo potentes ativadores destas células à produção de metabólitos de oxigênio, cuja função bactericida e inibidora de crescimento de microrganismos intracelulares é conhecida (Maüel, 1996; Maüel & Ransijn, 1997). Os autores, baseados nos dados obtidos, sugerem que estes ribonucleosídeos substituídos ativam fagócitos pela sua capacidade de induzir interferon, que por sua vez ativa os fagócitos através de várias funções (Ojo-Amaize *et al*, 1989).

Chen e colaboradores (1994) sintetizaram um grupo com 80 diferentes compostos sendo que os melhores resultados, nos ensaios biológicos, foram obtidos com a 7-alil-8-oxo-guanosina (loxoribine®). A loxoribine pode ser chamada de segunda geração dos ribonucleosídeos substituídos. Este composto e outros foram avaliados e divididos em três grandes grupos, de acordo com a ação seletiva provocada. Primeiro os compostos que aumentam a resposta humoral sem afetar a proliferação de linfócitos e células NK. O segundo grupo eleva a atividade das células NK e induz a proliferação de linfócitos B mesmo na ausência de anticorpos. E, finalmente, o terceiro que induz a atividade das células NK e a resposta humoral sem a proliferação dos linfócitos B (Goodman *et al*, 1995).

Após a descoberta do efeito imunoestimulador dos ribonucleosídeos substituídos, Goodman (1991), na primeira revisão sobre estes compostos, comenta sobre o potencial da sua utilização. A primeira seria no restabelecimento da função protetora do sistema imune de indivíduos imunodeficientes. A segunda como adjuvante em vacinas cujos antígenos sejam fracamente imunogênicos ou ainda combinado com agentes antimicrobianos e, também, induzindo a produção de interferon.

OBJETIVOS

- Analisar e comparar o desenvolvimento de lesões causadas por amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* em camundongos susceptíveis tratados com o ribonucleosídeo monosubstituído 8BrGuo.
- Averiguar, em camundongos, a toxicidade do ribonucleosídeo monosubstituído 8BrGuo.
- Investigar o mecanismo de ação do ribonucleosídeo monosubstituído 8BrGuo em macrófagos .

As seguintes metas foram cumpridas para que se pudesse atingir os objetivos:

- Estabelecer a via mais adequada para o tratamento com 8BrGuo em camundongos susceptíveis infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* .
- Estabelecer a dose de 8BrGuo a ser utilizada no tratamento de camundongos.
- Averiguar a toxicidade da 8BrGuo em fígado, rim, baço e placas de Peyer de camundongos.
- Estimar a regeneração dos tecidos acima caso tenham sido afetados pelo ribonucleosídeo.
- Medir a ação estimulatória da 8BrGuo em baço e placas de Peyer de camundongos.
- Avaliar a capacidade de estimulação do 8BrGuo em culturas primárias de macrófagos murinos por meio da quantificação de nitrito.

MATERIAIS E MÉTODOS

1) COMPOSTOS UTILIZADOS

Adjuvante Completo de Freund - Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, USA

8BrGuo Sigma

Meio de Iscove Sigma

L-Glutamina Sigma

Glucantime Rhodia Farma Ltda., Santo Amaro, SP, Brasil

HEPES Sigma

IFN- γ Sigma

LPS Sigma

Reagente de Griess Promega e Sigma

SFB CultiLAB, Campinas, SP., Brasil

Tween 80® Synth, Diadema, SP., Brasil

Penicilina e Estreptomicina Sigma

* Sigma: Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA

2) ANIMAIS

Camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6/Uni, BALB/c, CBA/J, fêmeas com idade entre 6 e 12 semanas, SPF ("Specific Patogen Free"), fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB)/UNICAMP foram mantidos no Biotério do

Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas durante o decorrer dos experimentos.

3) PARASITAS *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269)

Formas amastigotas foram mantidas em camundongos BALB/c através da inoculação via subcutânea de 2×10^6 parasitas no coxim de uma das patas traseiras.

Formas promastigotas foram mantidas em meio Iscove's suplementado com 5% SFB, 20mM de bicarbonato de sódio, 10mM de tampão HEPES, 100UI/ml de penicilina e 100 μ g/ml de estreptomicina, em estufa seca a temperatura de 26 a 28°C no Laboratório de Leishmaniose do Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

4) OBTENÇÃO DE PARASITAS

Para manter os parasitas ou utilizá-los em culturas, as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram retiradas de lesões desenvolvidas nas patas dos camundongos BALB/c. O animal foi sacrificado por deslocamento cervical, a pata infectada foi retirada e o tecido raspado em solução salina com penicilina e estreptomicina. A suspensão obtida foi filtrada em "voil" estéril para retirada de resíduos (protocolo adaptado de Cantos *et al*, 1993). O número de amastigotas foi contado com auxílio de Câmara de Neubauer.

5) CULTURA DE MACRÓFAGOS

Camundongos isogênicos C57BL/6/Uni, com idade entre 8 e 12 semanas, foram sacrificados por deslocamento cervical. Com auxílio de seringa descartável, injetou-se 10 ml de solução salina gelada no peritônio, o abdome do animal foi massageado e a pele rebatida. Utilizando uma pipeta Pasteur retirou-se o exsudato armazenando-o em frasco imerso em banho de gelo. O número de células foi contado em Câmara de Neubauer, considerado-se que 50 a 60% das células obtidas constituíam-se de macrófagos (protocolo adaptado de Barbiéri *et al*, 1993). Transferiu-se o exsudato para placas de cultura de 24 poços (Costar, Corning, Falcon ou Nunc), contendo lamínulas redondas de 12mm de diâmetro (GlassTecnica), um volume de exsudato necessário para obter 5×10^5 macrófagos aderidos por lamínula, incubando-os por 2 horas a 37°C. Após a adesão estas lamínulas foram retiradas, lavadas em salina morna, colocadas em novas placas com meio Iscove's enriquecido com SFB (10%), L-Glutamina (2mM) e HEPES (10mM) e, incubadas em estufa úmida com atmosfera de 5% de CO₂ durante 15 a 24 horas.

6) INFECÇÃO DAS CULTURAS DE MACRÓFAGOS COM *LEISHMANIA (L.) AMAZONENSIS*

As culturas de macrófagos murinos foram infectadas com 3 amastigotas para cada macrófago e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após 1 hora as

lamínulas foram retiradas, enxaguadas em salina a 37°C, colocadas em novas placas de cultura com meio Iscove's e incubadas em estufa úmida com atmosfera com 5% de CO₂ durante 18 a 24 horas. Após os tratamentos as lamínulas foram retiradas das placas, lavadas em solução salina morna, secas, fixadas com álcool metílico por 15 minutos, posteriormente coradas com Giensa durante 10 a 15 minutos e montadas em lâminas com Entelan ® (Merck).

7) ÍNDICE FAGOCÍTICO (I.F.)

A análise da infecção das culturas de macrófagos foi realizada através do Índice Fagocítico.

Amostras de no mínimo 200 macrófagos foram contadas aleatoriamente em cada lamínula, em duplicata ou triplicata. Foram verificados o número de macrófagos que apresentavam-se infectados e o número de amastigotas por célula infectada. Com estes dados calculou-se o I.F. (Cantos *et al*, 1993).

$$\text{I.F.} = \%M\phi.\text{Inf.} \times (\text{No. Amast.} / \text{No.M}\phi.\text{Inf.})$$

%M ϕ .Inf. = percentual de macrófagos infectados

X = sinal de multiplicação

No. Amast. = número total de amastigotas encontrado

/ = sinal de divisão

No.M ϕ .Inf. = número de macrófagos infectados

8) QUANTIFICAÇÃO DE NITRITO (NO₃)

Macrófagos foram estimulados com 8BrGuo. Para controle positivo utilizou-se 20pg/mL de LPS e 100UI/mL ou 20ng/mL de IFN- γ e como controle negativo apenas o meio de cultura. Os sobrenadantes foram coletados após 24, 48 e 72 horas. Concomitantemente à coleta dos sobrenadantes as lamínulas foram enxaguadas em salina, fixadas por 15 minutos em álcool metílico, coradas com Giemsa, montadas em Entelan[®] e analisadas. A produção de NO foi dosada indiretamente pelo método de Griess. Todos os experimentos foram realizados em duplicata ou triplicata. Após o término do experimento, 100 μ L dos sobrenadantes das culturas foi colocado em placa de 96 poços (Costar ou Nunc) onde, a seguir, foram adicionados os reagentes de Griess e incubados por 3 minutos. A mensuração colorimétrica foi realizada a 540nm em leitora de ELISA (Labsystems Multiskan Biochromatic tipo 348, 1991 ou Labsystems Multiskan MS, 1995/ Laboratórios do Departamento de Microbiologia e Imunologia - IB). Uma curva padrão sempre foi realizada paralelamente com a finalidade de obter uma equação de regressão linear para cada experimento e, assim, calcular a concentração correspondente a absorvância apresentada (Green *et al*, 1984; modificado de Adler *et al*, 1996).

9) INFECÇÃO DOS ANIMAIS COM *L. (L.) amazonensis*

Animais isogênicos da linhagem CBA/J, susceptíveis a *L. (L.) amazonensis*, com idade entre 6 a 12 semanas foram utilizados para avaliação dos tratamentos. Após a

obtenção dos parasitas (item 4 de Materiais e Métodos) inoculou-se, via subcutânea, 5×10^5 amastigotas no coxim da pata esquerda traseira, contidos em volume de $40 \mu\text{l}$, com auxílio de seringa para insulina (B-D, agulha ultra fina).

10) MEDIÇÃO DAS PATAS

Durante, no mínimo, 12 semanas as patas infectadas e contralaterais foram medidas com auxílio de paquímetro digital (Starret).

11) ANÁLISE ESTATÍSTICA

O parâmetro de comparação entre os grupos de tratamento foi o coeficiente angular da curva de crescimento apresentada pelas patas infectadas de cada animal durante o período.

Os animais de cada grupo foram marcados com piques nas orelhas com a finalidade de individualizá-los para assumir a independência dos dados evitando assim, a "contaminação" por outras variáveis. Para cada animal, foi ajustada uma regressão linear a fim de resumir o comportamento do crescimento da pata infectada ao longo das semanas em uma só medida, resultando em um coeficiente angular de reta para cada indivíduo. O teste de Bartlett foi aplicado para a análise da variância entre os indivíduos. Finalmente, aplicou-se o método t-Student, com um alfa de 5%, para comparação entre os resultados obtidos nos diferentes grupos de tratamento (Mood *et al*, 1974).

11) ANÁLISE HISTOLÓGICA

Grupos de três animais foram anestesiados com éter e realizada a perfusão via intracardíaca, com paraformaldeído (4%) em PBS (0,1M) pelo ventrículo esquerdo e seccionadas as veias pulmonares para escoar o excesso de volume (Giorgio *et al*, 1998b). Os órgãos (fígado, rim, baço e placas de Peyer) foram coletados e conservados no mesmo fixador. Após 24 horas, as amostras foram lavadas em água destilada e, iniciou-se o processo de desidratação para a inclusão em parafina. Os tecidos foram cortados com 4 μ m de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina.

12) TESTES BIOQUÍMICOS NO SANGUE E HEMOGRAMA

Grupos de oito (8) animais CBA/J, com idade entre 6 a 8 semanas, foram anestesiados com éter e coletou-se o sangue por punção ocular.

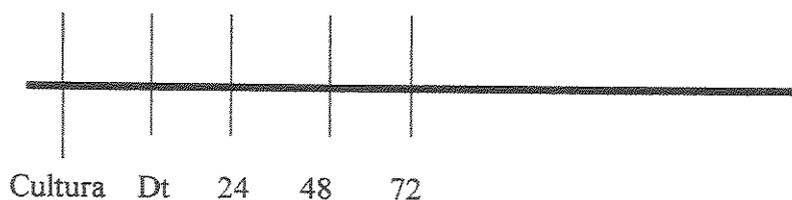
Para o hemograma completo foram utilizados tubos contendo heparina.

Foram realizadas também as dosagens de Uréia, Transaminase Glutâmico-Oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmico-Piruvica (TGP).

13) ESQUEMAS DE TRATAMENTO *in vitro*

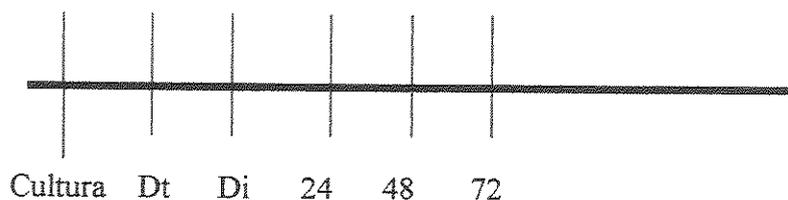
As culturas de macrófagos foram tratadas com 8BrGuo diluído em NaOH (0,5 N) com pH final 8,0.

Esquema 1:



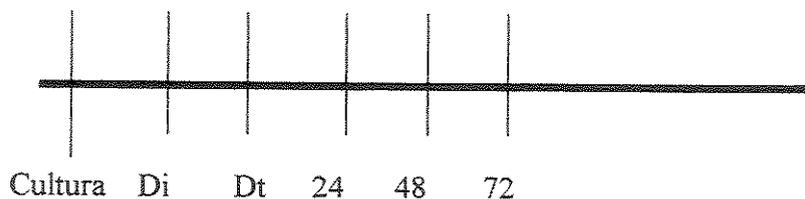
Cronograma de tratamento sem infecção: após 24 horas de cultura os macrófagos foram tratados com 8BrGuo. Dt = Dia do tratamento; 24, 48 e 72 horas após o tratamento, com 8BrGuo, em que realizou-se a coleta do sobrenadante e fixação das lamínulas.

Esquema 2:



Cronograma de tratamento antes da infecção: as culturas de macrófagos foram tratadas com 8BrGuo 24 horas antes de serem infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Dt = Dia do tratamento; Di = Dia da infecção; 24, 48 e 72 horas após a infecção com amastigotas de *L. amazonensis*, em que se realizou a coleta do sobrenadante e fixação das lamínulas.

Esquema 3:

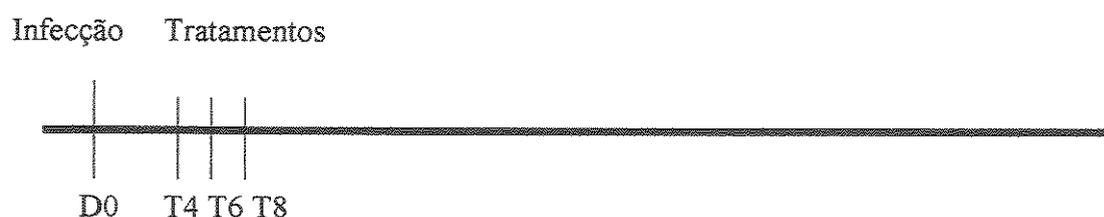


Cronograma de tratamento após a infecção: as culturas de macrófagos foram tratadas com 8BrGuo 24 horas após serem infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Di = Dia da infecção; Dt = Dia do tratamento; 24, 48 e 72 horas após o tratamento com 8BrGuo realizou-se a coleta do sobrenadante e fixação das lamínulas.

15) ESQUEMAS DE TRATAMENTO *in vivo*

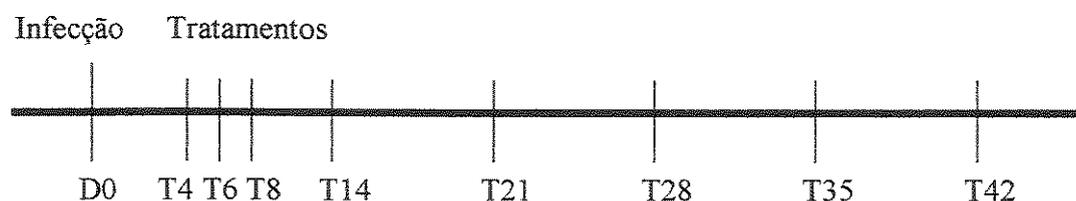
Os tratamentos *in vivo* diferenciam-se pela combinação entre a via de administração _ intravenosa, intragástrica, subcutânea e intraperitoneal _ e, o número de doses de 8BrGuo aplicados nos camundongos _ terapia de curta ou longa duração.

Esquema 4:



Cronograma de tratamento de curta duração: quatro dias após a infecção, com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os animais foram tratados com 3 aplicações de 8BrGuo em dias alternados. D0 = Dia da infecção; T = Dias do tratamento.

Esquema 5:



Cronograma de tratamento de longa duração: quatro dias após a infecção, com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, os animais foram tratados com 3 aplicações de 8BrGuo em dias alternados e administrando-se ainda 1 dose semanal durante 5 semanas consecutivas. D0 = Dia da infecção; T = Dias do tratamento.

RESULTADOS

INVESTIGAÇÃO *in vitro*

ÍNDICE FAGOCÍTICO

Como verificado em resultados anteriores (Giorgio & Barão, 1998), a 8BrGuo atua sobre macrófagos murinos causando alterações morfológicas que sugerem ativação celular (figura 2A e 2B). Verificamos que estas células quando infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratadas com o composto, mostraram diminuição da infecção tanto no número de macrófagos infectados quanto no número médio de parasitas por macrófago (figura 2C e 2D). Estes resultados foram quantificados e testados estatisticamente, mostrando diferenças significativas, indicando assim uma diminuição na infecção de culturas de macrófagos tratadas com 8BrGuo em comparação com os controles não tratados. É possível verificar, comparando os I.F.s, que o tratamento de culturas com 8BrGuo realizados após a infecção, diminuiu de 78% a 89%, sendo mais efetivo que os tratamentos antes do estabelecimento da infecção, que apresentaram diminuição de aproximadamente 58% (figura 3). Também é possível verificar uma relação dose resposta com uma dose mínima para iniciar o processo e uma máxima, que quando ultrapassada pode ser até prejudicial às células em quaisquer dos tratamentos testados.

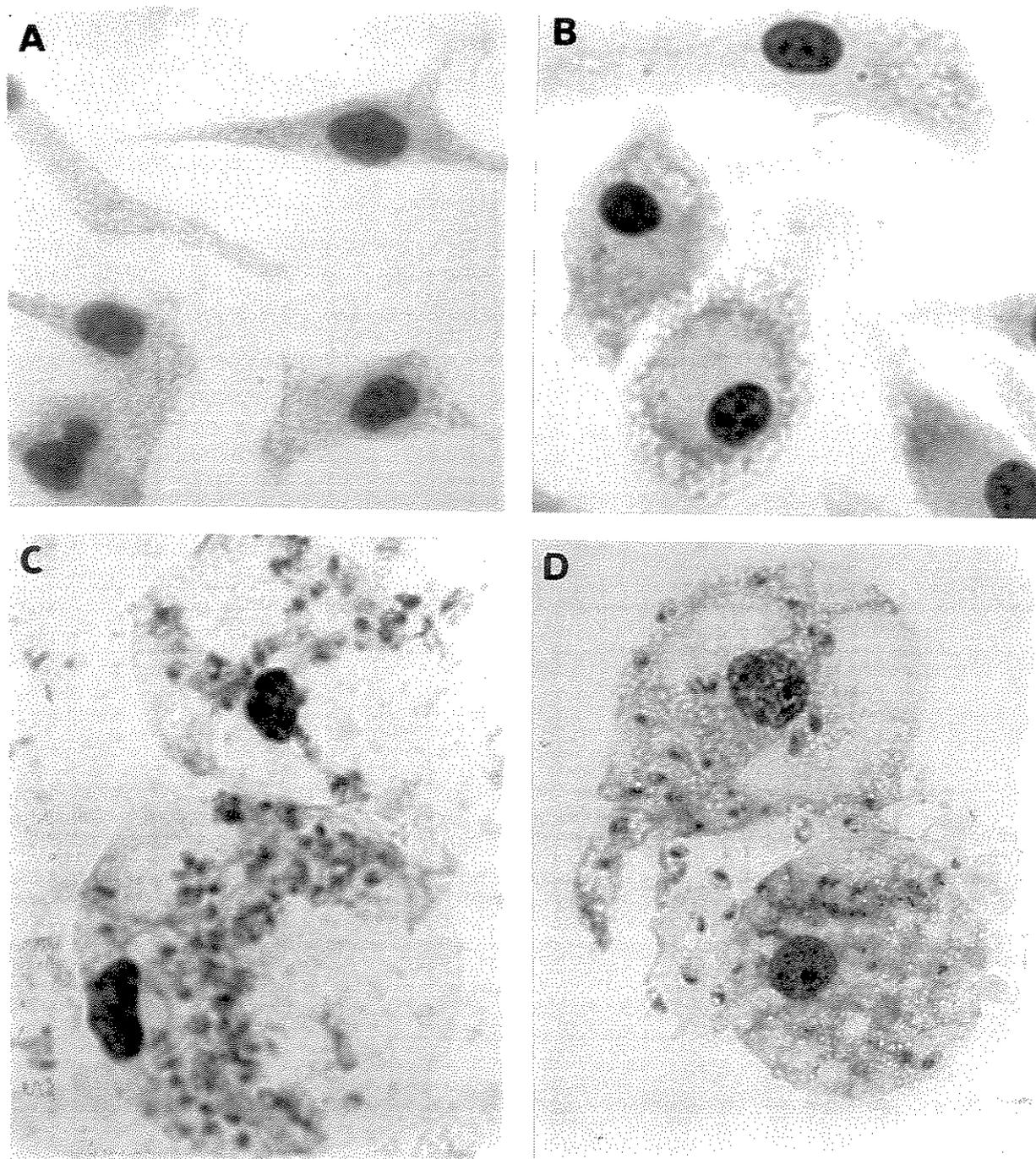


Figura 2: Aspecto morfológico de culturas de macrófagos peritoneais murinos cultivados em placas de cultura. A) Macrófagos normais, sadios (não infectados) sem tratamento; B) Macrófagos tratados com 8BrGuo (0,75mg/mL equivalente a 2mM); C) Macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* sem tratamento; D) Macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratados com 8BrGuo 24 horas após a infecção. (Aumento 1000X).

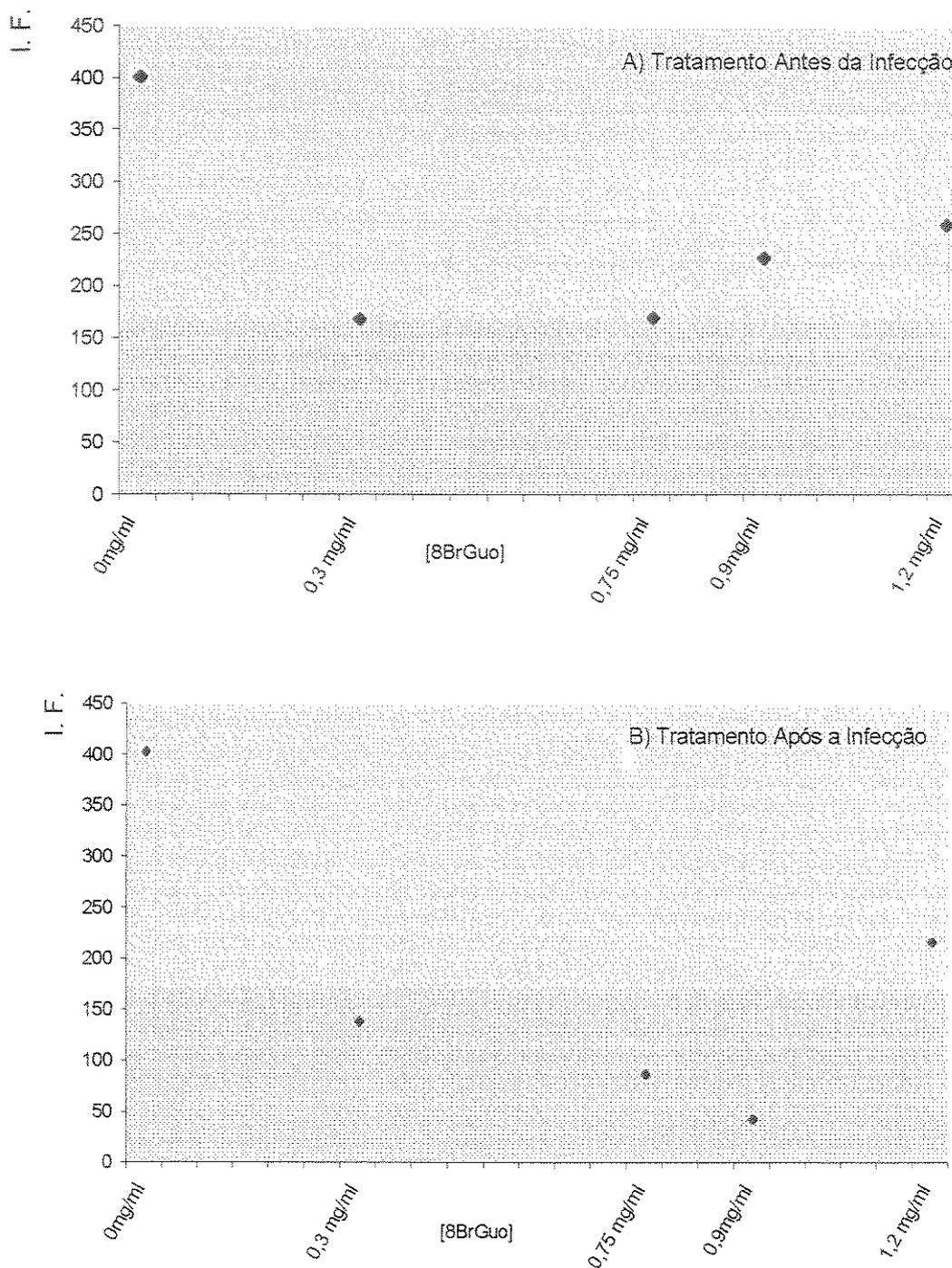


Figura 3: Índice fagocítico de culturas de macrófagos peritoneais murinos tratados antes da infecção. Macrófagos peritoneais murinos receberam tratamento A) antes da infecção: Controle (apenas meio); 8BrGuo nas concentrações: 0,3mg/mL (=0,83mM); 0,75mg/mL (=2,07mM); 0,9mg/mL (=2,48mM) e 1,2mg/mL (=3,31mM) . B) tratamento após a infecção: Controle (apenas meio); 8BrGuo nas concentrações: 0,3mg/mL (=0,83mM); 0,75mg/mL (=2,07mM); 0,9mg/mL (=2,48mM) e 1,2mg/mL (=3,31mM).

DOSAGEM DE NITRITO

O óxido nítrico (NO) é uma espécie reativa de nitrogênio com capacidade leishmanicida comprovada. Assim, com o objetivo de investigar o possível mecanismo de ação de 8BrGuo no metabolismo de macrófagos murinos averiguamos a concentração de nitrito, pois sua concentração indica de forma indireta a de óxido nítrico.

Esta dosagem foi realizada em culturas de macrófagos peritoneais murinos sadios e infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis* com a finalidade de traçar um perfil da ação de 8BrGuo em diferentes momentos desta infecção.

CULTURAS NÃO INFECTADAS

Inicialmente avaliou-se a influência de 8BrGuo em culturas de macrófagos peritoneais murinos não infectados (figura 4).

Como é possível notar, não houve aumento significativo na concentração de nitrito na cultura estimulada apenas por 8BrGuo, com valores muito próximos ao controle, o qual recebeu apenas meio de cultura e às culturas que receberam LPS. Mostrou ainda que apenas o LPS não foi suficiente para estimular a produção de reativos de nitrogênio. Contudo verificou-se que os grupos que receberam IFN- γ ou IFN- γ + LPS, produziram concentrações elevadas de nitrito, dados semelhantes aos

encontrados por outros pesquisadores. É interessante notar as concentrações de nitrito produzidas das culturas que foram estimuladas por IFN- γ + 8BrGuo, as quais apresentaram 46% mais nitrito que o grupo IFN- γ + LPS e 62% mais que o grupo IFN- γ após 96 horas de estímulo. Assim 8BrGuo não seria capaz de estimular a produção de reativos de nitrogênio, mas em contato com IFN- γ potencializaria a reação.

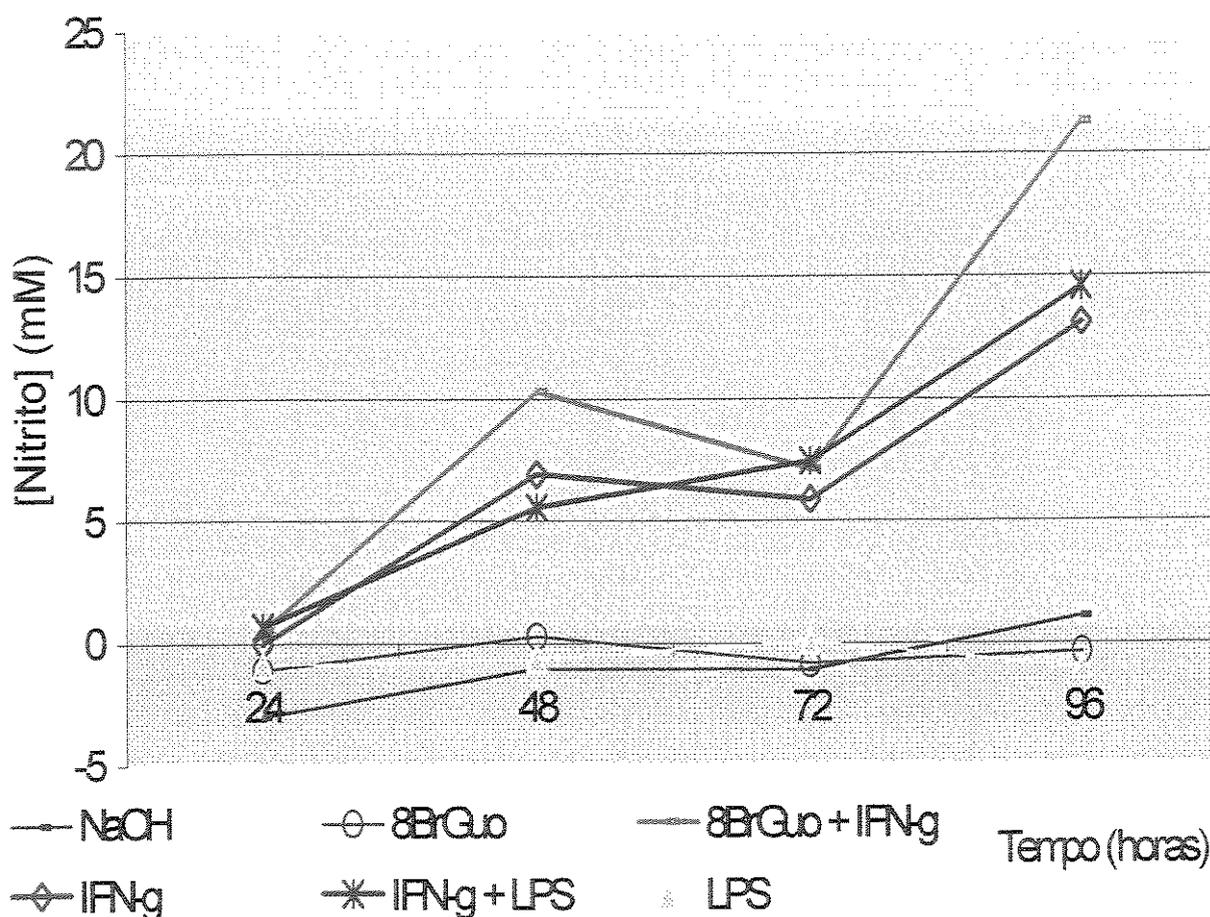


Figura 4: Dosagem de nitrito (cinética da concentração de nitrito) em sobrenadantes de culturas primárias de macrófagos murinos saudáveis. Cerca de 5×10^5 macrófagos peritoneais murinos foram tratados com: 8BrGuo (0,3mg/mL), 8BrGuo (0,3mg/mL) + IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL) + LPS (20pg/mL) e LPS (20pg/mL). Os sobrenadantes foram coletados após: 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento e a concentração de nitrito foi medida pelo método de Griess.

CULTURA INFECTADA ANTES DO TRATAMENTO

Com o objetivo de investigar se o parasitismo influenciaria a capacidade de ativação de macrófagos pela 8BrGuo dosamos a concentração de nitrito em culturas tratadas após serem infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, coletando o sobrenadante e dosando a concentração de nitrito após 24, 48, 72 e 96 horas após os tratamentos (figura 5).

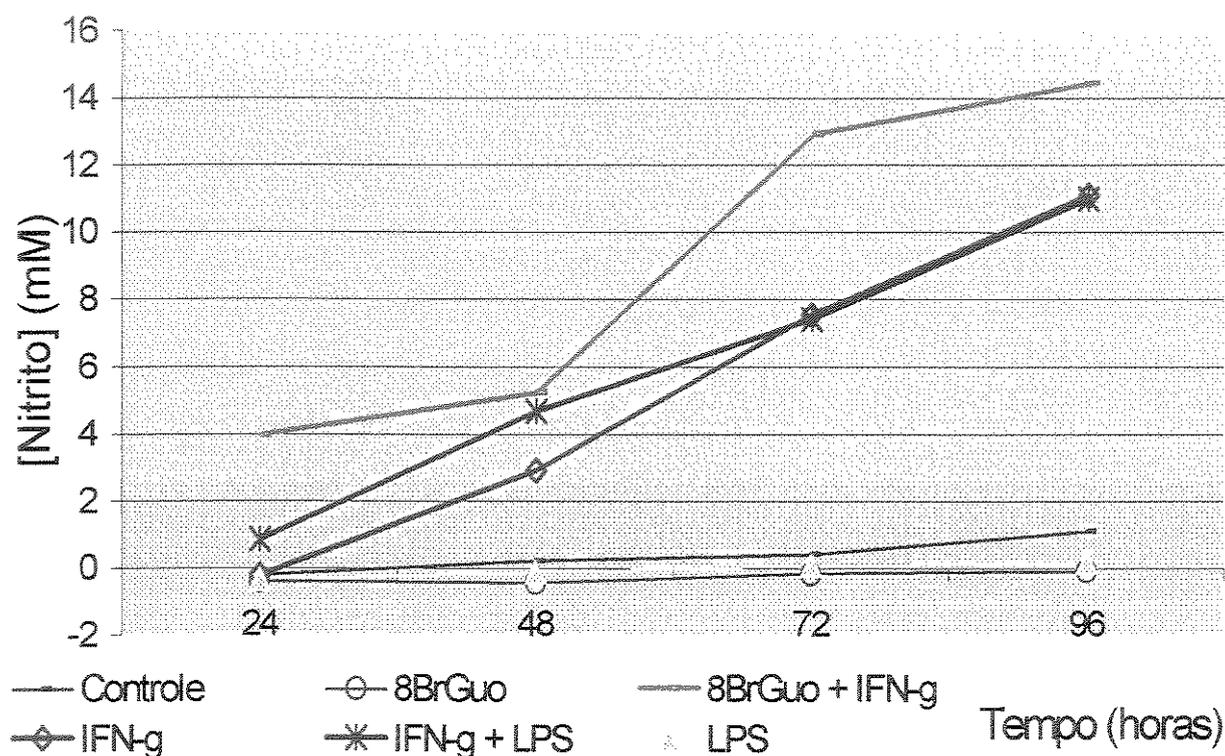


Figura 5: Dosagem de nitrito em sobrenadantes de culturas primárias de macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e posteriormente tratadas. Após 24 horas, da infecção, as culturas foram tratadas com: 8BrGuo (0,3mg/mL), 8BrGuo (0,3mg/mL) + IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL) + LPS (20pg/mL) e LPS (20pg/mL). Os sobrenadantes foram coletados 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento e a concentração de nitrito foi medida pelo método de Griess.

Como é possível verificar o comportamento das curvas de concentração de nitrito foi muito semelhante aos resultados anteriores, sem infecção (figura 4).

As culturas estimuladas por 8BrGuo não produziram aumento na concentração de nitrito, mas o mesmo composto em contato com IFN- γ potencializou a produção desse intermediário de nitrogênio (figuras 4 e 5).

CULTURAS TRATADAS E POSTERIORMENTE INFECTADAS

Nas culturas tratadas com 8BrGuo antes de serem infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, verificamos novamente a semelhança no comportamento das curvas de concentração de nitrito em relação as culturas não infectadas e infectadas antes dos tratamentos (figuras 4, 5 e 6).

As concentrações de nitrito mantiveram-se elevadas nos grupos que receberam IFN- γ , IFN- γ + LPS e IFN- γ + 8BrGuo, e a baixa concentração de nitrito foi observada nas culturas que não continham IFN- γ (figura 6).

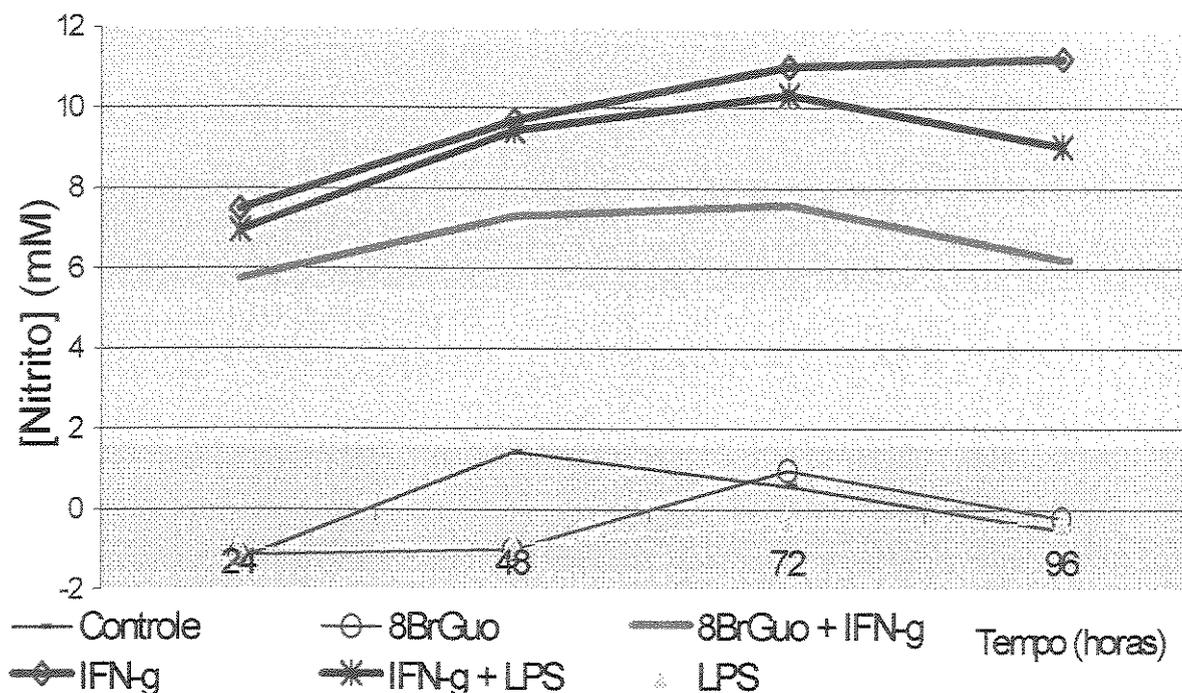


Figura 6: Dosagem de nitrito em sobrenadantes de culturas primárias de macrófagos peritoneais murinos tratados e, posteriormente, infectados por *L. (L.) amazonensis*. Após 24 horas do tratamento com: 8BrGuo (0,3mg/mL), 8BrGuo (0,3mg/mL) + IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL), IFN- γ (100UI/mL) + LPS (20pg/mL) e LPS (20pg/mL). As culturas foram infectadas com amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os sobrenadantes foram coletados 24, 48, 72 e 96 horas após a infecção e a concentração de nitrito foi medida pelo método de Griess.

INVESTIGAÇÃO *in vivo*

Um dos principais objetivos deste trabalho foi averiguar o efeito terapêutico da 8BrGuo em camundongos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

AVALIAÇÃO DAS VIAS DE TRATAMENTO COM 8BrGuo EM CAMUNDONGOS BALB/c

Inicialmente realizamos testes a fim de analisar a via mais eficiente para o tratamento da leishmaniose murina com 8BrGuo. Assim sendo, inoculamos 8BrGuo em animais BALB/c, linhagem susceptível a *L. (L.) amazonensis*, pelas vias intraperitoneal (ip), intravenosa (iv), intramuscular (im) e subcutânea (sc). Nos primeiros testes observamos a letalidade do composto em cada modo de aplicação (tabela I).

Tabela I: Taxa de mortalidade em função da via de inoculação da 8BrGuo.

Via de Aplicação	Taxa de Mortalidade
*Intramuscular (n=4)	50%
*Intraperitoneal (n=8)	62,5%
#Intraperitoneal (n=4)	0%
*Subcutânea (n=4)	100%

* Animais BALB/c, sadios, receberam 3mg de 8BrGuo (equiv. $150\text{mgkg}^{-1}\text{dia}^{-1}$) diluído (solução A) em NaOH (0,5N), com pH em torno de 10.

Animais BALB/c receberam 3mg de 8BrGuo (equiv. $150\text{mgkg}^{-1}\text{dia}^{-1}$) em suspensão com solução salina (suspensão A).

Os resultados mostraram que a injeção de 8BrGuo em solução pela via iv é tóxica (100%). Observou-se mortalidade poucas horas após os animais receberem o composto e alterações nos rins durante necrópsia (dados não mostrados). Assim, não testamos outras doses do composto utilizando esta via.

Em relação às vias im, ip e sc a injeção de 8BrGuo em solução (suspensão A), sem correção do pH, provocou mortalidade de 50%, 62,5% e 100% dos animais

respectivamente" (tabela I).[^] Acreditamos que nesses experimentos o composto em solução causou sérios danos teciduais devido ao pH básico, próximo de 10. Quando utilizamos a via ip com o composto em suspensão, este não mostrou-se tóxico e, a taxa de mortalidade foi igual a zero (tabela I).

Na figura 7 observa-se o desenvolvimento das lesões nos camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com 8BrGuo em suspensão pela via ip. Não observamos sinais de diminuição das lesões, a pequena queda na 8^a semana não foi estatisticamente significativa e as lesões voltaram a mostrar aumento, encerrando o acompanhamento com dimensões iguais aos controles que não receberam 8BrGuo (figura 7).

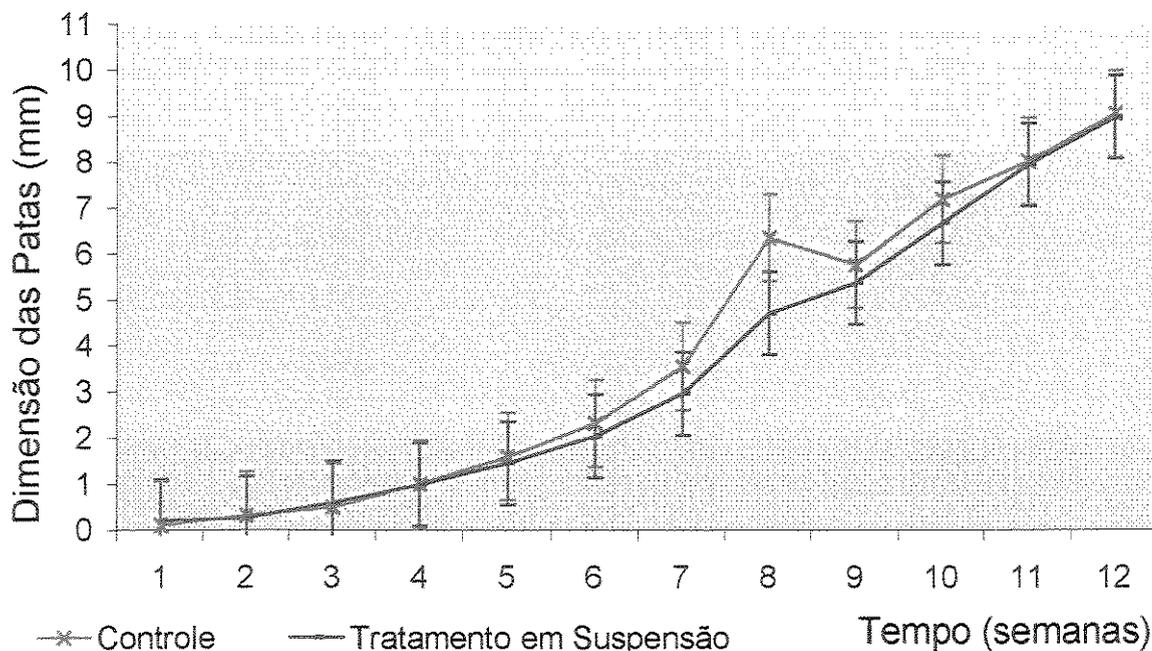


Figura 7: Crescimento das lesões desenvolvidas em camundongos BALB/c. Foram inoculados 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no coxim da pata traseira esquerda subcutaneamente. Uma semana depois, os animais do grupo tratado, receberam 3 aplicações ip em suspensão de 3mg de 8BrGuo (suspensão A), em dias alternados e o grupo controle recebeu apenas salina.

AVALIAÇÃO DAS VIAS DE TRATAMENTO EM CAMUNDONGOS CBA/J

Após estes testes iniciais revisou-se a literatura e a maioria dos animais utilizados para testes *in vivo* com 8BrGuo e, outros compostos da família dessa guanosina, não eram de animais da linhagem BALB/c mas CBA/J (Ojo-Amaize *et al*, 1990; Goodman *et al*, 1995). Sendo assim, confirmamos então a suscetibilidade destes animais a *L. (L.) amazonensis* e observamos a similaridade no desenvolvimento das lesões comparadas aos camundongos BALB/c, já descrito por outros autores (Giorgio, 1989; Pérez *et al*, 1978 e 1979) (figura 8).

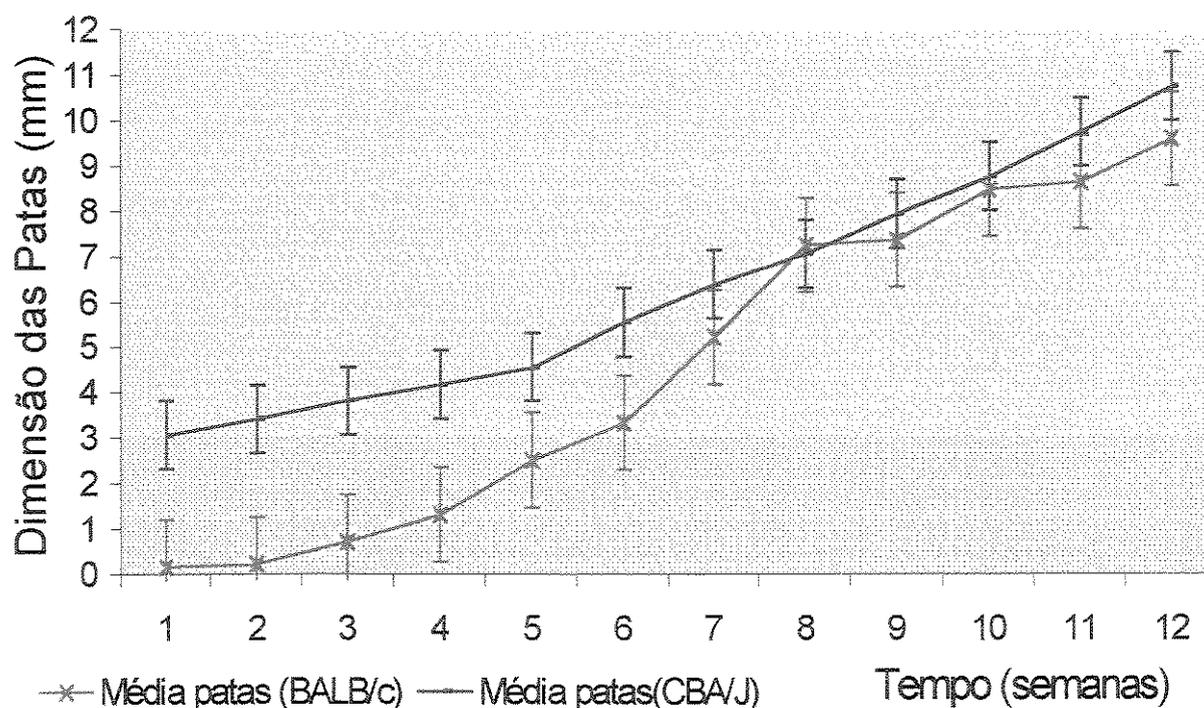


Figura 8: Crescimento das lesões desenvolvidas em camundongos das linhagens BALB/c e CBA/J, em semanas. Foram inoculados 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* no coxim plantar da pata traseira esquerda subcutaneamente.

De posse dos animais CBA/J realizamos um outro experimento piloto, semelhante ao anterior com BALB/c (tabela I), aplicando 3 doses de 8BrGuo, de 2mg ou 3mg, pelas vias ip em suspensão (suspensão A), sc em solução (solução A) e, também, 3mg pela via ig em suspensão (suspensão A). O gráfico de sobrevivência dos animais de acordo com a via e doses recebidas mostra a sucessão das mortes de acordo com a dose e o tempo decorrido da aplicação (figura 9).

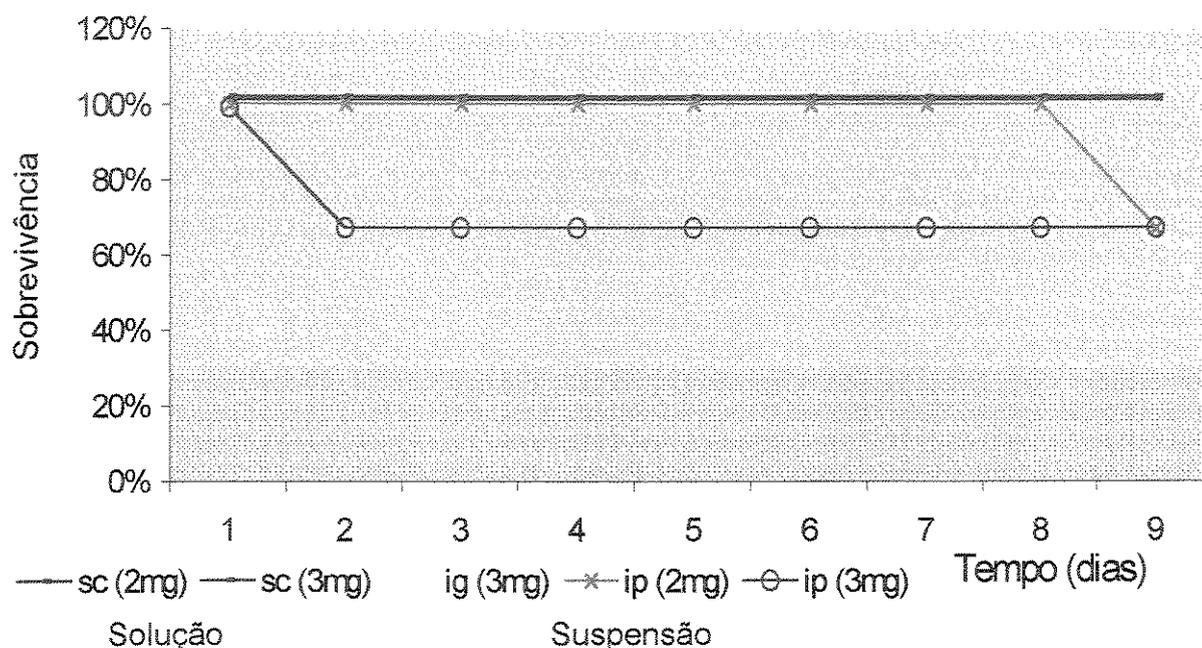


Figura 9: Sobrevivência (em dias) de camundongos CBA/J a diferentes vias e doses de tratamento. Animais com idade entre 7 e 19 semanas receberam 2 ou 3mg de 8BrGuo pelas vias ip e ig, num volume total de 200 μ L, e pela via sc 40 μ L.

Observa-se que apesar da letalidade da via sc para BALB/c o mesmo não ocorre com os animais da linhagem CBA/J, os quais mostraram maior resistência ao tratamento visto que a mortalidade diminuiu em todas as vias testadas e comparadas (figura 9).

Também é possível inferir que existe uma relação entre a dose e a via de administração de 8BrGuo nos animais, uma vez que a via ip mostrou que logo após a 1ª dose de 3mg um animal morreu enquanto foram necessárias 3 doses de 2mg pela mesma via para haver uma morte.

ACOMPANHAMENTO DAS LESÕES DOS ANIMAIS CBA/J TRATADOS ANTES DA INFECÇÃO

Com estes animais testados, que receberam 8BrGuo e sobreviveram, inoculamos amastigotas de *L. (L.) amazonensis* a fim de acompanhar e avaliar o desenvolvimento das lesões. E, testar a possibilidade deste composto ser utilizado no tratamento preventivo, de maneira similar ao realizado em tratamentos antes da infecção nos testes *in vitro* (figura 3).

As figuras 10, 11 e 12 ilustram graficamente o desenvolvimento das lesões nos tratamentos com 8BrGuo pelas vias sc, ip e ig, respectivamente.

TRATAMENTO COM 8BRGUO PELA VIA SUBCUTÂNEA ANTES DA INFECÇÃO

A finalidade desta via de tratamento foi testar a possibilidade da ação local de 8BrGuo, assim, limitar-se-ia os efeitos colaterais do composto. Entretanto, provavelmente devido ao pH extremamente básico da solução, formaram-se lesões iniciais no local da aplicação, que rapidamente regeneraram.

Este tratamento mostrou-se eficaz com relação aos parâmetros delimitados, isto é, segundo o teste "t" de Student existe uma diferença significativa entre o grupo controle e o tratado com 8BrGuo com um $\alpha = 0,05$. Além de retardar a ulceração das patas infectadas em relação ao período de aparecimento das mesmas em animais controle (figuras 10a e 10b).

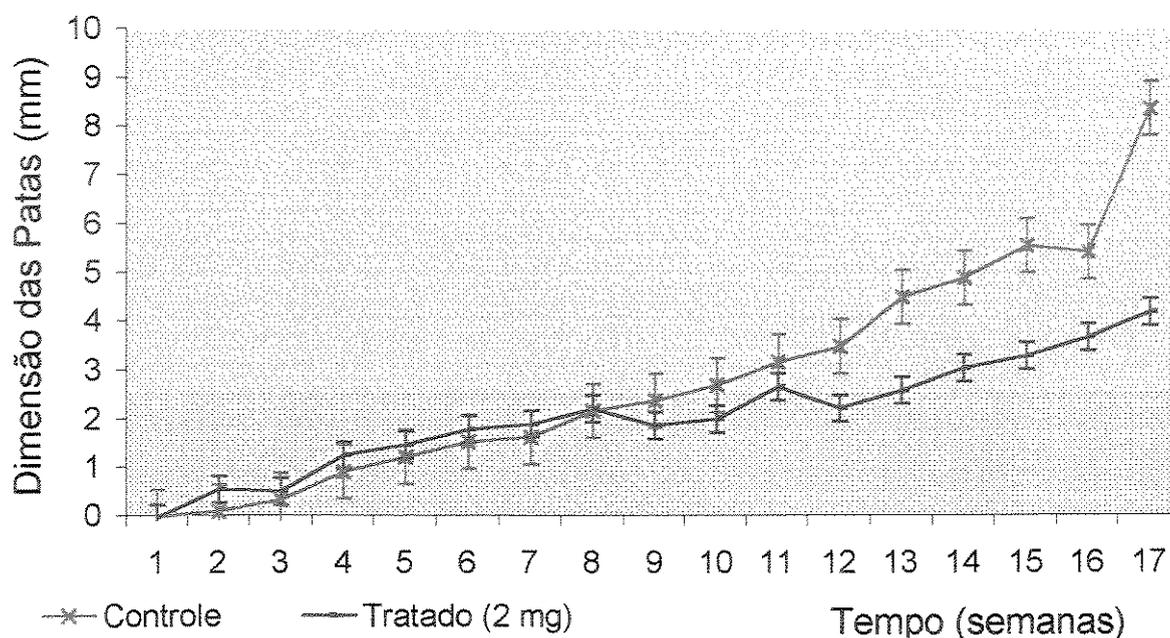


Figura 10a: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J anteriormente tratados com 2mg (100mg.kg^{-1}) pela via subcutânea. Os animais que haviam recebido 3 doses de 2mg de 8BrGuo (solução A) foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* pela via subcutânea no coxim da pata traseira esquerda.

Verifica-se a menor dimensão das lesões em cada um dos animais do grupo tratado em relação a todos os animais do grupo controle.

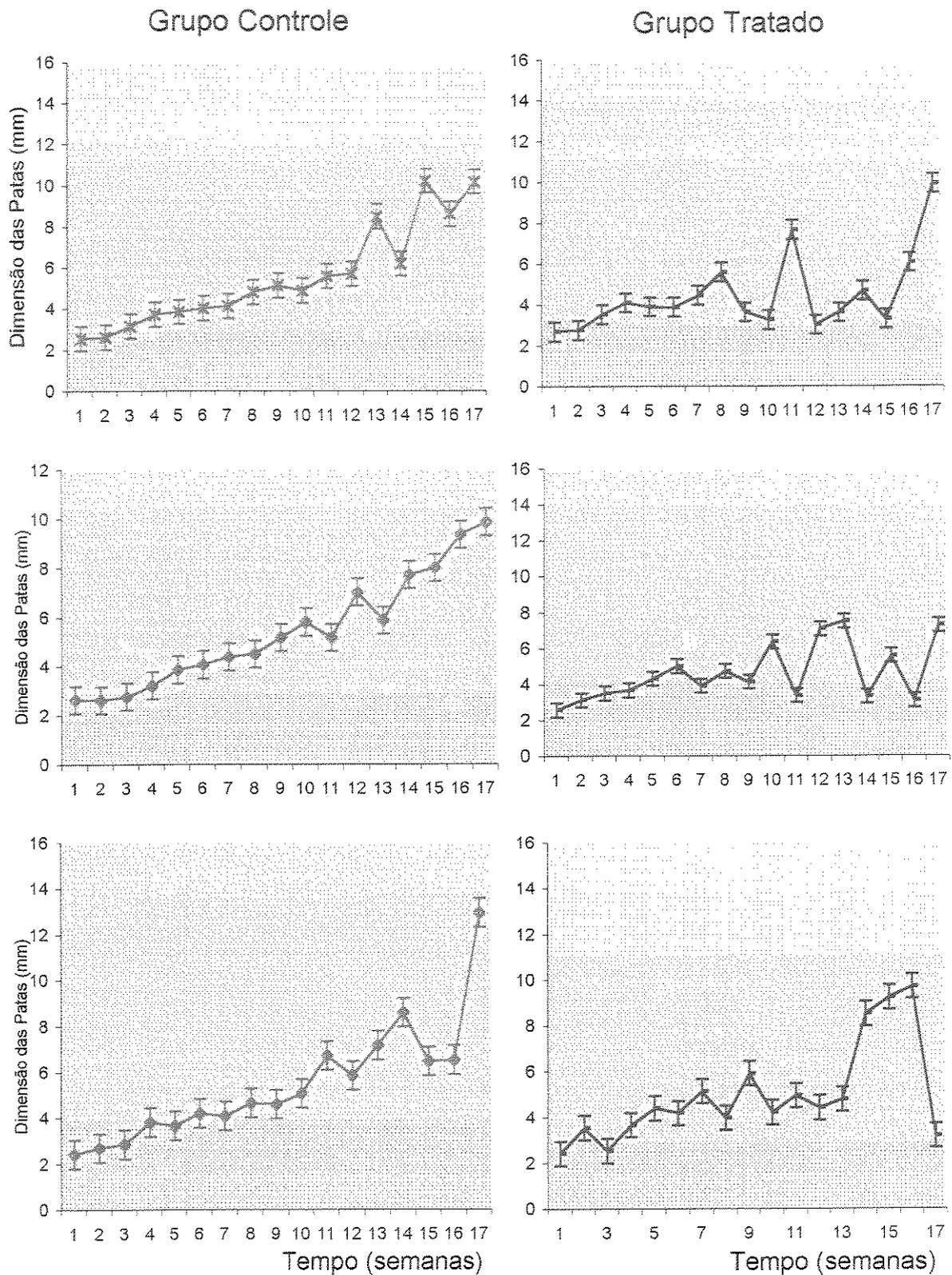


Figura 10b: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J anteriormente tratados com 2mg ($100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) pela via subcutânea. Curvas individualizadas de cada animal por 17 semanas.

TRATAMENTO COM 8BRGUO PELA VIA INTRAPERITONEAL ANTES DA INFEÇÃO

Este tratamento mostrou diminuição estatisticamente significativa em relação ao grupo controle até a 16ª semana. Entretanto na 17ª semana os valores das médias, entre as dimensões das patas infectadas, dos animais tratados em relação aos animais controle apresentaram, praticamente, o mesmo valor. O que demonstra não ser eficaz na diminuição das lesões. Mas, como no tratamento sc, as úlceras surgiram apenas na 15ª semana, quando o edema apresentava quase duas vezes superior aos das patas do grupo controle quando ulceravam (figura 11).

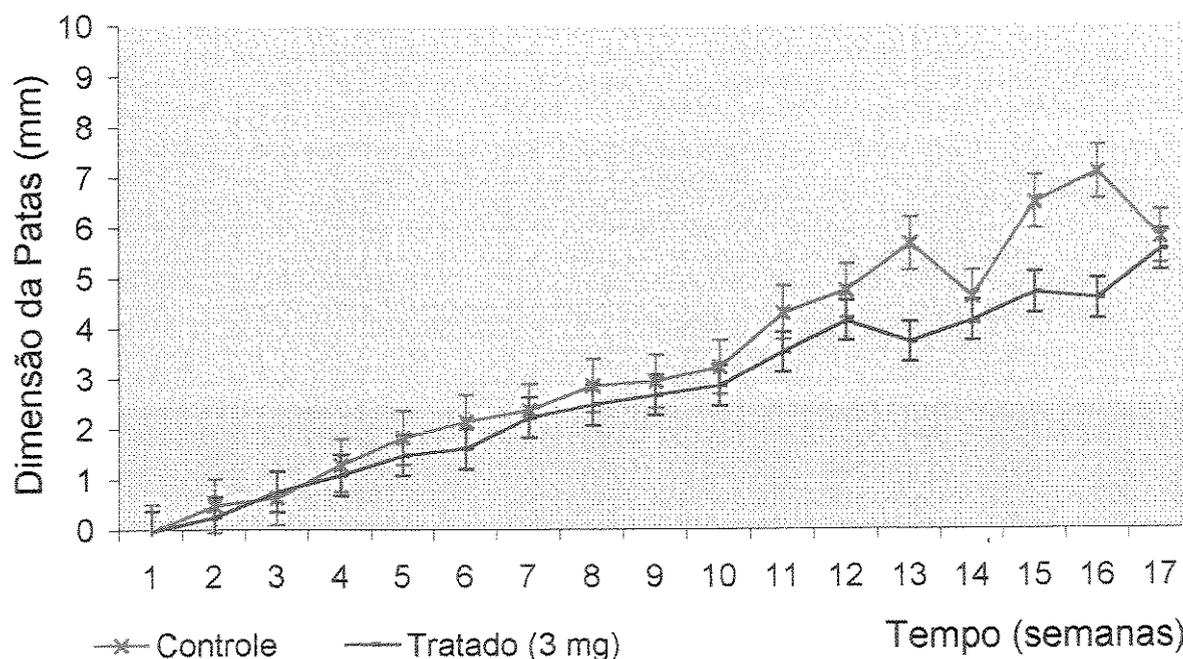


Figura 11: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J anteriormente tratados com 3mg ($150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) pela via intraperitoneal. Os animais que haviam recebido 3 doses de 3mg de 8BrGuo (suspensão A), foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* sc no coxim da pata traseira esquerda.

TRATAMENTO COM 8BRGUO PELA VIA INTRAGÁSTRICA ANTES DA INFECÇÃO

Como é possível verificar a via intragástrica não proporcionou diminuição das lesões nas patas infectadas em relação ao grupo controle (figura 12). Também não houve diferenças na formação de úlceras.

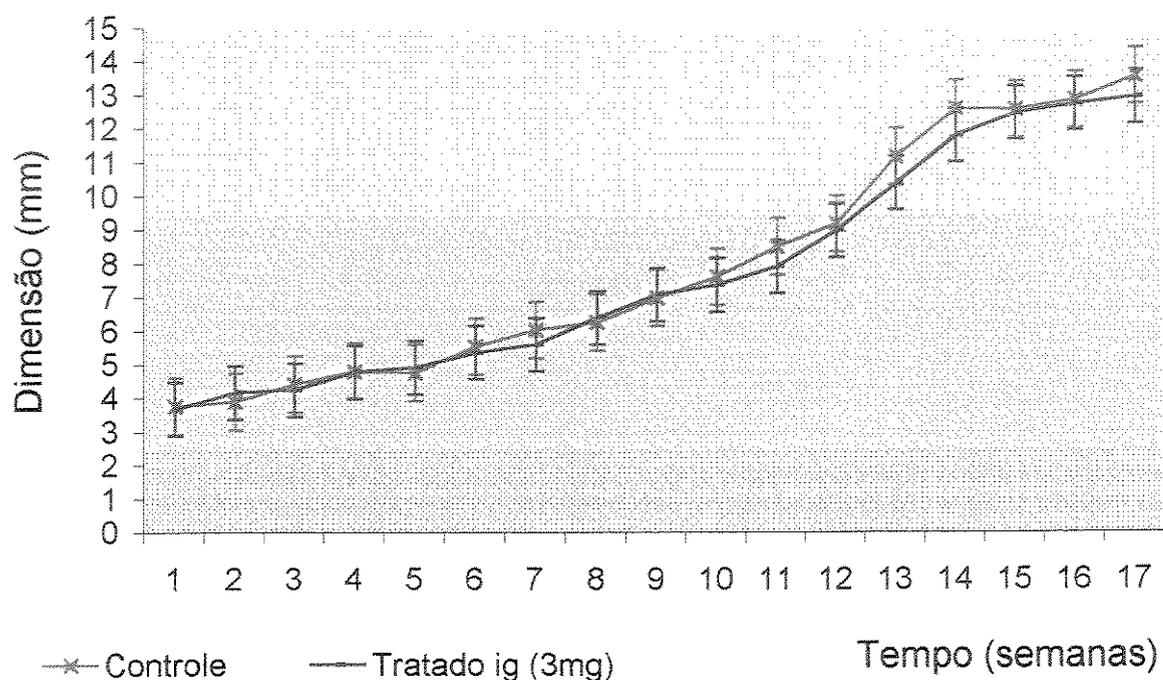


Figura 12: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J anteriormente tratados com 3mg ($150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) pela via intragástrica. Os animais que haviam recebido 3 doses de 3mg de 8BrGuo (suspensão A), foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* subcutaneamente no coxim da pata traseira esquerda.

ACOMPANHAMENTO DAS LESÕES EM CAMUNDONGOS CBA/J TRATADOS COM 8BRGUO APÓS A INFECCÃO COM AMASTIGOTAS DE *L. (L.) amazonensis*

Uma vez que os resultados anteriores (figuras 10 e 11), com os tratamentos aplicados antes da infecção por amastigotas de *L. amazonensis*, nas vias subcutânea e intraperitoneal apresentaram-se satisfatórios, estas vias foram utilizadas nos tratamentos após a infecção. Neste testes realizamos diferentes esquemas (métodos, posologia) de tratamentos, a fim de avaliar e otimizar a ação da 8BrGuo na terapêutica da leishmaniose murina.

TRATAMENTO COM 8BRGUO PELA VIA SUBCUTÂNEA APÓS A INFECCÃO

Uma vez que os animais que receberam o tratamento subcutâneo antes da infecção (figura 10) mostraram diminuição das lesões, testamos o tratamento após a infecção utilizando um "esquema" prolongado (Materiais e Métodos - esquema 5).

Os resultados obtidos neste tratamento mostraram que as lesões não diminuíram e sim aumentaram nos animais que receberam 8BrGuo em relação ao grupo controle. Acreditamos, que neste caso o aumento deva-se a repetidas aplicações do composto e a injúria provocada pela agulha na pata dos camundongos (figura 13).

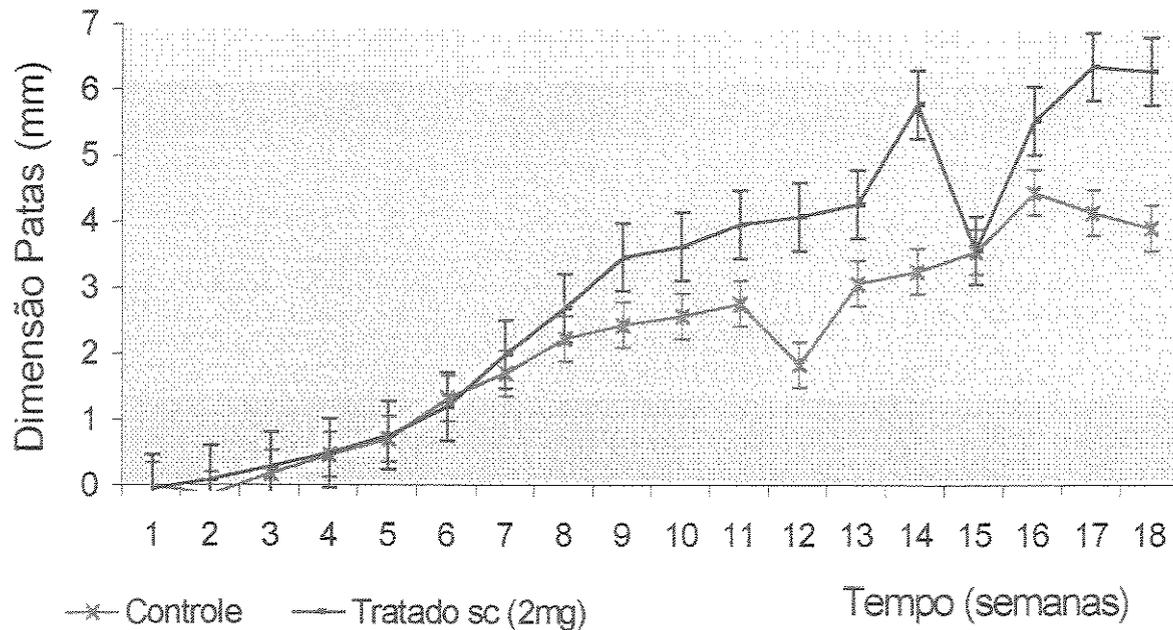


Figura 13: Crescimento das lesões de camundongos CBA/J tratados com 2mg de 8BrGuo pela via subcutânea. Os animais foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Quatro dias após a inoculação dos parasitas, os animais receberam doses de 2mg de 8BrGuo (solução A) sc, em 3 aplicações por uma semana, em dias alternados e, outras 4 semanais.

TRATAMENTOS COM 8BRGUO PELA VIA INTRAPERITONEAL APÓS A INFECÇÃO

8BRGUO EM SUSPENSÃO COM SOLUÇÃO SALINA - TRATAMENTO CURTO

Realizamos testes comparativos com 8BrGuo em suspensão apenas com salina, sem diluição e correção de pH (suspensão A). Também preparamos um grupo tratado com Glucantime®, tratamento convencional, para melhor comparação entre os resultados (figura 14).

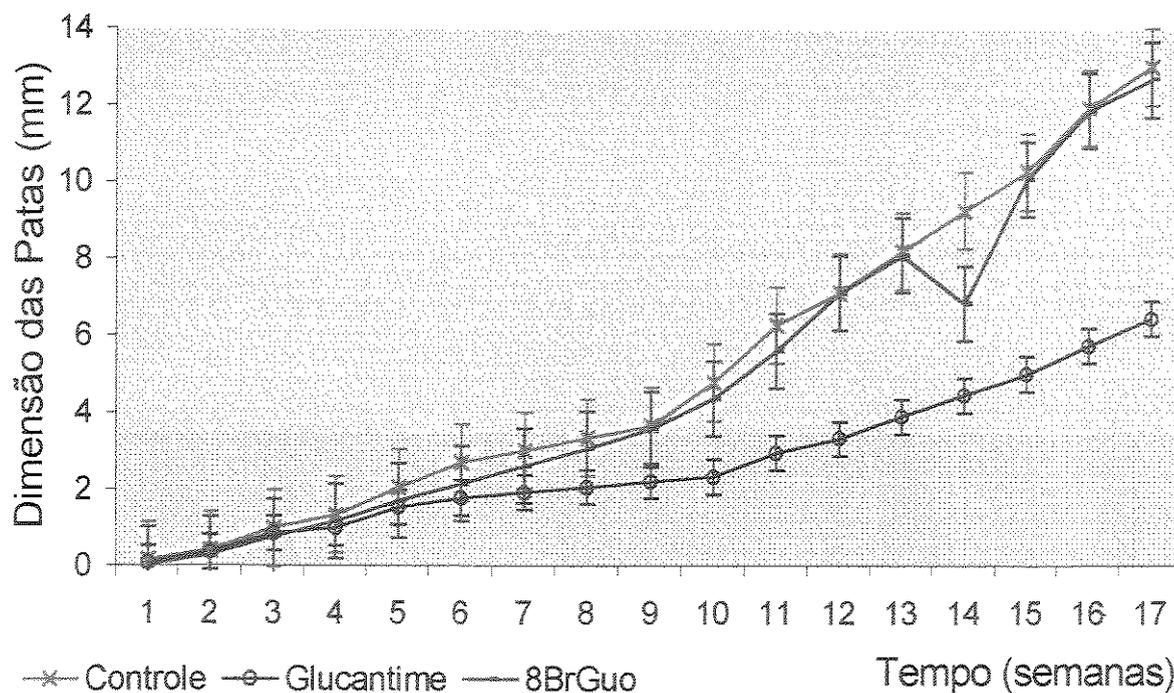


Figura 14: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J tratados com 8BrGuo pela via intraperitoneal. Camundongos com 6 semanas foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* pela via subcutânea. Quatro dias após a inoculação dos parasitas, os animais receberam, em dias alternados, 3 aplicações de 3mg de 8BrGuo em suspensão com salina (suspensão A) pela via intraperitoneal, de acordo com o esquema de tratamento curto (Materiais e Métodos - esquema 4).

Estes resultados (figura 14) mostram que não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e tratado com 8BrGuo (3 doses de 3mg ip em suspensão). Como esperado houve uma diferença estatisticamente significativa entre o controle e o tratado com Glucantime[®]. O tratamento convencional com Glucantime[®] mostrou redução nas dimensões das lesões, em relação ao controle, sem apresentar a cura da infecção, o que era esperado, visto que o tratamento com este composto em humanos é de 20 a 28 dias. Assim pode-se extrapolar tal raciocínio e inferir que é possível propor um tratamento prolongado com 8BrGuo.

8BRGUO EM SUSPENSÃO COM CORREÇÃO DE PH - TRATAMENTO LONGO

Apesar de realizar controles dos grupos tratados com 8BrGuo em solução, isto é, diluído em NaOH sem correção de pH, e verificar que os animais controles não morreram em virtude da basicidade de meio, as tentativas de correção do pH continuaram até um êxito parcial. Nos próximos experimentos foi utilizado 8BrGuo diluído em NaOH com pH corrigido com HCl, para aproximadamente 7,0. Isto ocasionou uma alteração na concentração de NaCl e a precipitação do composto, formando uma nova suspensão, com granulometria menor que a inicial. Esta suspensão será denominada suspensão B.

Como o resultado anterior com 8BrGuo não mostrou qualquer melhora nas lesões (figura 14), novos experimentos foram propostos com novas doses e nova apresentação de 8BrGuo. Os animais, previamente infectados, foram tratados com 8BrGuo, recebendo um número maior de doses de 2mg em suspensão com salina (suspensão A) e com o pH corrigido (suspensão B), seguindo o esquema longo de tratamento (Materiais e Métodos - esquema 5) (figura 15).

Neste caso foi verificado novamente a toxicidade nos animais tratados com 8BrGuo apresentada sob a forma de suspensão B, pois dos 5 animais iniciais apenas 2 resistiram às 3 primeiras aplicações, enquanto o grupo que recebeu a suspensão A não apresentou óbitos (dados não mostrados). Apesar da perda dos animais, do grupo suspensão B, continuou-se a acompanhar os sobreviventes desse grupo por 17 semanas (figura 15). A falta de animais ainda inviabilizou a análise estatística deste grupo.

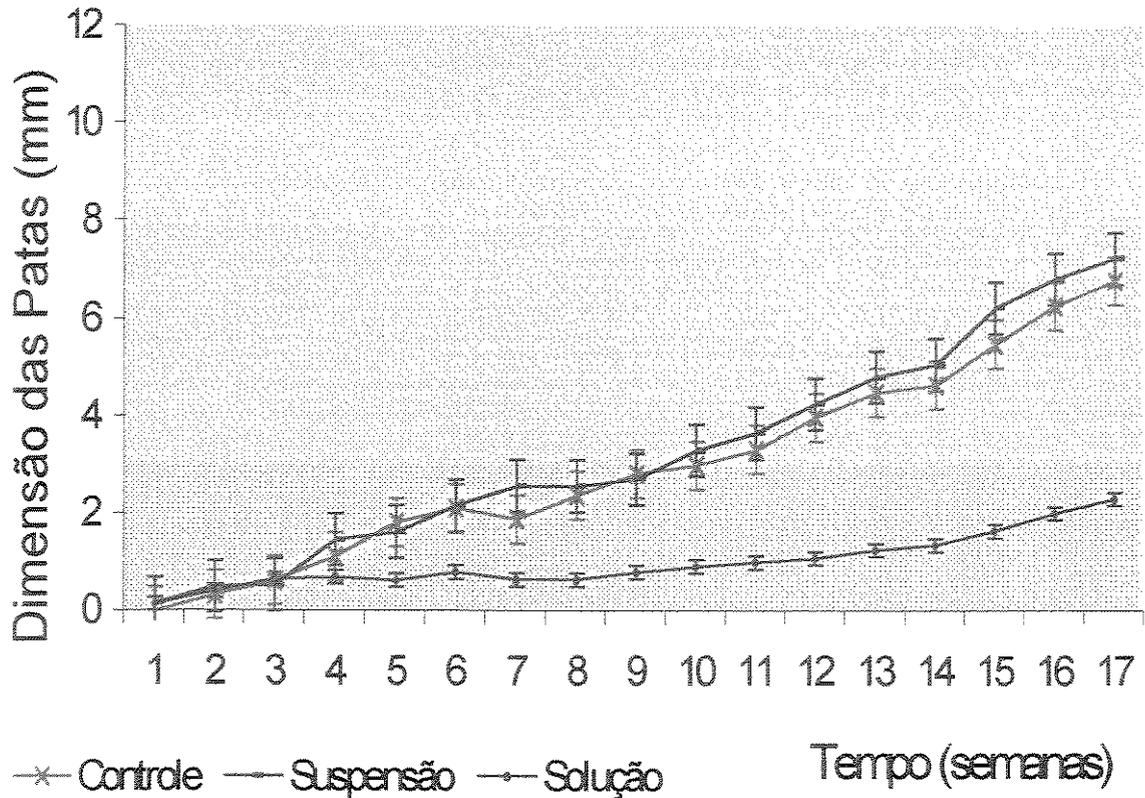


Figura 15: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J tratados com 2mg de 8BrGuo pela via intraperitoneal. Camundongos CBA/J com 6 semanas foram infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis* pela via subcutânea. Quatro dias após a inoculação dos parasitas, os animais receberam doses de 2mg de 8BrGuo via intraperitoneal, em 3 aplicações por uma semana, em dias alternados e, outras 4 semanais por um mês segundo o esquema longo de tratamento (Materiais e Métodos - esquema 5).

O grupo tratado com a suspensão A não mostrou qualquer diminuição das lesões tampouco diferença estatística em relação ao controle (figura 15). Mas, a diminuição da infecção sugerida pelos animais do grupo suspensão B indicavam a possibilidade de melhora na composição do tratamento e a obtenção de um resultado satisfatório.

Com os resultados obtidos nos experimentos anteriores entre a forma de apresentação da 8BrGuo, e ainda buscando alternativas para amenizar a ação da 8BrGuo e a melhora da correção do pH, procuramos um adjuvante ou excipiente para acrescentar na composição do nosso tratamento.

Utilizamos o Tween 80[®] e após os testes observamos que 8BrGuo diluída e acrescida deste composto mantinha o pH em torno de 9 e, após o acréscimo de HCl ocorria apenas uma turvação do meio. Esta nova apresentação de 8BrGuo foi denominada suspensão C.

8BRGUO COM TWEEN 80[®] - TRATAMENTO CURTO

Um novo grupo de animais foi infectado com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratado com 8BrGuo acrescida de Tween 80[®]. Os resultados foram os melhores até então obtidos. O grupo de animais que recebeu o tratamento apresentou uma diferença estatisticamente significativa na dimensão das patas com a aplicação de apenas 3 doses de 3mg (figura 16). O desenvolvimento de lesões também foi retardado. Enquanto todos os animais do grupo controle apresentavam úlceras de grandes dimensões, no grupo tratado com 8BrGuo apenas 2 animais mostravam pequenas ulcerações cujo crescimento mostrou-se mais lento que em animais sem tratamento (figura 16a). Na figura 16b observam-se os dados das dimensões das patas de cada camundongo dos grupos.

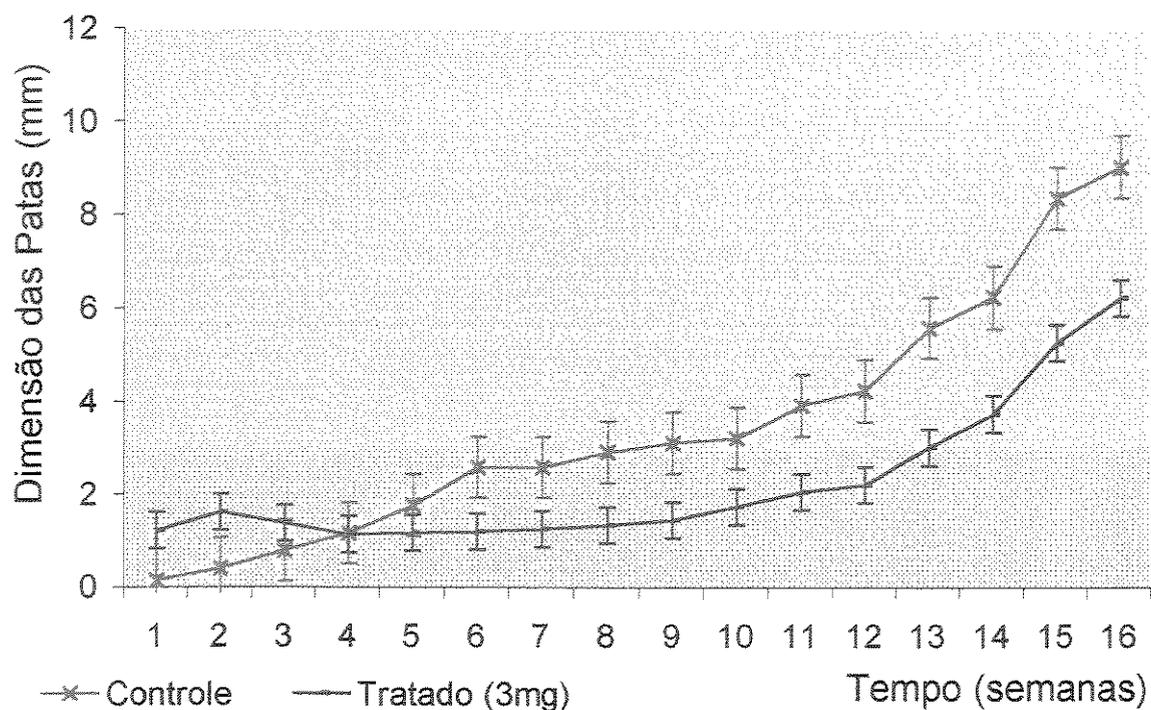


Figura 16a: Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J com 6 semanas infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Quatro dias após a inoculação dos parasitas, os animais receberam 3mg de 8BrGuo via intraperitoneal, em 3 aplicações por uma semana em dias alternados, segundo o esquema curto de tratamento (Materiais e Métodos - esquema 4).

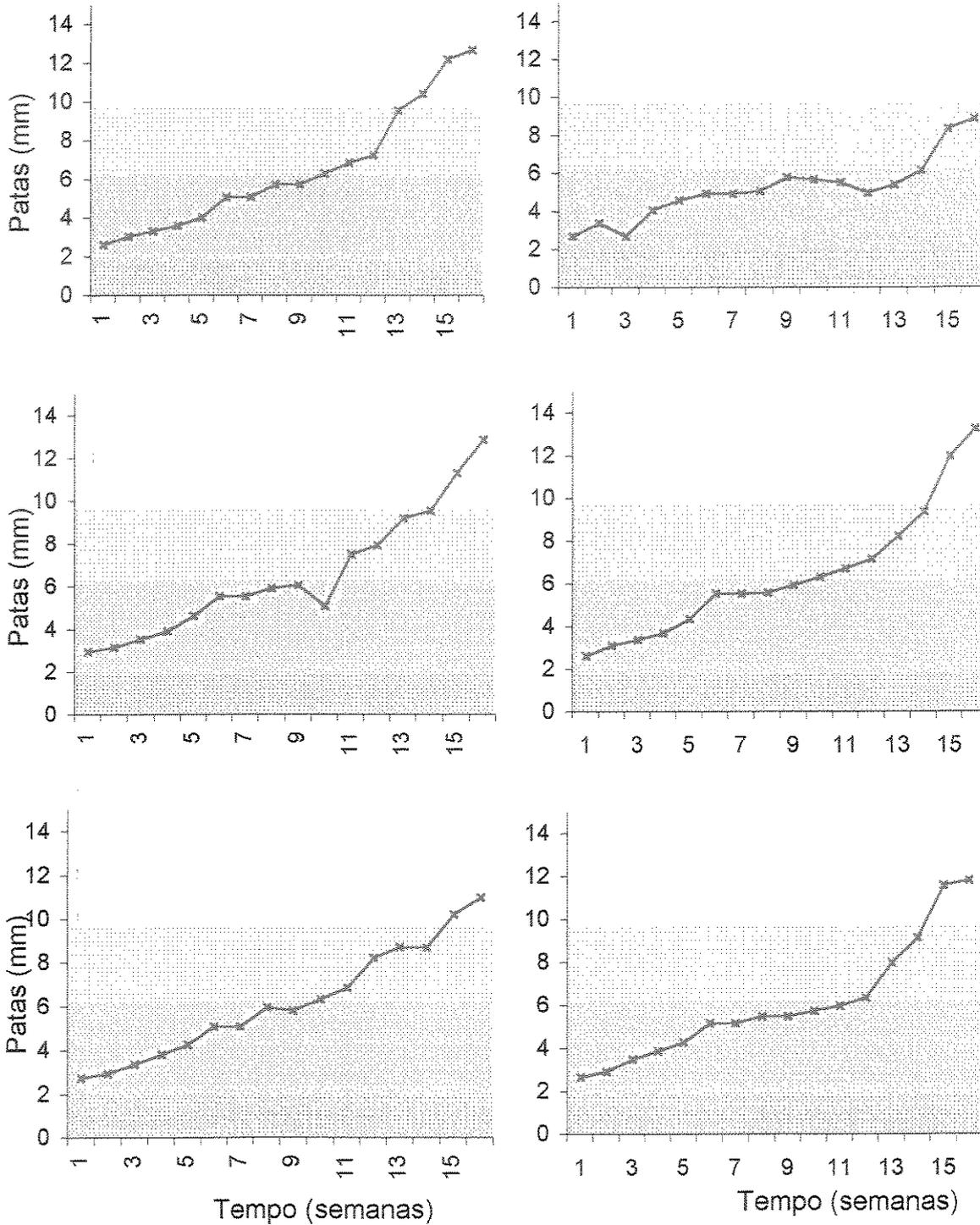


Figura 16b: Grupo Controle. Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J com 6 semanas infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Curvas individualizadas de cada animal por 17 semanas.

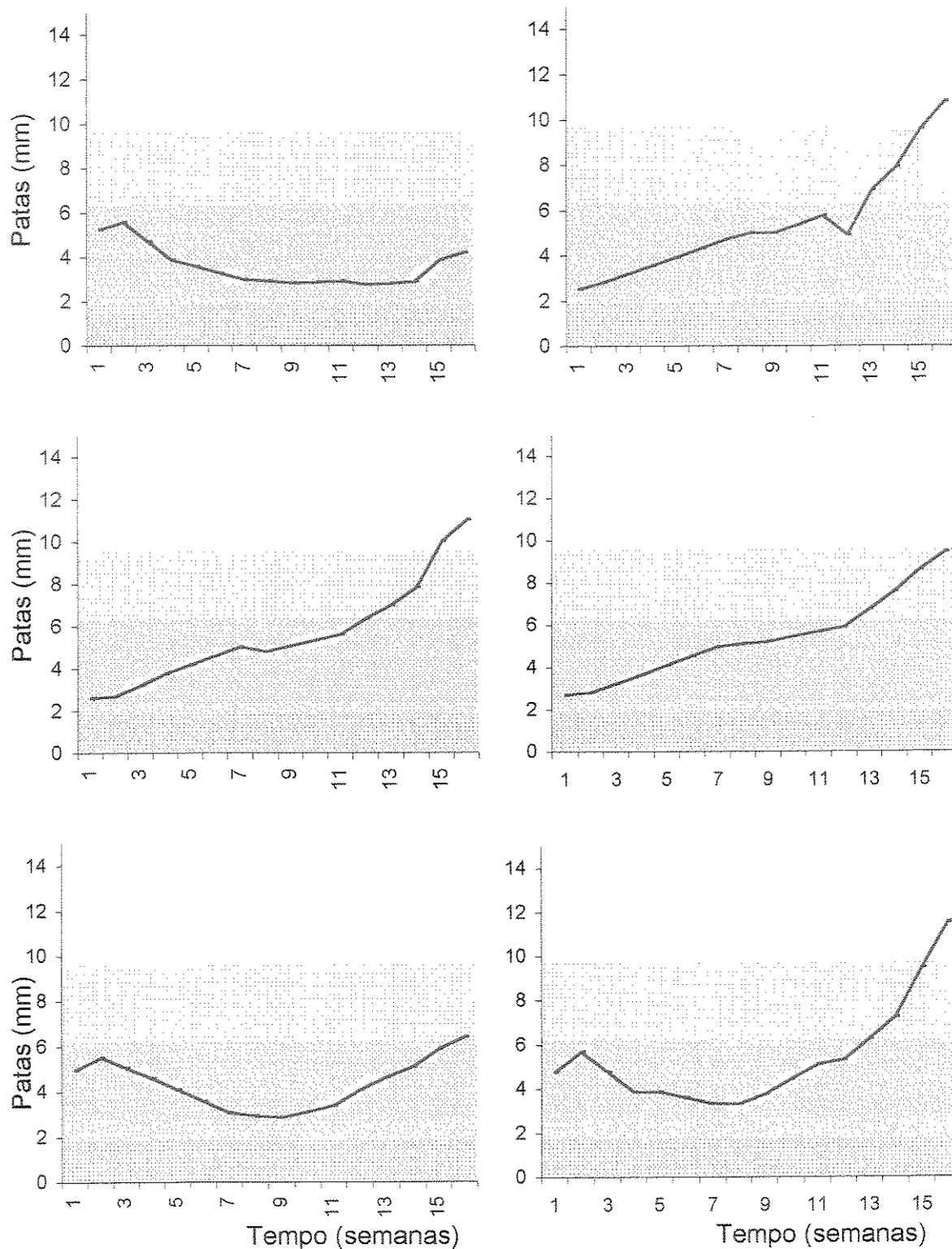


Figura 16c: Grupo Tratado. Crescimento das lesões dos camundongos CBA/J com 6 semanas infectados com 5×10^5 amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Curvas individualizadas de cada animal por 17 semanas.

INVESTIGAÇÃO HISTOLÓGICA DO EFEITO DE 8BRGUO EM CAMUNDONGOS

Como os resultados finais são promissores quanto a eficácia da 8BrGuo no tratamento da leishmaniose murina (figura 15) e, com a finalidade de investigar a possível causa das mortes dos animais tratados via intraperitoneal com 3mg na suspensão A, entre outras, realizamos o mesmo tratamento em animais saudáveis. Estes camundongos foram utilizados para investigação histológica hepática (figura 17) e renal (figura 18), devido as funções detoxificadoras destes órgãos, bem como baço (figura 19), uma vez que o composto atua sobre linfócitos.

Para tanto, realizamos o tratamento dos animais com 3 doses de 3mg em suspensão, com pH corrigido, em dias alternados e os dividimos em 2 grupos, um utilizado 24 horas após o terceiro tratamento, o outro foi mantido por 60 dias para então ser sacrificado a fim de examinar o aspecto histológico dos órgãos.

Após as primeiras aplicações intraperitoneais notamos um discreto aumento das placas de Peyer, que também chamou a atenção para um olhar mais cauteloso (dados não mostrados).

Apesar de algumas diferenças entre os resultados acreditamos que não houve alterações teciduais, sendo que tais diferenças ocorreram, provavelmente, devido a artefatos de técnica provocados, principalmente, pela perfusão dos animais.

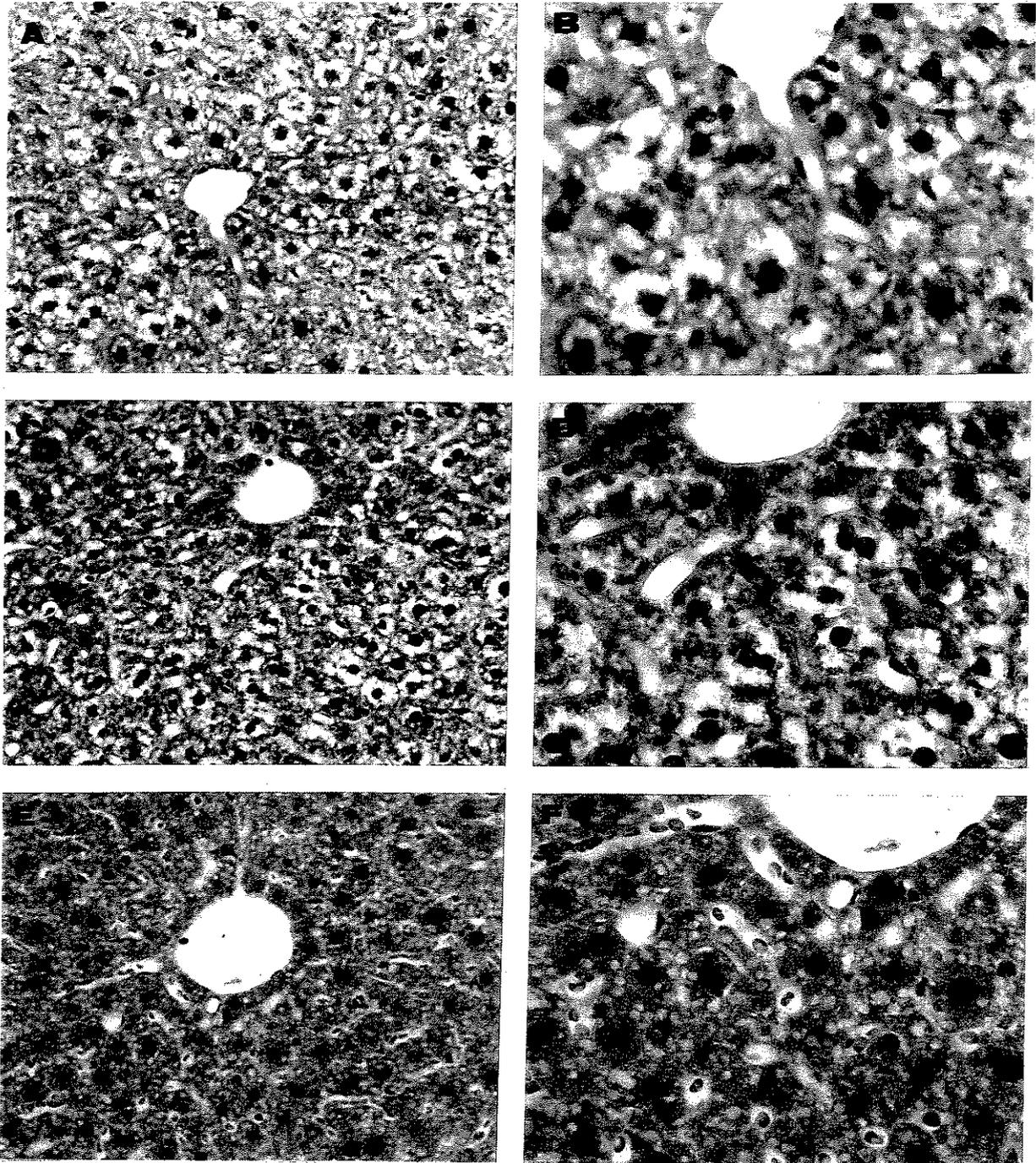


Figura 17: Fotomicrografias de tecido hepático de camundongos CBA/J . Animais 24 horas após receberem apenas placebo. A) Aumento 100X; B) Aumento 400 X. Animais 24 horas após receberem tratamento de 3 doses de 3mg de 8BrGuo. C) Aumento 100X; D) Aumento 400 X. Animais 60 dias após receber o tratamento. E) Aumento 100X; F) Aumento 400 X.

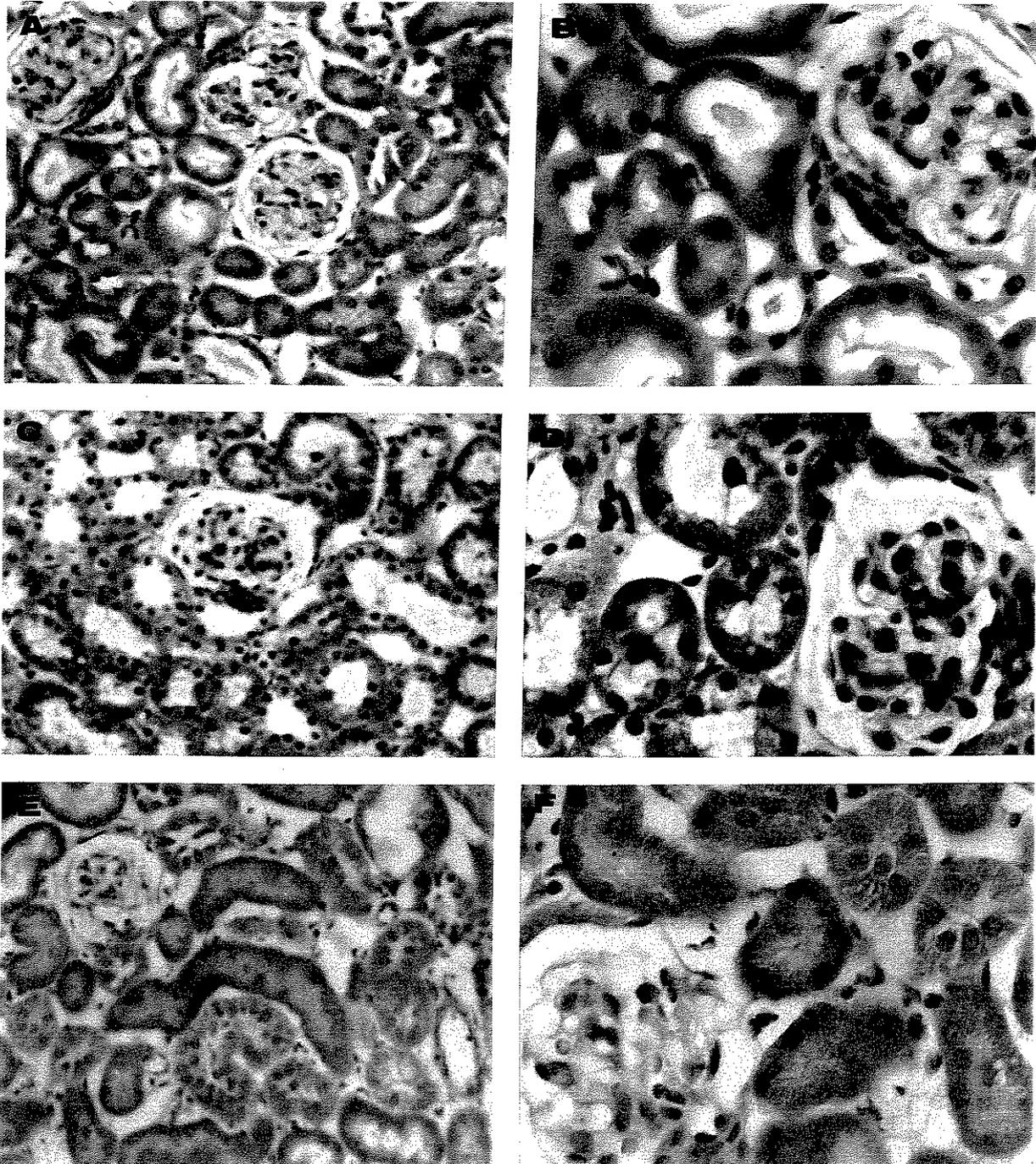


Figura 18: Fotomicrografias de tecido renal de camundongos CBA/J. Animais 24 horas após receberem apenas placebo. A) Aumento 100X; B) Aumento 400 X. Animais 24 horas após receberem tratamento de 3 doses de 3mg de 8BrGuo. C) Aumento 100X; D) Aumento 400 X. Animais 60 dias após receber o tratamento. E) Aumento 100X; F) Aumento 400 X.

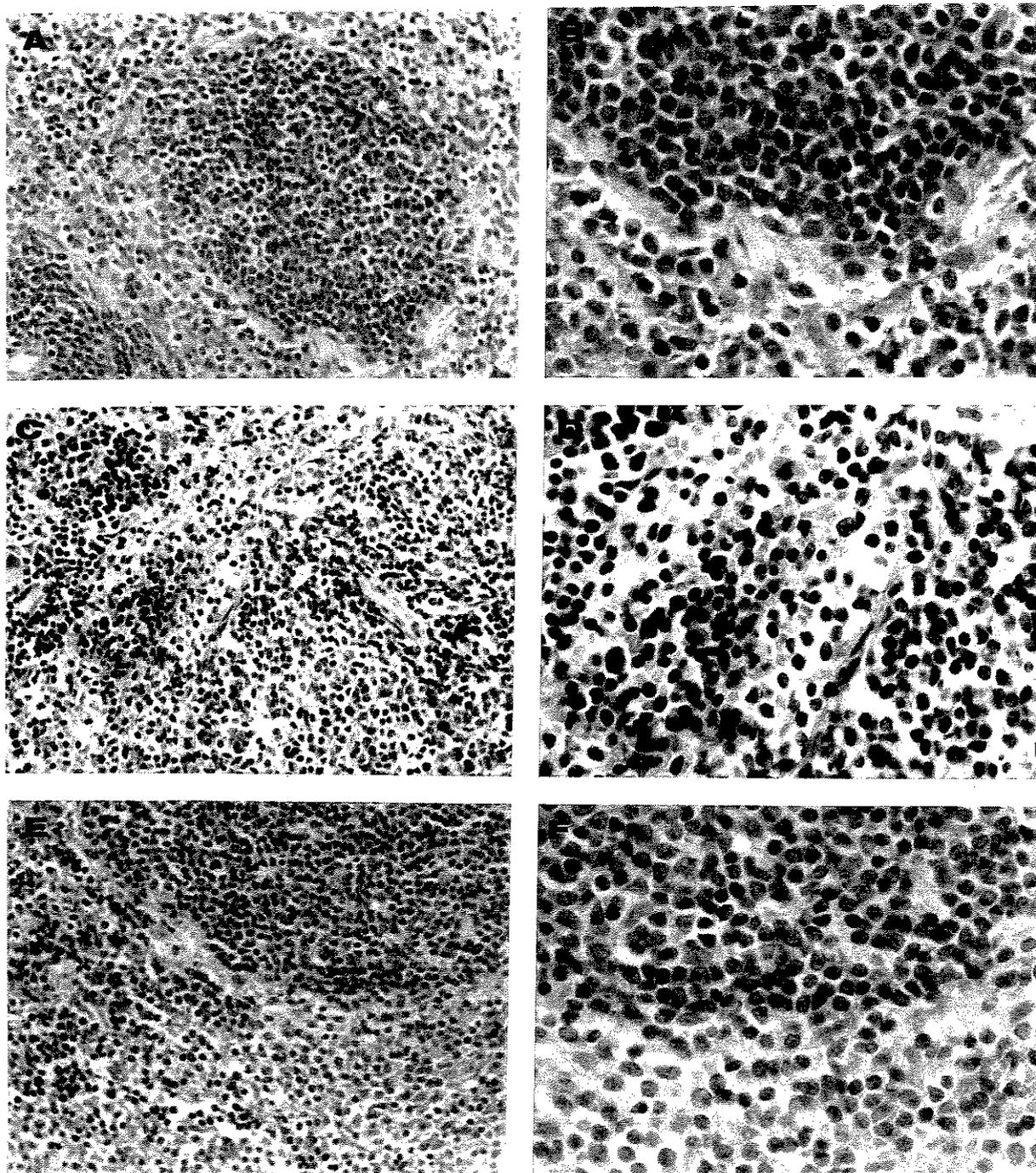


Figura 19: Fotomicrografias de tecido esplênico de camundongos CBA/J. Animais 24 horas após receberem apenas placebo. A) Aumento 100X; B) Aumento 400 X. Animais 24 horas após receberem tratamento de 3 doses de 3mg de 8BrGuo. C) Aumento 100X; D) Aumento 400 X. Animais 60 dias após receber o tratamento. E) Aumento 100X; F) Aumento 400 X.

INVESTIGAÇÃO ENZIMÁTICA E HEMATOLÓGICA DO EFEITO DE 8BRGUO EM CAMUNDONGOS

Similarmente, tratamos outro grupo com 3 doses de 1mg/animal por via intraperitoneal, com 8BrGuo e Tween 80®, em dias alternados. Um grupo recebeu apenas uma dose e foi eutanasiado para coleta do sangue 24 horas após a aplicação; um segundo grupo recebeu as 3 doses, sendo retirado o sangue após 60 dias.

Tabela II: Dosagens Enzimáticas. Resultados das dosagens de enzimas marcadoras de danos teciduais de camundongos CBA/J *

Exame	Controle	Tratado com 8BrGuo (1 dose de 1mg)	Controle	Tratado com 8BrGuo (3 doses de 1mg)
Uremia	50 mg/dL	61 mg/dL	58 mg/mL	68 mg/dL
TGO	104 U/L	17 U/L	88 U/L	82 U/L
TGP	45 U/L	37 U/L	35 U/L	32 U/L

* Camundongos com idade entre 6 e 12 semanas receberam 3 doses equivalentes a 1mg de 8BrGuo diluída em NaOH (0,5N), acrescido de salina e Tween 80® e com o pH corrigido com HCl. A 8BrGuo foi aplicada pela via intraperitoneal em dias alternados (Materiais e Métodos - esquema 4). A coleta de sangue foi realizada 24 horas após o 1° e o 3° tratamentos em frascos de coleta específicos e mantidas resfriadas até a análise.

TGO = Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP = Transaminase Glutâmico-Pirúvica

As dosagens foram realizadas com um "pool" de sangue de 5 a 6 camundongos.

Tabela III: Hemograma Completo. Resultados do hemograma completo de camundongos CBA/J *

	Controle	Tratado com 8BrGuo (1 dose de 1mg)	Controle	Tratado com 8BrGuo (3 doses de 1mg)	
Eritrócitos	8,1	7,8	8,3	8,2	milhões/mm ³
Hemoglobina	12,8	12,8	12,8	13,0	G/DL
Hematócrito	37%	37%	37%	38%	
V.C.M.	45,67	47,43	45,00	46,9	fL
H.B.C.M.	15,80	16,41	15,30	15,80	Pg
C.H.B.C.M.	34,59	34,59	34,00	33,00	G/dL
Leucócitos	2,2	2,5	2,1	2,3	mil/mm ³
Bastonetes	0%	0%	1%	1%	
Segmentados	12%	21%	18%	12%	
Eosinófilos	0%	0%	0%	0%	
Basófilos	0%	0%	0%	0%	
Linfócitos	84%	72%	75%	78%	
Monócitos	4%	7%	6%	9%	
Plaquetas	627	717	804	844	K/uL

* Camundongos com idade entre 6 e 12 semanas receberam 3 doses equivalentes a 1mg de 8BrGuo diluída em NaOH (0,5N), acrescido de salina e Tween 80[®] e com o pH corrigido com HCl. A 8BrGuo foi aplicada pela via intraperitoneal em dias alternados (Materiais e Métodos - esquema 4). A coleta de sangue foi realizada 24 horas após o 1^o e o 3^o tratamentos em frascos de coleta específicos com anticoagulante e mantidas resfriadas até o laboratório.

VCM = volume corpuscular médio

HBCM = hemoglobina corpuscular média

CHBCM = razão entre VCM e HBCM

Os resultados da tabela II mostraram que, aparentemente, as funções renais foram preservadas após o tratamento com 8BrGuo. Os valores de uréia em torno de 61-68 mg/dl nos animais tratados foram considerados normais e, semelhantes aos valores encontrados em animais controle.

Em relação a dosagem de TGO observou-se elevados níveis desta enzima nas amostras tanto no grupo tratado com 3 doses (82 U/L) quanto nos controles (104 e 88 U/L) sugerindo a hemólise provocada pelo método utilizado para a coleta do sangue. Assim estes resultados foram descartados.

Os valores verificados na dosagem de TGP foram normais (32 a 45 U/L) para animais tratados e controle, indicando que não ocorreu danos hepáticos em nenhum dos tratamentos, 1 ou 3 doses, com 8BrGuo (tabela II).

Em relação aos dados dos hemogramas completos (tabela III) observou-se que as quantidades totais de hemoglobina, a V.C.M., a H.B.C.M. e a C.H.B.C.M. não apresentam nenhuma diferença entre os grupos tratados com 8BrGuo e os controles. E, a quantidade de eritrócitos, leucócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos, monócitos, plaquetas semelhante para os animais tratados e controle.

Podemos assim concluir que dosagens de 1 a 3mg de 8BrGuo via ip não afetam, significativamente, hemácias, nem a concentração de hemoglobina, tampouco o número de células que circulam no sangue.

DISCUSSÃO

Este projeto idealizou testes de 8BrGuo na infecção de macrófagos por *Leishmania (L.) amazonensis*, fundamentado em dados obtidos por Goodman e Weigle (1981; 1982b; 1983c; 1984a; 1985a), entre outros, a respeito da capacidade imunoestimuladora dessa substância sobre linfócitos, da capacidade ativadora de macrófagos e células NK (Koo *et al*, 1988) e da ativação do "burst" oxidativo em macrófagos descrito por Ojo-Amaize e colaboradores (1989/1990).

Experimentos iniciais *in vitro* mostraram que 8BrGuo não altera a proliferação de promastigotas em cultura, em relação ao grupo controle, ou seja, promastigotas mantidos apenas com o meio de cultura e diluente (Giorgio & Barão, 1998). Assim podemos afirmar que o composto não é tóxico aos parasitas na forma promastigota. Entretanto, para testar o efeito de 8BrGuo diretamente sobre a forma amastigota de *Leishmania* seria necessário cultivá-la axenicamente. Esta cultura axênica exige controle rígido das condições de temperatura e pH, sendo que amastigotas necessitam de pH ácido (entre 4,5 e 6,0), com intervalos que variam entre as diferentes espécies. A alteração das variáveis temperatura e pH agem diretamente sobre a expressão gênica deste organismo (Zilberstein & Shakira, 1994). O composto 8BrGuo, assim como a guanosina, é solúvel apenas em ácidos ou bases fortes (The Index Merck, 1983), portanto, após a adição do composto ao meio de cultura dos parasitas haveria a alteração do pH desta cultura e conseqüentemente tornariam-se inviáveis ou seriam destruídos.

A avaliação de macrófagos sadios sob o tratamento de 8BrGuo mostrou alteração morfológica, semelhante àquelas que caracterizam macrófagos ativados, como aumento de volume e vacúolos. Além disso foi possível comprovar que não houve alteração da viabilidade dos macrófagos tratados com 8BrGuo, o que demonstra que este composto pode ser utilizado como ativador nas culturas infectadas com *L. (L.) amazonensis* (figura 2a e 2b).

Os resultados obtidos mostraram diminuição significativa do parasitismo das culturas tratadas com 8BrGuo tanto antes (58%) quanto após (89%) a infecção com as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* (figuras 3a e 3b). Cantos e colaboradores (1993) também obtiveram bons resultados ao utilizar manana conjugada com antimoniato, eliminando aproximadamente 90% dos parasitas nas culturas de macrófagos (Cantos *et al*, 1993). Durante investigações a respeito dos mecanismos de adesão da forma amastigota Love e colaboradores (1993), verificaram que a presença de heparina inibiu em mais de 90% a fagocitose do parasita por células CHO-K1. Além disso, Barbiéri e colaboradores (1993) desenvolveram um anticorpo monoclonal (1C3) com capacidade de inibir, parcialmente, a entrada de qualquer uma das formas (tanto de amastigotas quanto de promastigotas) de *L. (L.) amazonensis* em macrófagos murinos. Os percentuais de redução da infecção alcançados com 8BrGuo não mostraram eficácia superior a manana conjugada com antimoniato ou a heparina. É importante notar que, doses e tempo de tratamento, utilizados não foram suficientes para provocar o desaparecimento dos parasitas nas culturas, mas a redução de 58% e 87% nas culturas que receberam 8BrGuo antes e após a infecção (figura 3), respectivamente, foi bastante satisfatória para dar continuidade as investigações *in vivo*.

Testou-se, ainda, diferentes doses de 8BrGuo, a fim de corroborar dados de Goodman e colaboradores (Goodman & Weigle, 1983d; Goodman, 1988b; Scheuer *et al*, 1985b) sobre a ação dose dependente do composto em linfócitos, e não macrófagos, como é o caso deste estudo. Notamos que a infecção por *L. (L.) amazonensis* apresentou diferentes I.F.s em relação às doses e aos protocolos de tratamento antes e após a infecção (figuras 3a e 3b; esquemas 2 e 3). Confirmou-se que há ação dose dependente em macrófagos, sendo que a melhor dose para o tratamento antes da infecção foi de 0,3mg/mL (0,87mM), enquanto que para o tratamento após a infecção foi 0,75mg/mL (equivalente a 2mM) (figura 3). Os melhores resultados obtidos com o tratamento antes da infecção (0,87mM) mostram proximidade com a dose em testes com linfócitos (1mM) descritos por Goodman e Weigle (1983d) e, por Wolfert e colaboradores (1984) ou ainda com macrófagos e células NK (Koo *et al*, 1988). A concentração de 8BrGuo em culturas previamente infectadas foi aproximadamente o dobro das que receberam o tratamento antes da infecção. Estes resultados podem indicar uma prévia ativação dos macrófagos, que estariam estimulados e prontos para a produção de compostos tóxicos assim que fossem infectados. E, ainda, que os macrófagos tratados posteriormente necessitam de maior estímulo, portanto dose maior, para iniciar a produção destes compostos leishmanicidas uma vez que estariam previamente inibidos pelo parasita (Proudfoot *et al*, 1996; Giorgio *et al*, 1998; Mossalayi *et al*, 1999).

Uma vez comprovada a capacidade imunestimuladora da 8BrGuo *in vitro* em macrófagos infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, iniciou-se a investigação sobre o possível mecanismo da ativação e conseqüentemente da destruição dos parasitas. Uma vez que é conhecido o papel do NO na resposta efetiva

contra a infecção por *Leishmania* sp (Green *et al*, 1990a) dosamos as concentrações de nitrito, um dos metabólitos de óxido nítrico, nos sobrenadantes de culturas com os mesmos protocolos descritos anteriormente (esquemas 1, 2 e 3). Os resultados mostraram que 8BrGuo não provocou alteração na produção basal de espécies reativas de nitrogênio, em culturas de macrófagos não infectadas (figura 4), quando comparada com o grupo controle (figura 4). Mas a 8BrGuo juntamente com o IFN- γ mostrou uma produção acima da obtida através da ativação clássica de IFN- γ + LPS (Green *et al*, 1990b; Bogdan *et al*, 1997).

Com relação aos níveis de nitrito nos sobrenadantes das culturas que receberam o tratamento após a infecção observou-se um perfil semelhante às culturas não infectadas (figura 5). Contudo, o mesmo não foi verificado com as culturas previamente tratadas que apresentaram menor concentração de nitrito nos sobrenadantes de culturas com 8BrGuo e IFN- γ em relação a ativação clássica (IFN- γ + LPS) (figura 6).

Estes resultados sugerem que 8BrGuo sozinho não é eficiente na indução de NO, entretanto, este composto potencializa a ação de IFN- γ nos experimentos *in vitro*. Apesar deste perfil mostrar que os resultados reproduziram outros anteriores, a maior indagação não foi respondida pois as culturas de macrófagos que receberam 8BrGuo, apresentaram diminuição significativa da infecção e não mostraram aumento da concentração de nitrito nos sobrenadantes.

A resposta poderia estar na produção de espécies reativas de oxigênio. Ojo-Amaize e colaboradores (1989/1990) demonstraram aumento do "burst" oxidativo de macrófagos murinos tratados com derivados mono e bi-substituídos de guanosina.

Apesar de Scheuer e colaboradores (1985a) descreverem testes *in vivo*, as doses utilizadas por estes pesquisadores eram extremamente elevadas, 10 a 25mg de 8BrGuo por animal, equivalendo a 500mg/kg a 1250mg/kg. Enquanto Pope e colaboradores (1994) obtiveram a diminuição das dimensões e do número de tumores pulmonares provocados por células B16 em camundongos, C57Bl/6J e C57Bl/6J-bg/bg, com 3 doses de 2 ou 3mg de Loxoribine® por animal. Assim, com base nas doses e no esquema de tratamento descritos por Pope e colaboradores (1994), iniciou-se a fase de experimentação *in vivo* em animais infectados por amastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Contudo, verificou-se um elevado índice de mortalidade dos camundongos BALB/c após os tratamentos e trocou-se pela linhagem CBA/J, mais utilizada nos testes *in vivo* com esta família de compostos (Goodman & Weigle, 1983d; Scheuer *et al*, 1985a; Koo *et al*, 1988; Pope *et al*, 1993b; Pope *et al*, 1994). Em experimentos realizados para avaliar a resistência dos animais ao tratamento com 8BrGuo verificamos que a linhagem CBA/J é mais resistente ao contrário da linhagem BALB/c. Em seguida confirmamos a suscetibilidade desta linhagem de camundongos à infecção por *L. (L.) amazonensis* (figura 8).

Utilizando os mesmos animais tratados, pelas vias sc e ip, testamos a capacidade do composto em prevenir o desenvolvimento de lesões decorrentes da infecção posterior ao tratamento. Deste modo, infectamos os animais e acompanhamos o desenvolvimento das lesões destes grupos. O grupo que recebeu a 8BrGuo pela via subcutânea antes da infecção, na dose de $100\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{dia}^{-1}$, mostrou resultados estatisticamente significativos, dentro dos parâmetros previamente estabelecidos, o aumento do edema provocado pela infecção e o crescimento das úlceras mostrou-se mais lento que dos animais pertencentes ao grupo controle (figura 10). O mesmo não

foi verificado no tratamento subcutâneo após a infecção (figura 13). Este tratamento ocasionou o aumento das lesões, possivelmente, devido ao trauma provocado pelas aplicações de 8BrGuo por um período longo (esquema 5), na pata já infectada, exacerbando a resposta irritativa na pele e conseqüentemente a infecção. A resposta positiva dos animais tratados pré-infecção pode ser conseqüência do desenvolvimento de imunidade destes animais, de forma semelhante a observada por Goodman e Weigle (1983d) com a administração de 8BrGuo antes da inoculação de um antígeno, verificando aumento da resposta imune à suspensão de eritrócitos de carneiro em camundongos CBA/Caj e por Scheuer e colaboradores (1985a) ao aumentarem a resposta *in vivo* para antígenos protéicos em camundongos A/J pré-tratados com 8BrGuo (Scheuer *et al*, 1985b). Estes fatos mostram que 8BrGuo é um ativador de resposta imune humoral primária (Scheuer *et al*, 1985a), induzindo a proliferação de linfócitos B e aumentando a produção de anticorpos específicos (Goodman & Weigle, 1983d). Fedbush & Ballas (1985) também observaram que 8MeGuo, outro composto derivado por monosubstituição da guanosina, tem capacidade de induzir diferenciação de linfócitos T. E, Scheuer e colaboradores (1985b) sugerem que existe um mecanismo indireto de ação de 8BrGuo sobre linfócitos T através de macrófagos.

Fundamentados na solubilidade da 8BrGuo em ácidos e bases fortes, idealizamos o tratamento pela via intragástrica, correspondente ao uso oral de medicamentos. Supomos a ação do suco gástrico para diluir o composto e este ser absorvido pelo trato digestivo, por transporte simples, devido ao seu baixo peso molecular (Goodman & Weigle, 1983d). Entretanto, esse tratamento não apresentou qualquer diminuição nas lesões dos camundongos infectados (figura 12).

O tratamento intraperitoneal apresentou facilidades, como a possibilidade de administrar maior volume de solução e a utilização de agulhas de maior calibre, melhorando a acuidade da dosagem oferecida. Scheuer e colaboradores (1985a) realizaram testes para avaliar as vias de administração e, entre a intraperitoneal, subcutânea e oral, a que apresentou melhores respostas aos estímulos foi a intraperitoneal (Scheuer *et al*, 1985a). O mesmo nem sempre foi observado em nossos experimentos, visto que o tratamento pela via sc antes da infecção mostrou bons resultados. Mas o melhor resultado obtido até o momento foi pela via ip após a infecção (figura 16), com resultados reproduzidos em novo experimento (dados não mostrados).

Entretanto, Scheuer e colaboradores (1985a; 1985b) empregaram a carboximetilcelulose para o preparo de 8BrGuo. Uma vez que já estávamos utilizando Tween 80[®] como componente do tratamento realizamos uma análise teórica estabelecendo comparações entre estes dois compostos a fim de compreender a função de cada um dos adjuvantes. A carboximetilcelulose é utilizada como espessante, em resinas para tintas, adesivos, indústria têxtil quanto como colóide protetor e estabilizante de alimentos (The Merck Index, 1983). A carboximetilcelulose tem uma variedade de utilizações farmacêuticas para suspender, adensar e emulsionar, bem como agente desintegrante e no revestimento de comprimidos; e também como um ingrediente de proteção em preparações para ulcerações orais, periorais e estomacais (Martindale, 1996). Mas não é utilizada na formulação de injetáveis, apesar de Scheuer e colaboradores (1985a) terem-na utilizado nesta apresentação.

Na busca de um componente que aumentasse o tempo de absorção de 8BrGuo quando injetado pela via ip, optou-se pelo Tween 80[®]. Este composto é um polioxietil-N-sorbitan, que contém 70% de ácido oléico (Sigma, 2000), com uma parte da estrutura

hidrofóbica e outra extremidade hidrofílica, tendo assim a capacidade de formar micelas na presença de NaOH ou KOH (Lehninger, 1993). O Tween 80[®] é utilizado na composição de vacinas como adjuvante (Cox & Coulter, 1997; Donnelly, 1997; Deliyannis *et al*, 1998) e tem um custo muito baixo. Logo após o primeiro teste da 8BrGuo diluída acrescida de Tween 80[®] verificamos que este mantinha o pH mais baixo (8,0) e após o acréscimo do HCl não ocorreu a precipitação de 8BrGuo, apenas a turvação do meio, sem precipitação do composto.

Uma vez obtido resultados satisfatórios mas, ainda, necessitando averiguar a mortalidade dos animais investigou-se a ação da 8BrGuo em órgãos detoxificadores como fígado e rim, bem como qualquer influência deste composto sobre o sistema imunológico murino. Para tanto, utilizamos animais CBA/J saudáveis e os tratamos com doses menores que as letais notadas anteriormente (figura 9). Também preparamos controles negativo e positivo, isto é, no controle negativo utilizamos animais saudáveis, os quais não receberam medicamentos, mas apenas o mesmo veículo; e como controle positivo os animais saudáveis receberam Glucantime[®], em dose proporcional ao peso dos camundongos, o qual provoca reações adversas, em doses altas, como já comentado anteriormente na introdução. Na dose testada durante esta investigação verificamos que a 8BrGuo não causa alterações teciduais hepáticas e renais. Foi possível verificar a presença de hemácias nos sinusóides hepáticos dos animais que receberam 8BrGuo e foram sacrificados 24 horas após o tratamento, mas que pode ser resultado de artefato de técnica devido a perfusão muito rápida (figura 17). A presença de vacúolos nos hepatócitos dos animais após 60 dias de tratamento também não é significativa, podendo apenas ser resultado do horário da última alimentação deste animal especificamente. Também não foi possível verificar a presença de eritrócitos nos cortes

após 60 dias de tratamento como nos cortes referentes a análise após 24 horas. A avaliação do tecido renal dos animais tratados com 8BrGuo não apresentou qualquer alteração em 24 horas, nem 60 dias após o tratamento (figura 18). A análise dos cortes de baço não indicaram alterações perceptíveis na microscopia óptica com a coloração por hematoxilina e eosina realizada com 24 horas de tratamento. Tampouco após 60 dias, mostrando não ter influências tóxicas de efeito prolongado (figuras 19). Quanto a proliferação linfocitária, os intervalos testados não foram eficientes para verificar esta ação uma vez que 24 horas é um intervalo curto e 60 dias é um período muito longo para observar este efeito descrito na literatura (Goodman & Weigle, 1981; 1983a; 1984a; Wicker *et al*, 1987; Goodman, 1988b).

Baseados nestes resultados e interessados em comprovar a inocuidade da 8BrGuo *in vivo*, realizamos testes bioquímicos com sangue dos animais que receberam o composto. Para tanto, selecionamos enzimas marcadoras de danos hepático _ TGP e, renal _ TGO e creatinina, além do hemograma completo (Fleury, 1996) (tabela II). Neste experimento, comparando o grupo tratado com o controle, os valores de TGP indicam que não ocorreu dano hepático, pois esta enzima está presente em elevadas concentrações em hepatócitos e, qualquer lesão nestas células elevariam a sua concentração no soro dos animais de forma semelhante ao que ocorre durante estados de ingestão alcoólica, por exemplo. Os valores de TGO mostram uma discrepância entre as amostras. O grupo tratado apresentou um valor mais adequado às taxas normais desta enzima, enquanto no grupo controle é possível verificar uma taxa muito acima da esperada. Este fato deve-se, provavelmente, a hemólise provocada pela técnica utilizada para coleta de sangue dos animais, uma vez que esta é uma interferência importante. Esta enzima, além de estar presente em tecido muscular

esquelético e cardíaco, também está presente no interior de hemácias, ocasionando resultados semelhantes ao mostrado pelo grupo controle (tabela II). No hemograma completo foi possível verificar que não houve quaisquer alterações na taxa de hemoglobina e os percentuais de tipos celulares da linhagem branca mostraram-se semelhantes (tabela III).

Assim, a 8BrGuo tem a capacidade de estimular macrófagos e células NK *in vitro* (Goodman, 1988; Koo *et al*, 1988; Ojo-Amaize *et al*, 1989/1990), induzir a proliferação de linfócitos B e a produção de anticorpos *in vitro* (Dosch *et al*, 1988; Wicker *et al*, 1987; Tosi *et al*, 1997) e *in vivo* (Scheuer *et al*, 1985a), aumenta a capacidade de resposta do sistema imunológico em camundongos imunodeficientes (Goodman & Weigle, 1983d; 1985a) ou ainda restabelece a capacidade de resposta imune em camundongos previamente tolerizados por HGG (gama globulina humana) (Scheuer *et al*, 1985b). A citotoxicidade em linfócitos T também é induzida por 8MeGuo (Feldbush & Ballas, 1985).

Os resultados apresentados nesta tese indicam que 8BrGuo foi capaz de diminuir não só as dimensões das lesões como também retardar o aparecimento de úlceras nas patas infectadas, sem causar alterações teciduais em tecidos detoxificadores, como fígado e rim, geralmente os primeiros afetados por medicamentos. É necessário investigar o mecanismo de ação de 8BrGuo no tratamento da infecção por *L. (L.) amazonensis*, *in vivo* e, assim, sugerir a possibilidade de utilização de 8BrGuo no tratamento da leishmaniose.

CONCLUSÕES

- 8BrGuo diminui a infecção por *L. (L.) amazonensis* em cultura primária de macrófagos murinos por via diferente da produção de espécies reativas de nitrogênio.
- A linhagem de camundongos CBA/J é suscetível a *L. (L.) amazonensis*.
- A melhor via para aplicação de 8BrGuo para o tratamento de camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* é a intraperitoneal.
- O Tween 80[®] é um adjuvante no tratamento da leishmaniose murina com 8BrGuo.
- A 8BrGuo é eficiente no tratamento de lesões cutâneas provocadas por *L. (L.) amazonensis* em camundongos CBA/J.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. & POBER, J. S. - **Cellular and molecular immunology**. 2nd Edition. Pennsylvania: W. B. Saunders Company, 1994. 457 p.
- ADLER, H.; ADLER, B.; PEVERI, P.; WERNER, E. R.; WACHTER, H.; PETERHANS, E. & JUNGI, T. W. - Differential regulation of inducible nitric oxide syntase production in bovine and caprine macrophages. **J Infect Dis** 173:971-978, 1996.
- ASHFORD, R. W. - The leishmanises as model zoonoses. **Ann Trop Med Parasitol** 91(7):693-701, 1997.
- AUGUSTO, O; LINARES, E. & GIORGIO, S. - Possible roles of nitric oxide and peroxynitrite in murine leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res** 29:853-862, 1996.
- BADARÓ, R.; FALCOFF, E.; BADARÓ, F. S.; CARVALHO, E. M.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; BARRAL, A.; CARVALHO, J. S.; BARRAL-NETO, M.; BRANDELY, M.; SILVA, L.; BINA, J. C.; TEIXEIRA, R.; FALCOFF, R.; ROCHA, H.; HO, J. L. & JOHNSON JR., W. D. - Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **New Eng J Med** 322:16-21, 1990.
- BADARÓ, R. & JOHNSON JR., W. D. - The role of interferon- γ in the treatment of visceral and difuse cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis** 167(Suppl. 1):S13-7, 1993.
- BARBIÉRI, C. L.; GIORGIO, S.; MERJAN, A. J. C. & FIGUEIREDO, E. N. - Glycophingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by ude of a monoclonal antibody. **Infect Immunit** 61(5):2131-2137, 1993.
- BARRAL-NETO, M.; REED, S. G.; SADIGURSKY, M. & SONNENFELD, G. - Specific immunization of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* using solubilized promastigotas. **Clin Exp Immunol** 67:11-19, 1997.
- BECKER, I.; VOLKOW, P.; VELASCO-CASTREJON, O.; DOMINGUEZ, J. S.D.; MORALES-VARGAS, A.; RUIZ-REMIGIO, A. & PEREZ-MONTFORT, R. - The efficacy of pentamidine combined with allopurinols and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitol Res** 85:165-170, 1990.
- BERMAN, J. D. - Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Rev Infect Dis** 10(3):560-586, 1998.
- _____ - Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemoterapeutic developments in the last 10 years. **Clin Infect Dis** 24:684-703, 1997.
- BERMAN, J. D.; BADARÓ, R.; THAKUR, C. P.; WASUNNA, K. M.; BEHBEHANI, K.; DAVIDSON, R.; KUZOE, F.; PANG, L.; WEERASURIYA, K. & BRYCESON, A. D. M. - Efficacy and safety of liposomal amphotericin B (AmBisome) for visceral leishmaniasis in endemic developing countries. **Bull WHO** 76(1):25-32, 1998.

- BOGDAN, C.; MOLL, M.; SOLBACH, W. & RÖLLINGHOFF, M. - Tumor necrosis factor- α in combination with interferon- γ , but not with Interleucina-4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur J Immunol** 20:1131-1135, 1990.
- BOGDAN, C.; THÜRING, H.; DLASKA, M.; RÖLLINGHOFF, M. & WEISS, G. - Mechanism of suppression of macrophages nitric oxide release by IL-13. **J Immunol** 159:4506-4513, 1997.
- BOGDAN, C. & RÖLLINGHOFF, M. - The immune response to *Leishmania*: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol** 28:121-134, 1998.
- BOGDAN, C. & RÖLLINGHOFF, M. - How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitol Today** 15(1):22-28, 1999.
- BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DÖRING, R.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. AND RITTIG, M. - Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. **J Exp Med**, 2000;
- BONNET, P. A. & ROBINS, R. K. - Modulation of leukocyte genetic expression by novel purine nucleoside analogues. A new approach to antitumor and antiviral agents. **J Med Chem** 36(6):635-6653, 1993.
- CANTOS, G.; BARBIERI, C. L.; IACCOMINI, M.; GORIN, P. A. J. & TRAVASSOS, L. R. - Synthesis of antimony complexes of yeast mannan and mannan derivatives and their effect on *Leishmania*-infected macrophages. **Biochem J** 289:155-160, 1993.
- CHANCE, M. L. - New development in the chemotherapy of leishmaniasis. **Ann Trop Med Parasitol** 89(Suppl. 1):37-43, 1995.
- CHANG, C. S. & CHANG, K.-P. - Monoclonal antibody affinity purification of a *Leishmania* membrane glycoprotein and its inhibition of *Leishmania*-macrophages binding. **Proc Natl Acad USA** 83:100-104, 1986.
- CHANG, C. S.; INSERRA, T. J.; KINK, J. A.; FONG, D. & CHANG, K.-P. - Expression and size heterogeneity of a 63 kilodalton membrane glycoprotein during growth and transformation of *Leishmania mexicana amazonensis*. **Mol Biochem Parasitol** 18:197-210, 1986.
- CHEN, R.; GOODMAN, M. G.; ARGENTIERI, D.; BELL, S. C.; BURR, L. E.; COME, J.; GOODMAN, J. H.; KLAUBERT, D. H.; MARYANOFF, B. E.; POPE, B. L.; RAMPULLA, M. S.; SCHOTT, M. R. & REITZ, A. B. - Guanosine derivatives as immunostimulants: discovery of loxoribine. **Nucleosides & Nucleotides** 13(1-3): 551-562, 1994.
- COME, J.; BURR, L. & CHEN, R. - A convenient synthesis of 7-allyl-8-substituted guanosines. **Tetrahedron Lett** 32(37):4823-4826, 1991.
- CONVIT, J.; CASTELLANOS, P. L.; ULRICH, M.; CASTÉS, M.; RODÓN, A.; PINARDI, M. E.; RODRÍGUEZ, N.; BLOOM, B. R.; FORMICA, S.; VALECILLOS, L. & BRETANA, A. - Immunotherapy of localized, intermediate and diffuse forms of american cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis** 160(1):104-115, 1989.

- COX, J. C. & COULTER, A. R. - Adjuvants _ a classification and review of their modes of action. **Vaccine** 15(3):248-256, 1997.
- CVE - São Paulo (estado). Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Epidemiológica Alexandre Vranjac. **Manual de vigilância epidemiológica: leishmaniose tegumentar americana, normas e instruções**, 1995.
- DELIYANNIS, G.; JACKSON, D. C.; DYER, W.; BATES, J.; COULTER, A.; HARLING-McNABB, L. & BROWWN, L. E. - Immunopotential of humoral and cellular responses in inactivated influenza vaccines by tow different adjuvants with potential for human use. **Vaccine** 16(20):2058-2068, 1998.
- DEREURE, J.; PRATLONG, F.; BASSET, D.; BASTIEN, P. & DEDET, J.-P. - Haemoculture as a tool for diagnosing visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. **Bull WHO** 76(2):203-206, 1998.
- DESJEUX, P. - Information of the epidemiology and control of the leishmaniasis by country or territory. Geneva: **WHO**, 1992. (WHO/LEISH/91.30)
- DONELLY, J. J. - New developments in adjuvants. **Mech Ageing Dev** 93(1-2):171-177, 1997.
- DOSCH, H-M.; OSUNDWA, V. & LAM, P. - Activation of human B lymphocytes by 8' substituted guanosine derivatives. **Immunol Lett** 17:125-132, 1988.
- FELDBUSH, T. L. & BALLAS, Z. K. - Lymphokine-like activity of 8-mercaptoguanosine: induction of T and B cell differentiation. **J Immunol** 134(5):3204-3211, 1985.
- Fleury. **Manual de Exames**. Laboratório Fleury S/C Ltda Editora, 1996. São Paulo.
- FRANKE, E. D.; MCGREEVY, P. B.; KATZ, S. P. & SACKS, D. L. - Growth cycle dependent generation of complement resistant *Leishmania* promastigotes. **J Immunol** 134:2713-2719, 1985.
- GIORGIO, S. - **Estudo da imunidade celular e humoral na imunoterapia e resistência à infecção por *L. amazonensis***. São Paulo, 1989. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
- GIORGIO, S. & BARÃO, S. C.; AUGUSTO, O. & KWEE, J. K. - *Leishmania amazonensis* infection is reduced in macrophages treated with guanine ribonucleosides. **Acta Trop** 70:119-122, 1998.
- GIORGIO, S. & BARÃO, S. C. - Intracellular *Leishmania amazonensis* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. **Rev Inst Med Trop SP** 40(4):237-240, 1998.
- GOODMAN, M. G. - Induction of interleukin-1 activity from macrophages by direct interaction with C8-substituted guanine ribonucleosides. **Int J Immunopharmacol** 10(5):579-586, 1988a.
- _____ - Role of salvage and phosphorylation in the immunostimulatory activity of C8-substituted guanine ribonucleosides. **J Immunol** 141(7):2394-2399, 1988b.

- _____ - Review: Cellular and biochemical studies of substituted guanine ribonucleoside immunostimulants. **Immunopharmacol** 21:51-68, 1991.
- GOODMAN, M. G. & WEIGLE, W. O. - Activation of lymphocytes by brominated nucleoside and cyclic nucleotide analogues: implications for the "second messenger" function of cyclic GMP. **Proc Natl Acad Sci USA** 78(12):7604-7608, 1981.
- _____ - Induction of immunoglobulin secretion by a simple nucleoside derivate. **J Immunol** 128(6):2399-2424, 1982a.
- _____ - Bromination of guanosine and cyclic GMP confers resistance to metabolic process by B cells. **J Immunol**, 1982b; 129(6):2715-2717.
- _____ - Activation of lymphocytes by a thiol-derivatized nucleoside: characterization of cellular parameters and responsive subpopulations. **J Immunol** 130(2):551-557, 1983a.
- _____ - T cell-replacing activity of C8-derivatized guanine ribonucleosides. **J Immunol** 130(5):2042-2045, 1983b.
- _____ - Derivatized guanine nucleosides: a new class of adjuvants for in vitro antibody responses. **J Immunol** 130(6):2580-2583, 1983c.
- _____ - Manifold amplification of in vivo immunity in normal and immunodeficient mice by ribonucleosides derivatized at C8 of guanine. **Proc Natl Acad Sci USA** 80(12):3452-3455, 1983d.
- _____ - Intracellular lymphocyte activation and carrier-mediated transport of C8-substituted guanine ribonucleosides. **Proc Natl Acad Sci USA** 81:862-866, 1984.
- _____ - Dissociation of inductive from differentiative signals transmitted by C8-substituted guanine ribonucleosides to B cells from SJL mice. **J Immunol** 134(1):91-94, 1985a.
- _____ - Enhancement of the human antibody response by C8-substituted guanine ribonucleosides in synergy with interleukin-2. **J Immunol** 135(5):3284-3288, 1985b.
- GOODMAN, M. G.; REITZ, A. B.; CHEN, R.; BOBARDT, M. D.; GOODMAN, J. H. & POPE, B. L. - Selective modulation of elements of the immune system by low molecular weight nucleosides. **J Pharmacol Exp Ther** 274(3): 1552-1557, 1995.
- GREEN, S. J.; MELTZER, M. S.; HIBBS, J. B. & NACY, C. A. - Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. **J Immunol** 144(1): 278-283, 1990a.
- GREEN, S. J.; CRAWFORD, R. M.; HOCKMEYER, J. T.; MELTZER, M. S. & NACY, C. A. - *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . **J Immunol** 145(12):4290-4297, 1990b.

- GROGL, M.; SCHUSTER, B. G.; ELLIS, W. Y. & BERMAN, J. D. - Successful topical treatment cutaneous leishmaniasis with a combination of paramomycin (aminosidine) and gentamicin. **J Parasitol** 85(2):354-359, 1999.
- GUNDERS, A. E. - *In: Vaccination: past and future role in control. The Leishmaniasis*. 1st edition. London: Academic Press Inc., 1987, vol. II, p.929-941.
- HANDMAN, E. - Leishmania vaccines: old and new. **Parasitol Today** 13(6):236-238, 1997.
- HANDMAN, E. - Cell biology of *Leishmania*. **Adv Parasitol** 44:1-39, 2000a.
- HANDMAN, E.; NOORMOHAMMADI, A. H.; CURTIS, J. M.; BALDWIN, T.; SJÖLANDER, A. - Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. **Vaccine** 18:3011-3017, 2000b.
- HERWALDT, B. - Leishmaniasis. **Lancet** 354:1191-1199, 1999.
- HERWALDT, B. L. & BERMAN, J. D. - Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (pentostam) and review of pertinent clinical studies. **Am J Trop Med Hyg** 46(3):296-306, 1992.
- KERR, S. F. - Palaeartic origin of *Leishmania*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 95(1):75-80, 2000.
- KOO, G. C.; JEWELL, M. E.; MANYAK, C. L.; SIGAL, N. H. & WICKER, L. S. - Activation of murine killer cells and macrophages by 8-bromoguanosine. **J Immunol** 140: 3249-3252, 1988.
- LAISON, R. & SHAW, J. J. - A brief history of the genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to amazonian Brazil. **Ciência e Cultura** 44(2/3):94-106, 1992.
- LENINGHER, A. L. - **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Editora Savier, 1993.
- LOCKSLEY, R. M.; HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J. & GARDNER JR., K. D. - Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann Inst Pasteur - Immunol** 138:744-749, 1987.
- LOVE, D.; ESKO, J. D. & MOSSER, D. M. - A heparin-binding activity on *Leishmania* amastigotes which mediates adhesion to cellular proteoglycans. **J Cell Biol** 123(3):759-766, 1993.
- LOVE, D. C.; KANE, M. M. & MOSSER, D. M. - *Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages. **Exp Parasitol** 88:161-171, 1998.
- Martindale - The Extra Pharmacopeia; Royal Pharmaceutical Society. 31^a Ed., 1996.
- MARTINEZ, S. & MARR, J. J. - Allopurinol in the treatment of american cutaneous leishmaniasis. **New Engl J Med** 326(11):741-744, 1992.

- MARZOCHI, K. B. F.; MARZOCHI, M. C. A.; SILVA, A. F.; GRATIVOL, N.; DUARTE, R.; CONFORT, E. M. & MODABBER, F. - Phase 1 study of na inactivated vaccine against americam tegumentary leishmaniasis in normal volunteers in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 93(2):205-212, 1998.
- MASIHI, K. N. - Immunotherapy of microbial diseases. *In: Immunopharmacol Rev*, 1996; Vol 2: 157-199.
- MATTOCK, N. - Public/private partnership: developing na oral treatment for visceral leishmaniasis. **TDR News**, Geneva, 60, 1999.
- MAUËL, J. - Intracellular survival of protozoan parasites with special reference to *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol** 38:1-51, 1996.
- MAUËL, J. & RANSIJN, A. - *Leishmania* spp: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp Parasitol** 87:98-111, 1997.
- MAYRINK, W.; WILLIAMS, P.; COSTA, C. A.; MAGALHÃES, P. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; OLIVEIRA LIMA; A.; MACHALICK, M. S.; FERREIRA CARVALHO, E.; BARROS, G. C.; SESSA, P. A.; ALENCAR, J. T. A. - An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the state of Espírito Santo Brazil. **Ann Trop Med Parasitol** 79:259-269, 1985.
- MODABBER, F. - Experiences with vaccines against cutaneous leishmaniasis: of men and mice. **Parasitology** 98:S49-S50, 1989.
- MOOD, A. M.; GRAYBILL, F. A. & BOES, D.C. - Introduction to the theories of statistics. Ed. McGraw Hill, 1974.
- MOSSALAYI, M. D.; AROCK, M.; MAZIER, D.; VINCENDEAU, P. & VOULDOUKIS, I. - The human immune response during cutaneous leishmaniasis: NO problem. **Parasitol Today** 15(8):342-345, 1999.
- NACY, C. A.; GREEN, S. J.; LEIBY, D. A.; FORTIER, A. H.; NELSON, B. A.; KALTER, D. C.; MEIEROVICS, A. I. & MELTZER, M. S. - Macrophages, cytokines and *Leishmania*. *In: Mononuclear phagocytes in cell biology*. BocaRaton: Ed. by G. Lopez - Berestein J. Klostergard CrC Press, 1993, 177-214.
- GENARO, O. - *Leishmania tegumentar americana*. *In: Parasitologia humana*. Neves, D. P.; Melo, A. L. de; Genaro, O. & Linardi, P. M. Editores. 10^a edi o. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 2000.
- OJO-AMAIZE, E. A.; RUBALCAVA, B.; AVERY, T. L.; COTTAM, H. B.; MATSUMOTO, S. S.; JOLLEY, W. B. & ROBINS R. K. - Activation of the respiratory burst in murine phagocytes by certain guanine ribonucleosides modified at the 7 and 8 positions: possible involvement of a pertussis toxin-sensitive G-protein. **Immunol Lett** 23(3):173-1178, 1989/1990.
- OLAFSON, R. W.; THOMAS, J. R.; FERGUSON, M. A. J.; DWEK, R. A.; CHAUDRURI, M.; CHANG, K.-P. & RADEMACHER, T. W. - Structures of the N-linked oligosaccharides of

- gp63, the major surface glycoprotein, from *Leishmania mexicana amazonensis*. **J Biol Chem** 265(21):12240-12247, 1990.
- OLIVEIRA-NETO, M. P.; SCHUBACH, A.; MATTOS, A.; GANÇALVES-COSTA, S. C. & PIRMEZ, C. - A low-dose antimony treatment in 159 patients with american cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). **Am J Trop Med Hyg** 57(6):651-655, 1997.
- PASSOS, V. M. A.; BARRETO, S. M.; ROMANHA, A. J.; KRETTLI, A. U.; VOLPINI, Â. C.; & LIMA E COSTA, M. F. F. - American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. **Bull WHO** 78(8):968-974, 2000.
- PÉREZ, H.; ARREDONDO, B. & GONZÁLEZ, M. - Comparative study of american cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred. **Infect Immun** 22(2):301-307, 1978.
- _____; LABRADOR, F. & TORREALBA, J. W. - Variations in the response of five strains of mice to *Leishmania mexicana*. **Int J Parasitol** 9(1):27-32, 1979.
- POPE, B. L.; CHOURMOUZIS, E.; SIGINDERE, J.; MACINTYRE, J. P.; CAPETOLA, R. J. & LAU, C. Y. - In vivo activation of natural killer cells and priming of IL-2 responsive cytolytic cells by loxoribine (7-allyl-8-oxo-guanosine). **Cell Immunol** 1993a; 147:302-312.
- POPE, B. L.; CHOURMOUZIS, E.; VICTORINO, L.; MACINTYRE, J. P.; CAPETOLA, R. J. & LAU, C. Y. - Loxoribine (7-allyl-8-oxoguanosine) activates natural killer cells and primes cytolytic precursor cells for activation by IL-2. **J Immunol** 151(6):3007-3017, 1993b.
- POPE, L. P.; SIGINDERE, J.; CHOURMOUZIS, E.; MACINTYRE, P. & GOODMAN, M. G. - 7-allyl-8-oxoguanosine (loxoribine) inhibits the metastasis of B16 melanoma cells and has adjuvant activity in mice immunized with a B16 tumor vaccine. **Cancer Immunol Immunother** 38:83-91, 1994a.
- PROUDFOOT, L.; NIKOLAEV, A. V.; FENG, G-J. - Regulation of expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:10984-10989.
- PUENTES, S. M.; SACKS, D. L.; SILVA, R. P. & JOINER, K. A. - Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in expression of a surface lipophosphoglycan. **J Exp Med** 167:887-902, 1988.
- REY, LUIZ - Parasitologia. 2ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1992.
- RIBEIRO, J. M. C. - Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann Ver Entomol** 32:463-478, 1987.
- _____- Vector saliva and its role in parasite transmission. **Exp Parasitol** 69(1):104-106, 1989.

- RIBEIRO, J. M. C. ; VACHEREAU, A.; MODI, G. B. & TESH, R. B. - A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science** 243:212-214, 1989.
- ROBLEDO, S. M.; VALENCIA, A. Z. & SARAVIA, N. G. - Sensitivity to Glucantime ® of *Leishmania Viannia* isolated from patients prior to treatment. **J Parasitol** 85(2):360-366, 1999.
- SACKS, D. L. - Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. **Exp Parasitol** 69(1):100-103, 1989.
- SACKS, D. L. & PERKINS, P. V. - Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science** 223: 1417-1419, 1984.
- SACKS, D. L. & SILVA, R. M. - The generation of infective stage *Leishmania major* promastigotes is associated with the cell-surface expression and release of a developmentally regulated glycolipid. **J Immunol** 139:3099-3106, 1987.
- SACKS, D. L. ; PIMENTA, P. F. P.; MCCONVILLE, M. J.; SCHNEIDER, P. & TURCO, S. J. - Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **J Exp Med** 181:685-697, 1995.
- SAMPAIO, R. N. R.; PAULA, C. D. R. DE; SAMPAIO, J. H. D.; FURTADO, R. S.; LEAL, P. P.; ROSA, T. T.; RODRIGUES, M. E. & VEIGA, J. P. R. - Avaliação da tolerância e nefrotoxicidade do antimonial pentavalente administrado na dose de 40 mg sb^V/kg/dia, de 12/12 horas, por 30 dias na forma cutâneo-mucosa de leishmaniose. **Rev Soc Bras Med Trop** 30:457-463, 1997.
- SCHEUER, W. V., GOODMAN, M. G., PARKS, D. E. & WEIGLE, W. O. - Enhancement of the in vivo antibody response by na 8-derivatized guanine nucleoside. **Cell Immunol** 91:294-300, 1985a.
- _____ - Transformation of tolerogenic to immunogenic signals in T and B cells by 8-bromoguanosine. **J Immunol** 135(5):2962-2966, 1985b.
- SCHLEIN, Y. - *Leishmania* and sandflies: interactions in the life cycle and transmission. **Parasitol Today** 9(7):255-258, 1993.
- SCOTT, P. & FARRELL, J. P. - Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. In: Immunology of Intracellular Parasitism. **Chem Immunol** 70:60-80, 1998.
- SHAW, J. J. - Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 89(3):471-478, 1997.
- Sigma biochemicals and reagents _ for life science research. Sigma-Aldrich Co. Reproduction, 2000-2001.
- SILVEIRA, T. G. V.; TEODORO, U.; ARRAES, S. M. A. A.; LONARDONI, M. V. C.; DIAS, M. L. G. G.; SHAW, J. J.; ISHIKAWA, E. A. Y. & LAINSON, R. - An autochthonous case of

- cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Lainson & Shaw, 1972 from the north of Paraná State, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 85(4):475-476, 1990.
- SILVEIRA, T. G. V.; PINGARILHO, D. A.; DUARTE, R. R.; GABRIEL, M. D.; DIAS, M. G. S.; MAOURA, M. P.S. A.; BRAGA, M. E. A.; PRESTES, E. X. & MAUÉS, B. C. - Avaliação de três esquemas terapêuticos com o antimoniato de N-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose visceral no Estado de Pará, Brasil. **Rev Inst Med Trop SP** 35(2):177-181, 1993.
- SMITS, H. L. & HARTSKEERL, R. A. - PCR amplification reactions in parasitology. **J Microbiol Methods** 23:41-54, 1995.
- SOLBACH, W. & LASKAY, T. - The host to *Leishmania* infection. **Adv Immunol** 74:275-317, 2000.
- STEVENS, J. R. & GILSON, W. - The molecular evolution of Trypanosomes. **Parasitol Today** 15(11):432-437, 1999.
- STRAUS, A. H.; LEVERY, S. B.; JASIULIONIS, M. G.; SALYAN, M. E. K.; STEELE, S. J.; TRAVASSOS, L. R.; HAKOMORI, S. & TAKAHASHI, H. K. - Stage-specific glycosphingolipids from amastigotes forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. **J Biol Chem** 268(18):13723-13730, 1993.
- THE INDEX MERCK - 10^a ed, 1983. Merck & Co. Inc. Editora. Rahway, N.J., USA.
- TITUS, R. G. & RIBEIRO, J. M. C. - Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science** 239:1306-1308, 1988.
- TITUS, R. G.; SHERRY, B. & CERAMI, A. - Tumor necrosis factor plays a protective role in experimental murine cutaneous leishmaniasis. **J Exp Med** 170:2097-2104, 1989.
- TOSI, P.; ZINZANI, P. L.; PELLACANI, A.; OTTAVIANI, E.; MAGAGHOLI, M. & TURA, SANTE - Loxoribine affects fludarabine activity on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. **Leukemia and Lymphoma** 26:343-348, 1997.
- TUMANG, M. C.; KEOGH, C.; MOLDAWER, L. L.; HELFGOTT, D. C.; TEITELBAUM, R.; HARIPRASHAD, J. & MURRAY, H. W. - Role and effect of TNF- α in experimental visceral leishmaniasis. **J Immunol** 153:768-775, 1994.
- VEIGA, J. P. R.; WOLFF, E. R.; SAMPAIO, R. N. & MARSDEN, P. D. - Renal tubular dysfunction in patients with mucocutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. **Lancet** september, 3th : 569, 1983.
- VERAS, P. S. T.; TOPIKO, A.; GOUHIER, N.; MOREAU, M.-F.; RABINOVITCH, M & POCHELET, M. - Fusion of *Leishmania amazonensis* parasitophorous vacuoles with phagosomes contain zymosan particle: cinemicrographic and ultrastructural observations. **Braz J Med Biol Res** 29:1009-1018, 1996.

- WEINHEBER, N.; WOLFRAM, M.; HARBECKE, D. & AEBISCHER, T. - Phagocytosis of *Leishmania mexicana* amastigotes by macrophages leads to a sustained suppression of IL-12 production. **Eur J Immunol** 28:2467-2477, 1998.
- WERNER, G. H. & JOLLÈS, P. - Immunostimulation agents: what next? A review of their present and potential medical applications. **Eur J Bioch.** 242:1-19, 1996.
- WICKER, L. S., BOLTZ JR., R. C., NICHOLS, E. A., MILLER, B. J., SIGAL, N. H. & PETERSON L. B. - Large, activated B cells are the primary B-cell target of 8-bromoguanosine and 8-mercaptoguanosine. **Cell Immunol** 106:318-329, 1987.
- WHO - The leishmaniasis. *In*: Tropical Disease Research. Seventh Programme Report. Geneva: WHO, 1985.
- WHO - Control of the leishmaniasis: Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1990. 158p.
- WHO - Leishmaniasis. *In*: Tropical Disease Research. Thirteenth Programme Report. Geneva: WHO 100-111, 1997.
- XU, D. & LIEW, F. Y. - Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. **Immunology** 84:173-176, 1995.
- ZILBERSTEIN, D. & SHAPIRA, MICHAL. - The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. **Ann Rev Microbiol** 48:440-470, 1994.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE