

Ademar de Mesquita Barbosa

UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS EM  
*Leishmania amazonensis*

Campinas, 2013



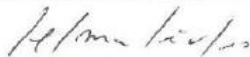
Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Biologia

Ademar de Mesquita Barbosa

“UTILIZAÇÃO DE INIBIDORES ENZIMÁTICOS EM  
*Leishmania amazonensis*”

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

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida pelo candidato  
**ADEMAR DE MESQUITA  
BARBOSA**  
e aprovada pela Comissão Julgadora.



Orientadora: Prof.ª. Dra. Selma Giorgio

Campinas, 2013

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B234u Barbosa, Ademar Mesquita, 1973-  
Utilização de inibidores enzimáticos em *Leishmania amazonensis* / Ademar de  
Mesquita Barbosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Inibidores enzimáticos. 2. *Leishmania*. I. Giorgio, Selma, 1962-. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Use of enzyme inhibitors in *Leishmania amazonensis*

**Palavras-chave em inglês:**

Enzyme inhibitors

*Leishmania*

**Área de concentração:** Parasitologia

**Titulação:** Mestre em Parasitologia

**Banca examinadora:**

Selma Giorgio [Orientador]

Luciana Urbano dos Santos

Rodrigo Ramos Catharino


**Data de defesa:** 29-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Parasitologia

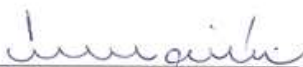
Campinas, 29 de agosto de 2013.

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Selma Giorgio (Orientadora)

  
Assinatura

Profa. Dra. Luciana Urbano dos Santos

  
Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ramos Catharino

  
Assinatura

Profa. Dra. Regina Maura Bueno Franco

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Prof. Dr. Jancarlo Ferreira Gomes

\_\_\_\_\_  
Assinatura

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by parasites of the genus *Leishmania* and currently is expanding in all states. Treatment is problematic, given that the recommended drugs are difficult to administer and serious side effects. The present study aims to test synthetic compounds, developed by the group of Chemistry, USP / São Carlos. The evaluation of compounds that act on enzymes of metabolism was performed in promastigotes of *Leishmania amazonensis* in cultured murine peritoneal macrophages. The results showed that the 17 compounds tested, three IDs (71S, 130S and 195 are dehydrogenase inhibitors enzima diidroorotato - DHODH) were toxic to promastigotes of *L. amazonensis*-GFP, in assays counting under a light microscope and measuring fluorescence spectra-fluorometer, though only the ID of the ID 71S 130S were considered significant by statistical analysis. These inhibitors are reduced infection with amastigotes in cultured murine macrophages peritoneias but these were toxic to macrophage cultures. The compound ID 195 was toxic to macrophages at the higher concentrations. In another experiment it was shown that at concentrations below 195 the ID was not toxic to macrophages, but did not reduce the number of amastigotes inside macrophages.

## RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença causada pelos parasitas do gênero *Leishmania* e atualmente, está em franca expansão em todos os estados da federação. O tratamento é problemático, tendo em vista que os fármacos preconizados são de difícil administração e com sérios efeitos colaterais. Este trabalho foi realizado com o objetivo de testar compostos sintéticos, desenvolvidos pelo grupo de Química da USP/São Carlos. A avaliação de compostos com ação sobre enzimas do metabolismo foi realizada em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e em cultura de macrófagos peritoneais murinos. Os resultados mostraram que dos 17 compostos testados, 3 (IDs 71S, 130S e 195 que são inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase - DHODH) foram tóxicos para promastigotas de *L. amazonensis*-GFP, em ensaios de contagem em microscópio óptico e medição de fluorescência em espectro-fluorimêtro, apesar de que somente o ID 71S o ID 130S foram considerados significativos pela análise estatística. Esses inibidores reduziram a infecção com amastigotas em cultura de macrófagos peritoneais murinos, mas foram tóxicos para essas culturas de macrófagos. O composto ID 195 foi tóxico para os macrófagos nas concentrações mais altas. Em outro experimento demonstrou-se que em concentrações menores o ID 195 não foi tóxico para macrófagos, mas também não reduziu o número de amastigotas no interior dos macrófagos.

## SUMÁRIO

### 1 – INTRODUÇÃO

Aspectos gerais da Leishmaniose .....	1
Vetor .....	2
Ciclo biológico da Leishmaniose .....	3
Situação epidemiológica .....	5
Agente etiológico .....	7
Ciclo de transmissão da <i>L. amazonensis</i> .....	8
Diagnóstico Laboratorial.....	9
Tratamento .....	10
Química medicinal .....	12

### 2 – OBJETIVOS

Objetivo Geral/Específicos .....	15
----------------------------------	----

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Lista de compostos utilizados e procedência .....	16
Animais .....	17
Parasitas .....	18
Fármaco e Inibidores .....	19
Ensaio de toxicidade dos compostos em culturas de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	21
Ensaio de toxicidade dos compostos em culturas de macrófagos murinos infectadas com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	21



Ensaio de toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais murinos .....	22
Análise estatística .....	23
<b>4 – RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
<b>5 – DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>60</b>
<b>8 - ANEXO I – CÓPIA DO PROTOCOLO CEUA.....</b>	<b>69</b>

## AGRADECIMENTOS

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Selma Giorgio, pela oportunidade que me proporcionou em trabalhar no seu laboratório.

Aos Profs. Drs. Ana Maria Aparecida Guaraldo, Arício Xavier Linhares, Marlene T. Ueta, Regina Maura Bueno Franco, Luiz Augusto Magalhães, Silmara Marques Allegretti e Regina Maura Bueno Franco por participarem de minha qualificação e pré-banca.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari e ao Dr. Josmar R. Rocha ambos da USP/São Carlos pela colaboração com os inibidores sintéticos.

Aos colegas do laboratório de Leishmaniose, Alexandra, Flavia, Larissa, Solange, Myriam e Barbara pelo apoio e coleguismo.

Aos colegas do laboratório de Helminologia e Entomologia respectivamente Camila e Maicon pela amizade e apoio técnico.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Animal, Leticia, Sirene, Tacilda, Nilson e João Batista pelo apoio nos momentos mais necessários.

Aos Profs. Drs. Luciana Urbano dos Santos, Rodrigo Ramos Catharino, Regina Maura Bueno Franco e Jancarlo Ferreira Gomes pela participação na minha banca.

E a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para finalização deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema mostrando o ciclo de vida da Leishmania .....	3
Figura 2. Ciclo de transmissão da <i>Leishmania amazonensis</i> na Amazônia brasileira .....	8
Figura 3. Efeito da Anfotericina B em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	29
Figura 4. Efeito do composto ID 01S em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ....	30
Figura 5. Efeito do composto ID 02S em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ....	31
Figura 6. Efeito do composto ID 16 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	32
Figura 7. Efeito do composto ID 42 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	33
Figura 8. Efeito do composto ID 71 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	34
Figura 9. Efeito do composto ID 71S em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ....	35
Figura 10. Efeito do composto ID 130S em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	36
Figura 11. Efeito do composto ID 185 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	37
Figura 12. Efeito do composto ID 186 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	38
Figura 13. Efeito do composto ID 187 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	39
Figura 14. Efeito do composto ID 188 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	40
Figura 15. Efeito do composto ID 189 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	41
Figura 16. Efeito do composto ID 190 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	42
Figura 17. Efeito do composto ID 191 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ..	43
Figura 18. Efeito do composto ID 192 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	44
Figura 19. Efeito do composto ID 193 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	45
Figura 20. Efeito do composto ID 195 em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> ...	46
Figura 21. Gráficos de perfis de nº de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	47

Figura 22. Efeito dos compostos em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> . .....	48
Figura 23. Efeito dos compostos em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (% de macrófagos infectados + numero de amastigotas/macrófago) .....	49
Figura 24. Efeito do composto em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (efeito tóxico ID 195).....	50
Figura 25. Efeito do composto em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (efeito ID 195 em concentrações menores) .....	51
Figura 26. Efeito do composto em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de <i>L. amazonensis</i> (número de células/20 campos).....	52

## **1 – INTRODUÇÃO**

### **Aspectos gerais da Leishmaniose**

As leishmanioses são doenças parasitárias que apresentam manifestações clínicas multifacetadas, têm ampla distribuição geográfica, ocorrem no Novo e Velho Mundo e mostram grande diversidade epidemiológica (FILHO & BOGLIOLO, 2000). Identificada no primeiro século da era cristã na Ásia Central, a leishmaniose tegumentar, recebeu nomes diferentes, de acordo com a região onde ocorria (por exemplo, ferida de Balkh no Afeganistão; botão de Bagdad no Iraque; botão do Oriente e úlcera de Bauru no Estado de São Paulo). Nas Américas, é denominada Leishmaniose tegumentar americana (LTA) e ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina (FILHO & BOGLIOLO, 2000).

O gênero *Leishmania* (Ross, 1903), agrupa espécies de protozoários parasitos unicelulares, heteróxeos, pertencentes à classe Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, na forma flagelada, promastigota, no trato digestório dos hospedeiros invertebrados e, como amastigotas, forma intracelular obrigatória do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (NEVES, 2000; HENRY et al., 2005).

## Vetor

Os flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) são insetos que transmitem ao homem patógenos causadores das leishmanioses, bartoneleose (verruca peruana) e febre papatasi (febre dos três dias), tendo como agentes etiológicos protozoários, bactérias e vírus, respectivamente. No caso específico de vetores das leishmanioses, dois gêneros têm importância médica e veterinária: *Phlebotomus* – na Europa, Ásia e África – e *Lutzomya* – nas Américas (BARRAL & COSTA, 2011). Estes pequenos dípteros são curvados, muito pilosos, com as asas em forma de ponta de lança mantidas eretas sobre o corpo quando pousados e popularmente conhecidos no Brasil como asa branca, asa dura, birigui, cangalhinha, mosquito palha, tatuquira, frebóti (MARCONDES, 2001). Apresentam ampla distribuição geográfica, encontrados sob as mais diversas altitudes, condições climáticas e ambientes (silvestres, rurais e urbanos) (BARRAL & COSTA, 2011).

A saliva de *Lutzomya longipalpis* e, provavelmente, de outras espécies de flebotomos, contém “maxadilan”, um vasodilatador muito potente que facilita a sucção do sangue e entrada do parasita (MARCONDES, 2001). A atividade dos flebotomíneos é predominantemente crepuscular ou noturna. Unicamente as fêmeas adultas são hematófagas, mas elas se alimentam também de sucos vegetais, como fazem regularmente os machos (REY, 2001). Esses dípteros se adaptam a abrigos úmidos e escuros, saindo destes, em geral, em condições de alta umidade e de temperatura moderada (MARCONDES, 2001).

## Ciclo biológico da Leishmaniose

O vetor infecta-se quando suga o sangue de um indivíduo infectado ou reservatório animal. A *Leishmania*, em sua forma amastigota, possui aspecto arredondado e 3-7  $\mu\text{m}$  de diâmetro e vive em macrófagos. O flebótomo ingere macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo e os amastigotas são liberados no estômago do inseto. Os amastigotas se transformam em promastigotas, forma móvel, flagelada e alongada (10-20  $\mu\text{m}$ ). Em seguida os promastigotas migram para o trato alimentar anterior do inseto, onde vivem no meio extracelular e se multiplicam por divisão binária. Quando o inseto finalmente realiza o repasto sanguíneo em um mamífero hospedeiro, inocula a forma promastigotas juntamente com a saliva (Fig. 1).

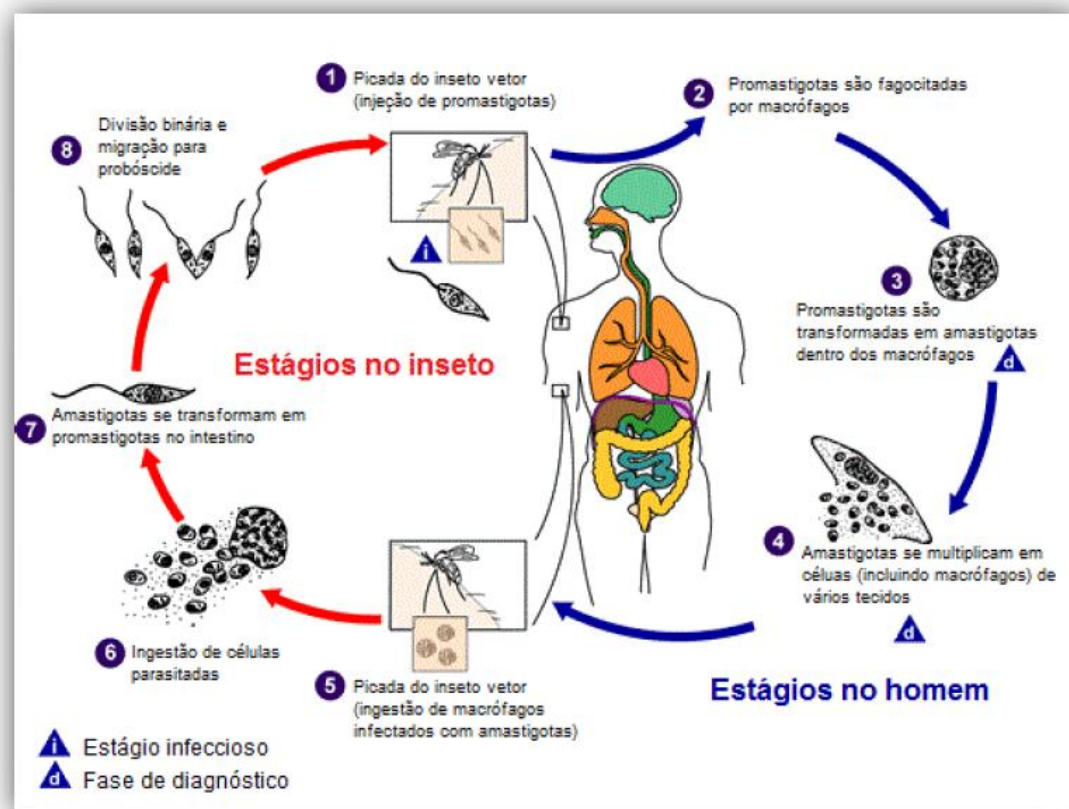


Figura 1. Ciclo de vida do parasito do gênero *Leishmania* ssp, agente causador dos diferentes tipos de Leishmaniose. Imagem retirada e adaptada do CDC (<http://www.dpd.cdc.gov/dodx/>).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, os promastigotas são fagocitados pelos macrófagos e rapidamente transformam-se em amastigotas, sobrevivem multiplicando-se dentro dos macrófagos, posteriormente lisando-os. Os amastigotas liberados são fagocitados por outros macrófagos, dando continuidade ao ciclo (AWASTHI et al., 2004).



## **Situação epidemiológica**

A leishmaniose tegumentar constitui um problema de saúde pública em 88 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das seis mais importantes doenças infecciosas, pelo seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (OMS, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). A LTA distribui-se amplamente no continente americano, desde o sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. No Brasil, especificamente no Estado de São Paulo, a LTA era classicamente doença de animais silvestres, transmitida acidentalmente para trabalhadores de exploração florestal, abertura de estradas e mineração (CUNHA & SILVA, 2007). Entretanto, a partir da década de 1980, houve aumento significativo no número de casos autóctones, abrangendo novas áreas geográficas apresentando comportamento endêmico, atingindo homens, mulheres e crianças de todas as faixas etárias, na periferia de centros urbanos.

No Brasil, a leishmaniose é doença de notificação compulsória, outro fato significativo para a saúde pública em relação à leishmaniose é a reativação de infecções subclínicas assintomáticas em indivíduos com síndrome da imunodeficiência adquirida (OMS, 2007). Um fator relevante para o surgimento dessa zoonose está relacionado aos desmatamentos que ocorreram para a chegada do progresso como: construção de estradas, vilas e fazendas (SOUZA, 2006).

Segundo o Sinan - Ministério da Saúde (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) entre 1990 a 2010 o número de casos de LTA se mantém acima de 19.000 casos/ano como descrito na tabela abaixo:

**TABELA 1. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana**

Região e UF	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
<b>Região Norte</b>	<b>7.318</b>	<b>9.359</b>	<b>9.720</b>	<b>9.739</b>	<b>11.306</b>	<b>13.117</b>	<b>9.987</b>	<b>11.058</b>	<b>6.078</b>	<b>9.129</b>	<b>11.140</b>	<b>8.107</b>	<b>10.207</b>	<b>13.508</b>	<b>13.125</b>	<b>10.679</b>	<b>8.833</b>	<b>9.890</b>	<b>8.680</b>	<b>8.272</b>	<b>7.108</b>
Rorônia	1346	2118	2220	2822	2249	2499	1738	1.465	1.317	1.737	1.421	1.563	1.812	1.980	2.181	1.668	1.204	971	941	1.035	922
Acre	59	252	403	563	372	365	490	413	280	490	903	717	1.076	1.385	1.532	1.356	1.124	913	972	906	1.026
Amazonas	1733	2590	3424	1982	741	1557	988	2.290	715		1.744	2.153	2.130	3.816	2.212	1.957	1.554	2.219	1.778	1.439	1.130
Roraima	170	507	492	605	470	251	303	308	244	146	352	454	451	303	160	280	285	340	350	441	641
Pará	3269	3196	2236	2543	5748	7064	5042	5.038	2.177	5.051	5.565	2.521	3.741	4.862	5.324	4.345	3.554	4.305	3.623	3.347	2.331
Amapá	185	394	475	643	895	645	563	902	892	884	592	52	377	555	1162	580	595	667	629	513	462
Tocantins	556	302	470	581	831	736	863	642	453	821	563	647	620	607	554	493	517	475	387	591	596
<b>Região Nordeste</b>	<b>12.428</b>	<b>12.020</b>	<b>7.140</b>	<b>8.218</b>	<b>14.426</b>	<b>13.887</b>	<b>11.303</b>	<b>11.868</b>	<b>8.455</b>	<b>9.112</b>	<b>13.078</b>	<b>11.149</b>	<b>9.373</b>	<b>7.985</b>	<b>7.863</b>	<b>8.112</b>	<b>6.169</b>	<b>5.925</b>	<b>6.003</b>	<b>6.910</b>	<b>8.911</b>
Maranhão	3109	3926	2027	2868	6262	4725	3794	4.634	2.355	3.005	4.488	5.658	4.364	3.777	3.072	3.395	2.174	2.335	1.661	1.624	2.455
Piauí	249	324	161	72	56	40	96	102	96	106	95	184	151	126	117	257	152	108	73	104	146
Ceará	3848	2862	1358	1463	1928	4262	2793	2787	1490	1372	3043	2543	2123	1329	2064	1977	1006	935	700	993	1014
Rio Grande do Norte	20	6	...	13	4	15	42	49	26	13	11	8	5	8	13	10	7	6	6	6	82
Paraíba	85	165	342	273	264	196	173	233	113	128	177	50	68	56	74	68	46	60	53	109	83
Pernambuco	680	474	378	436	806	891	714	667	643	979	1.149	518	556	558	719	337	413	446	388	501	419
Alagoas	28	54	53	71	224	114	81	144	72	156	258	88	80	97	65	57	33	111	89	77	32
Sergipe	54	50	24	46	46	52	19	47	34	30	58	93	61	16	7	11	6	4	10	11	7
Bahia	4355	4159	2797	2976	4836	3592	3591	3.205	3.626	3.323	3.799	2.027	1.965	2.018	1.732	2.000	2.332	1.920	3.023	3.435	4.673
<b>Região Sudeste</b>	<b>2.347</b>	<b>3.386</b>	<b>3.854</b>	<b>4.771</b>	<b>3.763</b>	<b>2.605</b>	<b>2.369</b>	<b>2.294</b>	<b>2.945</b>	<b>3.983</b>	<b>2.938</b>	<b>2.112</b>	<b>2.894</b>	<b>3.252</b>	<b>2.540</b>	<b>2.809</b>	<b>2.868</b>	<b>1.898</b>	<b>1.592</b>	<b>1.605</b>	<b>2.428</b>
Minas Gerais	1338	2134	2504	2547	2040	1574	1504	1.445	1.973	2.701	1.874	1.116	1.610	1.767	1.507	1.802	1.855	1.322	1.123	1.021	1.887
Espírito Santo	670	728	722	893	490	307	244	404	646	884	548	351	209	234	146	193	241	109	76	100	124
Rio de Janeiro	227	319	269	496	396	241	282	302	186	269	250	169	289	226	209	317	283	119	55	92	86
São Paulo	112	205	359	835	837	483	339	143	140	129	266	476	786	1.025	678	497	489	348	338	392	331
<b>Região Sul</b>	<b>192</b>	<b>139</b>	<b>690</b>	<b>819</b>	<b>1.361</b>	<b>796</b>	<b>617</b>	<b>430</b>	<b>455</b>	<b>460</b>	<b>853</b>	<b>568</b>	<b>943</b>	<b>932</b>	<b>607</b>	<b>541</b>	<b>573</b>	<b>514</b>	<b>630</b>	<b>464</b>	<b>253</b>
Paraná	192	139	690	819	1361	794	616	428	453	457	850	553	909	886	579	444	409	438	533	409	228
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	1	2	2	3	1	10	14	28	17	84	158	67	87	45	21
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2	5	20	18	11	13	6	9	10	10	4
<b>Região Centro-Oeste</b>	<b>2.468</b>	<b>3.546</b>	<b>3.264</b>	<b>3.907</b>	<b>4.247</b>	<b>5.343</b>	<b>4.721</b>	<b>4.640</b>	<b>2.981</b>	<b>6.384</b>	<b>4.605</b>	<b>4.629</b>	<b>4.839</b>	<b>4.980</b>	<b>4.460</b>	<b>4.388</b>	<b>3.852</b>	<b>3.095</b>	<b>3.005</b>	<b>4.492</b>	<b>3.163</b>
Mato Grosso do Sul	221	165	304	215	243	568	178	433	256	338	158	372	301	235	192	139	116	99	118	105	89
Mato Grosso	2021	3200	2682	3346	3734	4492	4195	3.779	2.283	5.504	3.921	3.816	4.067	4.189	3.752	3.639	3.181	2.715	2.521	3.900	2.466
Goiás	226	181	277	345	270	281	348	414	440	532	525	411	441	500	458	578	505	246	351	460	553
Distrito Federal	0	0	1	1	0	2	0	14	2	10	1	30	30	56	58	32	50	35	15	27	55
<b>UF ignorada</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>...</b>	<b>1.033</b>	<b>1.013</b>	<b>887</b>	<b>1.299</b>	<b>1.106</b>	<b>71</b>	<b>105</b>	<b>157</b>	<b>142</b>	<b>156</b>	<b>102</b>	<b>85</b>	<b>82</b>	<b>81</b>	<b>118</b>
<b>Brasil</b>	<b>24.753</b>	<b>28.450</b>	<b>24.668</b>	<b>27.454</b>	<b>35.103</b>	<b>35.748</b>	<b>30.030</b>	<b>31.303</b>	<b>21.801</b>	<b>30.367</b>	<b>33.720</b>	<b>26.636</b>	<b>28.361</b>	<b>30.814</b>	<b>28.737</b>	<b>26.685</b>	<b>22.397</b>	<b>21.407</b>	<b>19.992</b>	<b>21.824</b>	<b>21.981</b>

Número de registros de casos de LTA. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas, 1990 a 2010.

Fonte: Sinan/MS.

## Agente Etiológico

Existem diversas espécies do parasita que podem atingir os humanos, causando duas formas distintas de leishmaniose: a primeira atinge pele e mucosas, já a segunda atinge vísceras (baço, fígado e medula óssea). Os dois subgêneros que agrupam os parasitas são *Leishmania* e *Viannia*, definidos pela localização dos promastigotas no tubo digestório do vetor (NEVES, 2009; HANDMAN, 1999; SILVEIRA, 2009). As espécies de *Leishmania* que podem atingir seres humanos e causam leishmaniose tegumentar são: *L. (V.) braziliensis*, (lesões cutâneas e mucosas, úlcera de Bauru); *L. (V) guyanensis*, (lesões cutâneas); *L. (L.) mexicana*, (lesões cutâneas e difusas); *L. (L.) amazonensis*, (lesões cutâneas e difusas), no Novo Mundo e *L. tropica* e *L. major*, causam lesões cutâneas no Velho Mundo. As leishmanioses viscerais são causadas por: *L. (L.) donovani* (Índia); *L. (L.) infantum*, no Velho Mundo e *L. (L.) chagasi* nas Américas (HANDMAN, 1999).

A espécie utilizada para este trabalho foi a *L. amazonensis*, que é pouco encontrada em seres humanos devido ao fato dos seus vetores *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. reducta* e *L. olmeca* apresentarem hábitos zoófilos mais acentuados (DIVE, 2008). A doença, que se manifesta principalmente na forma cutânea benigna, e mais raramente na forma cutânea difusa (comprometimento de extensa área de superfície cutânea, com predomínio de lesões não-ulceradas) e de difícil tratamento, é encontrada tanto no meio rural como nas cidades (REY, 2001; BARRAL et al., 1991, SILVEIRA, 2009).

### Ciclo de transmissão da *L. amazonensis*

O ciclo ocorre em áreas de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Fig.2) (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão), e também em Estados das regiões Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro – Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Na Figura 2 está representado o ciclo em floresta, e esquematizados o homem e os roedores silvestres do gênero *Proechimys* e o *Oryzomys*, dos quais o parasita foi isolado. Embora o papel desempenhado por estes animais silvestres no ciclo de transmissão não tenha sido bem definido, as evidências encontradas indicam estes roedores como reservatórios desta espécie de *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

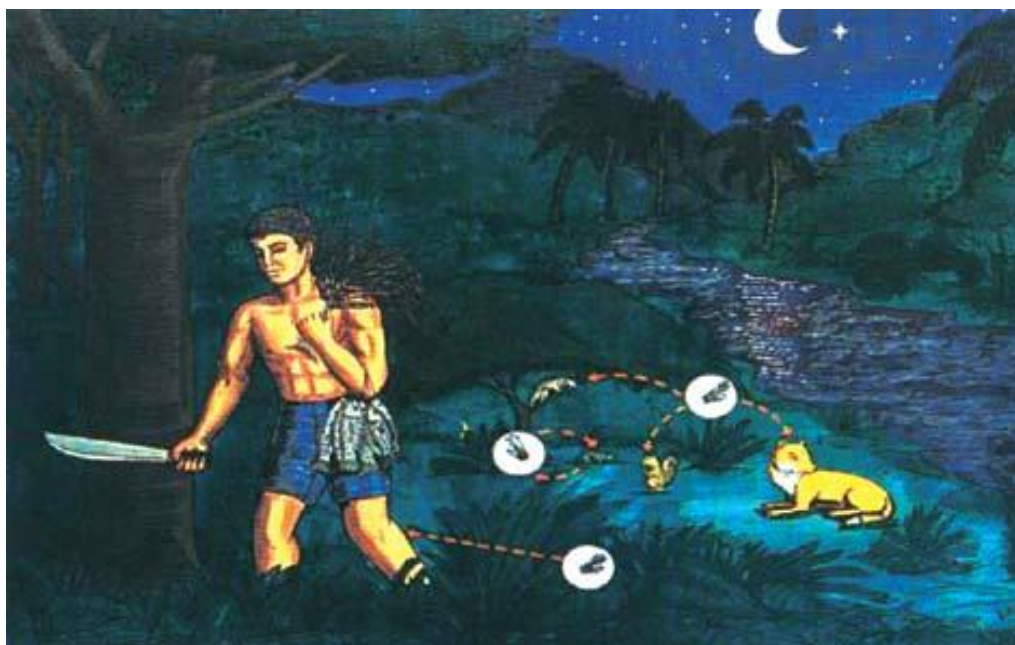


Figura 2. Ciclo de transmissão da *Leishmania amazonensis* na Amazônia brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

## **Diagnóstico Laboratorial**

Na prática médica, três são os recursos de laboratório para o diagnóstico de leishmaniose tegumentar: 1) pesquisa do parasita em esfregaço do material coletado das biópsias de lesões, e corado pelo método de Giemsa ou similar; 2) pesquisa do parasita em cortes histológicos das lesões, coletado da biópsia e corados pela hematoxilina-eosina e 3) intradermorreação de Montenegro, reação de hipersensibilidade do tipo tardia a antígenos do parasita. Outros recursos de pouco valor prático, porém de importância teórica são a cultura do material da biópsia em meios adequados para isolamento do parasito e a inoculação em animais suscetíveis à infecção. (MORAES, et al., 2008). Métodos de diagnóstico, baseados em técnicas imunológicas (imunofluorescência e imunoperoxidase) ou na biologia molecular (hibridação de DNA e PCR), são mais sensíveis que as técnicas tradicionais, porém exige uma infra-estrutura laboratorial adequada, de custo relativamente alto (REY, 2008).

## Tratamento

As leishmanioses não contavam com qualquer terapêutica até que Gaspar Vianna, em 1912, descobriu a ação curativa dos antimoniais (REY, 2008; RATH ET AL., 2003) Atualmente os fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose, utilizados há mais 50 anos, possuem diversos efeitos colaterais, com limitações para sua administração. Os fármacos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ). Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Há restrições para o tratamento de pacientes com idade acima dos 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de Chagas.

A resposta não sendo satisfatória os fármacos de segunda escolha são a Anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). O desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico poliênico com excelente atividade *in vitro* na destruição de promastigotas e amastigotas de *Leishmania*. É considerada como droga de primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Todavia, nesse tratamento ocorre frequentemente: febre, anorexia, náuseas, vômitos e flebite. Anfotericina B lipossomal é uma nova formulação em que a Anfotericina B é incorporada em lipossomas de fosfatidilcolina, colesterol e disterolfosfatidilglicerol. A meia-vida é curta, pois o fármaco é rapidamente seqüestrado pelos macrófagos no fígado e baço, onde atinge elevadas concentrações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). As pentamidinas são diamidinas aromáticas utilizadas como fármacos de segunda escolha no tratamento da

leishmaniose tegumentar em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano. As reações adversas provenientes do tratamento com pentamidinas são: dor, induração e abscessos estéreis no local da aplicação, além de náuseas, vômitos, tontura, adinamia, mialgias, cefaléia, hipotensão, lipotimias, síncope, hipoglicemia e hiperglicemia. Pode ocorrer efeito diabetogênico, que é cumulativo e dose dependente (MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNASA, 2000).

Os baixos resultados de eficácia do antimonial e pentamidina, bem como as dificuldades operacionais relacionadas à Anfotericina B, evidenciam a necessidade, urgente, de novas opções terapêuticas para o tratamento da LTA (NEVES et al., 2011). Outros fármacos, utilizados originalmente no tratamento de outras doenças, estão em estudos em vários países e também no Brasil, como por exemplo: a miltefosina, rhGM-CSF (recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), pentoxifilina e paramomicina (ALMEIDA et al., 2011).

Apesar de a leishmaniose tegumentar ser um importante problema de saúde pública, os dados publicados sobre o uso de novos compostos para o tratamento são limitados (ALMEIDA et al., 2011). Algumas pesquisas avaliaram, por exemplo, óleo de copaíba (SANTOS et al, 2008), peçonha de serpente (CASTILHOS, 2008), omeprazol (MIOT et al., 2005), pravastatina (KUCKELHAUS, 2011), extratos de plantas (como por exemplo, *Campsiandra laurifolia*) (CHAGAS et al., 2010), própolis (AYRES et al, 2007), porfirinas em terapia fotodinâmica (BASTOS et al., 2012) e compostos sintéticos tais como os organoclorados (LIMA ET AL., 2009). Os resultados variam entre efeitos tóxicos na forma promastigota de espécies de *Leishmania*, a efeitos de retardo no aparecimento de lesões nos modelos animais da leishmaniose tegumentar.

## Química Medicinal

A química medicinal é uma área de pesquisa que engloba a inovação, descoberta e o desenvolvimento de novas substâncias químicas bioativas, síntese ou modificação molecular, extração, isolamento, identificação e elucidação estrutural de princípios ativos naturais de plantas, animais ou minerais (ROCHA, 2010). A descrição das moléculas desde a sua constituição atômica, passando por relações estrutura-propriedade até suas características estruturais quando da(s) interação (ões) com alvos biológicos de interesse terapêutico também são aspectos trabalhados na química medicinal (ROCHA, 2010).

Ainda neste contexto, o laboratório do Dr. Carlos Alberto Montanari no Instituto de Química da USP de São Carlos (USP-IQ) vem trabalhando em aspectos formais e aplicações da química medicinal particularmente no âmbito das doenças tropicais (Doença de Chagas, leishmanioses e esquistossomose). Por exemplo, o uso de flavonóides como inibidores da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase do *Trypanosoma cruzi* (FREITAS et al., 2009). Esta proteína é uma enzima essencial na via da glicólise e da gliconeogênese, catalisando a fosforilação oxidativa do substrato gliceraldeído-3-fosfato em 1,3- bifosfoglicerato na presença de NAD<sup>+</sup> e fosfato inorgânico, sendo também capaz de catalisar a reação inversa (FREITAS et al., 2009; LEITÃO et al., 2009).

Uma vez que, a via glicolítica é a principal forma de obtenção de energia de tripanosomatídeos, e um alvo molecular atrativo para essa via energética teria um papel no controle do fluxo glicolítico do parasita. Entretanto, os sítios catalíticos da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase do *T. cruzi* e do ser humano apresentarem alto grau de similaridade, pois catalisam a mesma reação química, o grupo de pesquisa



(USP-IQ) busca por novas regiões distintas entre as duas proteínas capazes de acomodar ligantes com alta afinidade e potencial para inibição seletiva da enzima do parasita, através de um programa (SiteID) que identifica cavidades com características de sítios de interação na estrutura 3D de biomacromoléculas.

A utilização desta ferramenta é relevante quando se busca por prováveis sítios de interação para pequenas moléculas (ROCHA, 2010). A enzima, diidroorotato desidrogenase, é capaz de catalisar a conversão do diidroorotato em orotato, a quarta e única reação redox da via metabólica da síntese de novo nucleotídeos de pirimidina (CHELESKI et al., 2010; PINHEIRO, 2012). Os nucleotídeos de pirimidina são essenciais para síntese de DNA, RNA, biosíntese de lipídeos de membrana e glicolização de proteínas, além de outros eventos metabólicos (LOFFLER et al., 1997).

A identidade seqüencial entre a diidroorotato desidrogenase de tripanosomatídeos e a enzima humana é de aproximadamente 25%. As enzimas das diferentes espécies do gênero *Leishmania* compartilham identidade superior a 85%. Dentre as diferentes espécies do gênero *Trypanosoma* a identidade sequencial é maior que 75%; sendo este percentual, maior que 89% quando comparadas as diferentes espécies do *Trypanosoma* (PINHEIRO, 2012). Essa enzima também tem sido estudada no contexto da Química Medicinal, e através da combinação de técnicas de DNA recombinante, termofluor, cristalografia de raios-X e ensaios de inibição *in vitro* e *in silico*, identificou-se sítios alvos na estrutura da enzima para o desenvolvimento de ligantes em *L. major* e *T. cruzi* (PINHEIRO, 2012).

Além dos inibidores citados acima, também foram testados: enzimas da cadeia respiratória de *Saccharomyces*: scitalona desidratase, succinato desidrogenase (complexo II), adenosina-deaminase e hidroxinaftaleno redutase (SAINT-MARC, 2009),

a enzima cruzaina que é uma cisteína proteinase específica de *T. cruzi* (DUSCHAK & COUTO, 2009). Assim, a estratégia usada pelo grupo de pesquisa foi desenhar, purificar e sintetizar moléculas com o potencial de inibir gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e a diidroorotato desidrogenase e outras enzimas do metabolismo. Neste contexto, triagens biológicas resultaram na identificação de compostos de origem natural e sintética com atividade inibitória *in vitro* frente à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase do *T. cruzi*, ampliando a diversidade química de moduladores seletivos destes alvos.

Dentre os inibidores, o flavonóide tilirosídeo foi identificado através do planejamento baseado na estrutura 3D da molécula. Os ensaios espectrométricos e calorimétricos frente à gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase mostraram que o tilirosídeo inibe a enzima em concentrações baixas (IC<sub>50</sub>=46 mM, K<sub>i</sub>=25 mM). O ensaio de toxicidade do tilirosídeo contra tripomastigotas do *T. cruzi* da cepa Y foi positivo (IC<sub>50</sub> = 770 mM). Enquanto que, o único fármaco em uso benzonidazol, no tratamento da doença de Chagas, foi ativo na potência de 400 mM concentração elevada, segundo a Organização Mundial da Saúde (FREITAS et al., 2009; CHELESKI et al., 2011).

Considerando-se as semelhanças taxonômicas e a alta homologia (85-90%), tanto na sequência de aminoácidos quanto na análise genética e estrutura cristalográfica da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, entre *Leishmania* e *T.cruzi* (HANNAERT ET AL., 1998; BRESSI et al., 2001), existe possibilidades dos inibidores criados pelo grupo do Dr. Montanari apresentarem efeitos tóxicos para *L. amazonensis*.

Nosso objetivo, nesse trabalho, foi testar compostos com ação inibidora na atividade de enzimas do metabolismo, que também são expressas em *Leishmania*, em formas promastigotas e amastigotas da *L. amazonensis*.

## 2 – OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Testar inibidores enzimáticos sintéticos em *L. amazonensis*.

### Objetivos específicos

Avaliar a atividade tóxica dos compostos nas formas promastigotas.

Avaliar a atividade tóxica dos compostos em macrófagos infectados com o parasita.

Comparar os efeitos do tratamento dos inibidores enzimáticos com o tratamento utilizando a Anfotericina B (fármaco usado na clinica)

Avaliar a atividade tóxica dos compostos em macrófagos

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Lista de compostos utilizados e procedência

Anfotericina B .....	Sigma <sup>1</sup>
Geneticina .....	Sigma
Giemsa .....	Sigma
Meio de cultura Earle 199.....	Nutricell <sup>2</sup>
Soro fetal bovino .....	Nutricell

<sup>1</sup>Sigma Chemical Co, St Louis, Missouri, USA.

<sup>2</sup>Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil.

## **Animais**

Fêmeas de camundongos isogênicos BALB/c/AnUnib, com idade entre quatro e seis semanas, SPF (Specific Patogen Free), foram fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica – CEMIB/UNICAMP e mantidos no isolador do Departamento de Biologia Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Unicamp aprovou o uso dos animais e a realização desse trabalho (protocolo n. 2641-1).

## Parasitas

*L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foi transfectada com o gene da “green fluorescent protein” (GFP), e gentilmente cedida pela Dra. Bartira Rossi-Bergmann da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os amastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) foram obtidos em camundongos BALB/c/AnUnib previamente infectados subcutâneamente com cerca de  $10^7$  parasitas no coxim plantar (COSTA et al., 2011). Os promastigotas de *L. amazonensis*-GFP foram mantidos em estufa seca a 26°C em meio de cultura Earle 199 suplementado com L-glutamina 0,1g/L, D-glicose 1,0 g/L, NaHCO<sub>3</sub> 2,2 g/L, penicilina 10.000UI, e estreptomicina 0,050 g/L e acrescido de 10% de soro fetal bovino (inativado a 56°C durante 1 hora). Os parasitas foram selecionados periodicamente com o antibiótico geneticina (G418) (Sigma) (COSTA et al., 2011).

## **Fármaco e Inibidores**

Anfotericina B foi diluída em meio de cultura 199, e utilizada na concentração de 3  $\mu$ M para o tratamento de culturas de promastigotas e macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

Os compostos sintetizados no Instituto de Química da USP de São Carlos no laboratório do Dr. Carlos Montanari, pelo Dr. Josmar Rodrigues da Rocha foram denominados de ID (Inibidor). Os seguintes IDs foram testados: ID01S, ID02S, ID16, ID42, ID71, ID71S, ID130S, ID185, ID186, ID 187, ID188, ID 189, ID190, ID191, ID 192, ID 193 e ID195. Os compostos foram liofilizados, acondicionados e conduzidos ao laboratório de Leishmaniose do Depto. de Biologia Animal do IB/Unicamp. No laboratório de Leishmaniose os compostos foram dissolvidos em DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma) (0,15%), diluídos em meio de cultura, filtrados com filtros Millipore 0,22  $\mu$ m (quando usados em ensaios com macrófagos) e utilizados imediatamente.

No quadro abaixo, os compostos testados com a sua respectiva fórmula molecular, massa molecular e alvo enzimático.

**TABELA 2. Inibidores utilizados no parasita *L. amazonensis***

Composto	Formula molecular	Massa molecular (g/mol)	Alvo enzimático	Atividade <i>T. cruzi</i> (Tripomastigota) (uM)
015	C13H10N2O3	242,23	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	Nd*
025	C13H12N2O3	244,25	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	Nd*
16	C17H15N3O2S	325,39	Gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	53,4
42	C22H27N6O2S2	471,62	Cruzaina ( <i>T. cruzi</i> )	22,9
71	C11H8N2O4	232,19	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	19,8
715	C11H8N2O4	232,19	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	19,8
1305	C11H8N2O3S	248,26	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	Nd*
185	C15H18Cl2N2O2	329,22	Scitalona desidratase (fungos)	> 125
186	C13H24N4O3S	316,42	Adenosina deaminase (fungos)	Nd*
187	C12H13NO2S	235,30	Succinato desidrogenase (Complexo II) (fungos)	42,9
188	C18H12Cl2N2O	343,21	Adenosina deaminase (fungos)	> 125
189	C17H16F3NO2	323,31	Succinato desidrogenase (Complexo II) (fungos)	Nd*
190	C17H19NO2	269,34	Succinato desidrogenase (Complexo II) (fungos)	64,1
191	C12H13NO4S	267,30	Succinato desidrogenase (Complexo II) (fungos)	Nd*
192	C14H20N3O5PS	373,36	Scitalona desidratase (fungos)	Nd*
193	C11H11NO	173,21	Hydroxinaftaleno redutase (fungos)	Nd*
195	C12H10N2O4	246,21	Diidroorotato desidrogenase ( <i>T. cruzi</i> )	32,3 uM

\*Não determinado



### **Ensaio de toxicidade dos compostos em culturas de promastigotas de *L. amazonensis***

Dez milhões de promastigotas por poço de placa de 96 poços foram incubados em estufa seca a 26°C com os IDs durante 2, 24 ou 48 horas. Como controle positivo foi utilizado Anfotericina B (3 µM) (AYRES, 2007) e como controle negativo meio de cultura e DMSO na concentração final de 0,15% (concentração final semelhante de DMSO dos poços com os compostos IDs). A contagem dos parasitas foi realizada em câmara de Neubauer. Paralelamente, a fluorescência dos promastigotas-GFP cultivados e tratados em microplacas pretas foi medida em espectro-fluorimêtro (excitação: 485nm, emissão: 528nm) Multi-Detection Microplate Reader- Synergy HT, Bio-Tek, (USA), (COSTA et al., 2011).

### **Ensaio de toxicidade dos compostos em culturas de macrófagos peritoneais murinos infectadas com amastigotas de *L. amazonensis***

Os macrófagos peritoneais foram coletados de fêmeas de camundongos BALB/c eutanasiadas e, o número de células do exsudato peritoneal foi contado em câmara de Neubauer, considerando-se que 50-60% das células obtidas são macrófagos (BARBIERI ET AL., 1993; AYRES, 2007). Utilizando-se placas de 24 poços, contendo lamínulas redondas de 13 mm de diâmetro previamente esterilizadas, cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos foram incubados durante 2 horas a temperatura ambiente. Após a adesão dos macrófagos nas lamínulas o exsudato foi retirado e adicionou-se meio de cultura 199. A cultura foi mantida em estufa incubadora a 37°C, e 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> (COLHONE et al., 2004; ARRAIS-SILVA et al., 2005 b). Após algumas horas, as culturas celulares foram infectadas com cerca de 3 amastigotas para cada macrófago (isolados de lesões

de camundongos, ver item “parasitas”), e incubadas durante 1 hora em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> a 37°C. Após este período o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura fresco e os compostos a serem testados. As culturas foram mantidas durante mais 24 horas em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> a 37°C. Para a avaliação do número de células, de parasitas e a porcentagem de infecção, as lamínulas com os macrófagos aderidos e infectados foram fixadas em metanol (10 min.) e coradas com Giemsa (10 min.) (GIORGIO & BARÃO, 1998) e avaliados em microscópio óptico.

### **Ensaio de toxicidade dos compostos em macrófagos peritoneais murinos**

Os macrófagos peritoneais foram obtidos das fêmeas de camundongos BALB/c foram isolados e cultivados como no item “Ensaio de toxicidade dos compostos em amastigotas de *L. amazonensis* infectando macrófagos peritoneais murinos.” Entretanto, as culturas celulares não foram infectadas, mas apenas tratadas com os compostos IDs durante 24 horas em estufa úmida com 5% CO<sub>2</sub>, 21% O<sub>2</sub> a 37°C. As lamínulas com os macrófagos foram fixadas em metanol (10 min.) e coradas com Giemsa (10 min.) (GIORGIO & BARÃO, 1998). Cerca de 20 campos de cada lamínula foram contados e avaliados em microscópio óptico.

## **Análise estatística**

Os dados foram analisados usando o software Statistica<sup>®</sup> versão 6.0. A análise de variância (ANOVA) de duas vias e o teste de Tukey para comparações múltiplas. Os valores foram considerados estatisticamente diferentes quando o valor de p era menor ou igual a 0,05.

## 4 – RESULTADOS

Nesse trabalho foi utilizada a *L. amazonensis* transfectada com o gene da GFP. Esse parasita é semelhante ao parasita não transfectado em relação à morfologia, infectividade, capacidade proliferativa e de diferenciação (COSTA et al., 2011), e foi usado nos ensaios, porque a quantificação de sua fluorescência pode confirmar os resultados de contagens de número de parasitas, realizadas em microscópio óptico. De fato, a diminuição do número de parasitas, observada em poços tratados com o fármaco anti-*Leishmania*, Anfotericina B, correlaciona-se positivamente com a diminuição da fluorescência dos parasitas tratados, detectada no espectro-fluorimêtro (Figura 3). A concentração de 2,8 ug/mL de Anfotericina B (3  $\mu$ M) foi utilizada nos experimentos seguintes.

Os 17 compostos IDs foram testados quanto à capacidade de matar promastigotas e impedir seu crescimento (Figuras 4 a 20). Os compostos foram introduzidos no meio de cultura com promastigotas e depois dos tempos assinalados nas figuras, foi contabilizado o número de parasitas. A observação dos parasitas, imediatamente depois do tratamento com os IDs, não indicou mudanças morfológicas (dado não mostrado) e alteração no número de promastigotas. Os tempos de cultura de 2, 24 e/ou 48 horas foram então escolhidos para os ensaios, pois permitiram a análise do possível efeito dos IDs na viabilidade e na capacidade proliferativa dos promastigotas. Em todos os ensaios os promastigotas foram também tratados com o solvente utilizado para dissolver os IDs, DMSO, na concentração final de 0,15%. Os resultados mostraram que essa concentração de DMSO não é tóxica para os parasitas

nem impede seu crescimento, quando as culturas de promastigotas são avaliadas as 2, 24 e 48 horas de incubação.

Os resultados demonstraram que vários dos compostos testados não têm ação tóxica em promastigotas. Os tratamentos com IDs: 01S, 02S, 16, 42, 71, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192 e 193 com concentrações que variaram entre 25 e 200  $\mu\text{M}$  não alteraram o número de parasitas, após os tempos de 2, 24 e 48 horas. Em todos os ensaios os parasitas mantiveram-se viáveis e móveis, e com capacidade proliferativa. Por exemplo, na figura 5A pode-se observar que o número de parasitas tratados com diferentes concentrações de ID 02S é semelhante ao número de parasitas não tratados (0,15% DMSO) tanto às 24 horas quanto às 48 horas de cultivo. Anfotericina B, foi tóxico para os parasitas, às 24 horas:  $0,3 \times 10^7$  promastigotas/ml versus  $4,1 \times 10^7$ /mL promastigotas sem tratamento e às 48 horas:  $1,0 \times 10^7$  promastigotas/ml versus  $4,4 \times 10^7$  promastigotas/ml. Os resultados de detecção de fluorescência dos parasitas *L. amazonensis*-GFP confirmam os dados obtidos pelas contagens em microscópio óptico, isto é, fluorescência semelhante foi detectada em promastigotas tratados e não tratados com ID 02S e fluorescência reduzida em culturas de promastigotas tratados com Anfotericina B (Figura 5B). Resultados semelhantes foram observados com ID 71, isto é, os parasitas não morreram em contato com o composto e foram capazes de proliferar durante 48 horas (sem tratamento 2 horas:  $1,2 \times 10^7$  promastigotas/ml, 24 horas:  $3,6 \times 10^7$  promastigotas/ml e 48 horas  $4,2 \times 10^7$  promastigotas/ml e tratados com ID 71 100  $\mu\text{M}$  2 horas:  $1,2 \times 10^7$  promastigotas/ml, 24 horas:  $3,65 \times 10^7$  promastigotas/ml e 48 horas  $4,1 \times 10^7$  promastigotas/ml (Figura 8). Os parasitas cresceram cerca de 120% tanto em culturas tratadas com DMSO 0,15% como tratadas com ID 71.

Interpretações semelhantes, isto é, nenhuma toxicidade e inibição da proliferação dos promastigotas, podem ser feitas para os resultados dos ensaios com os IDs 01S, 16, 42, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192 e 193 (Figuras 4, 6, 7, 8, 11 a 19).

Uma alternativa utilizada para avaliar os dados aqui apresentados, são gráficos dos perfis de número médio de promastigotas/ml ao longo do tempo, para cada tratamento com os compostos. Como pode ser observado na Figura 21, não há evidências de qualquer efeito dos tratamentos, quando levamos em consideração os diferentes tempos de cultivo com os compostos. Dados semelhantes foram observados para os IDs 01S, 02S, 16, 42, 71, 130, 185, 187 e 190.

É possível concluir que os compostos citados acima não foram tóxicos para os promastigotas de *L. amazonensis*-GFP.

Os ensaios com promastigotas e três dos inibidores da enzima Diidroorotato desidrogenase de *T. cruzi* mostraram resultados positivos e com padrão de curva dose-resposta, apesar de estatisticamente somente dois deles mostrarem resultados significativos (ID 71S e ID 130S). O composto ID 71S (Figura 9) reduziu o número de parasitas em 25 a 30% (25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M) as 24hs de tratamento. E essa toxicidade se manteve as 48hs; 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de ID 71S reduziram o número de parasitas em 15%, 20% e 40%, respectivamente (Figura 9). O composto ID 130S (Figura 10) foi tóxico, e reduziu o número de promastigotas em 24%, com 25  $\mu$ M, 40% (50  $\mu$ M) e 42% (100  $\mu$ M) após 24hs de tratamento. O número de parasitas continuou a diminuir as 48h de tratamento, 30%, 28% e 36% com 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, respectivamente (Figura 10). O composto ID 195 (Figura 20) também apresentou tendência a apresentar atividade tóxica, reduzindo o número de parasitas em torno de 40% (25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M) e em 60% com 100  $\mu$ M, após 24hs. Com 48hs de tratamento, a

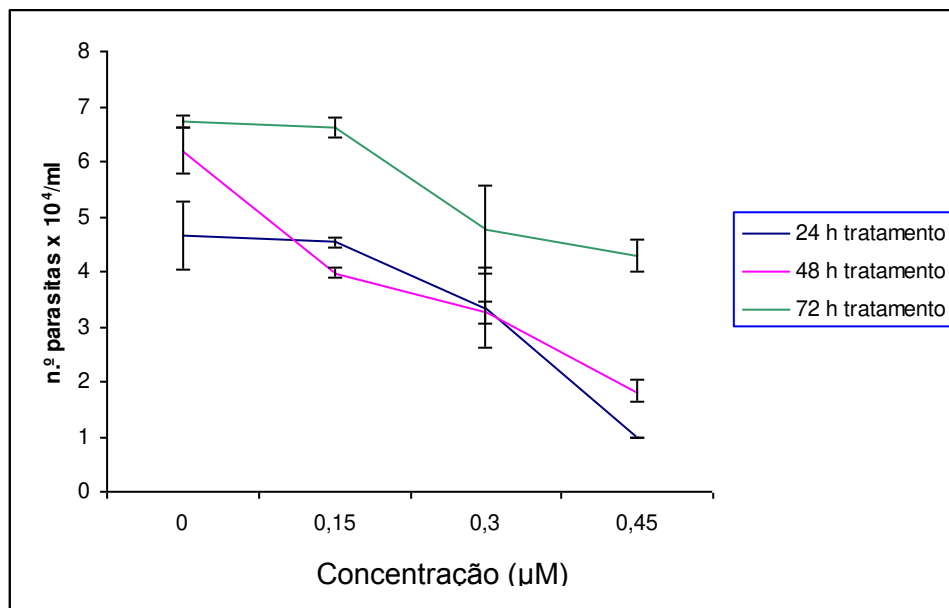
redução do número de parasitas foi de 34%, 50% e 84% com 25, 50  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente, indicando que o composto é tóxico e os parasitas que não morreram tem dificuldade em proliferar (Figura 20). Nesses ensaios, os resultados obtidos no espectro-fluorimetro com os parasitas correlacionam-se com aqueles resultados de contagens de promastigotas, isto é, observa-se diminuição da fluorescência nos parasitas tratados com ID 195, comparando-se a parasitas tratados com DMSO (Figura 20) E nesses ensaios, como nos anteriores, o tratamento com Anfotericina B, reduziu em cerca de 60% - 70% os promastigotas das culturas após 24hs e 48hs (Figura 20)

Após a avaliação dos efeitos dos compostos em promastigotas, e a seleção de IDs, estes foram testados em culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Nesses ensaios a capacidade citotóxica, de entrar em células de mamífero e agir sobre amastigotas foram avaliadas. Primeiramente, foram observados os aspectos morfológicos, distribuição e número dos macrófagos em culturas tratadas com os compostos. Os resultados mostrados na figura 22 foram obtidos da contagem das células em 20 campos (aumento 1000X); quando as culturas não foram tratadas ou foram incubadas com DMSO (0.05%) cerca de 60-80 células foram contadas. Quando as culturas foram incubadas com ID 130 nas concentrações de 450, 225 e 112  $\mu\text{M}$  o número de células em 20 campos foi de 0, 13 e 9, respectivamente, indicando que o composto foi bastante tóxico para os macrófagos. Resultados semelhantes foram obtidos para ID 71S, nas dosagens de 450, 225, e 112  $\mu\text{M}$  a média foi de 1, 10,3 e 15 células encontradas em 20 campos analisados, respectivamente. Estes dados confirmaram as observações das culturas em microscópio invertido (dados não mostrados) que indicavam culturas tratadas com menos células e com “debris”. É interessante notar que em culturas de macrófagos tratadas com Anfotericina B, também

se observa um número menor de células em 20 campos quando comparado com o controle e DMSO (Figura 22). Quando avaliamos a porcentagem de infecção e o número de amastigotas intracelulares, os dados indicam que culturas sem tratamento ou tratadas com DMSO têm cerca de 70% de macrófagos infectados e 5 a 6 amastigotas por macrófago (Figura 23). O composto ID 130S reduziu a infecção dessas culturas, mas foi tóxica para os macrófagos. Entretanto, parte reduzida daqueles que continuavam vivos (cerca de 10%) estavam infectados, indicando que o composto penetrou nos macrófagos matando várias células, mas que muitas delas que continuaram vivas, estavam com menor número de amastigotas (Figura 23, ID 130 225  $\mu\text{M}$ .) Em relação aos efeitos de ID 71S, os resultados não indicaram redução da infecção em nenhuma das doses testadas, apesar da toxicidade para os macrófagos. (Figura 23). O composto ID 195 foi tóxico para os macrófagos nas concentrações mais altas (450, 225 e 112  $\mu\text{M}$ ) (Figura 24). Em outro experimento demonstrou-se que em concentrações menores (56, 28 e 14  $\mu\text{M}$ ) o ID 195 não foi tóxico para macrófagos, mas também não reduziu o número de amastigotas no interior dos macrófagos (Figura 25 A e B. Figura 26).



A



B

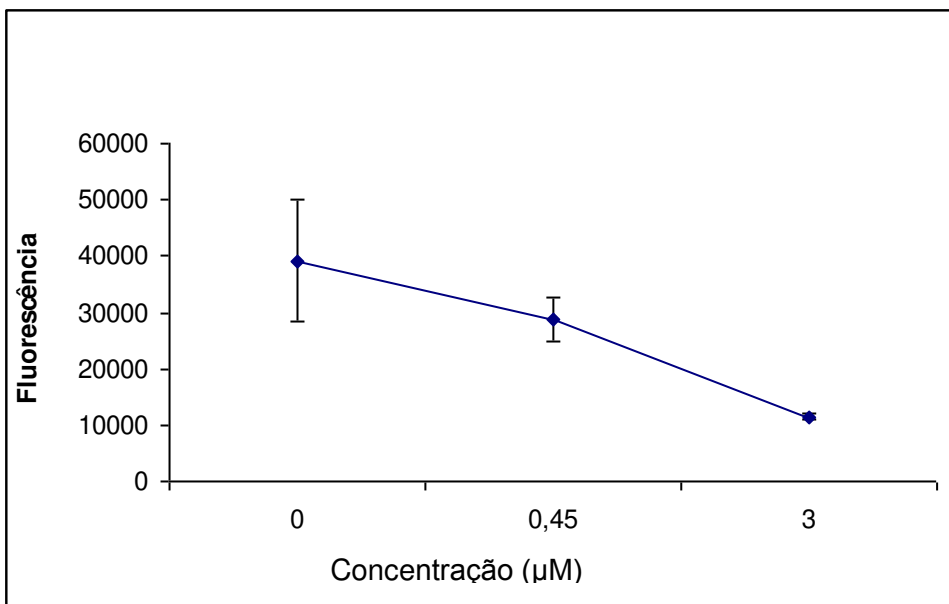


Figura 3. Efeito da Anfotericina B em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $5 \times 10^4$ /poço) tratados com Anfotericina B com diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência de parasitas ( $10^7$ /poço) tratados durante 24 horas, foi avaliada em espectro-fluorímetro.

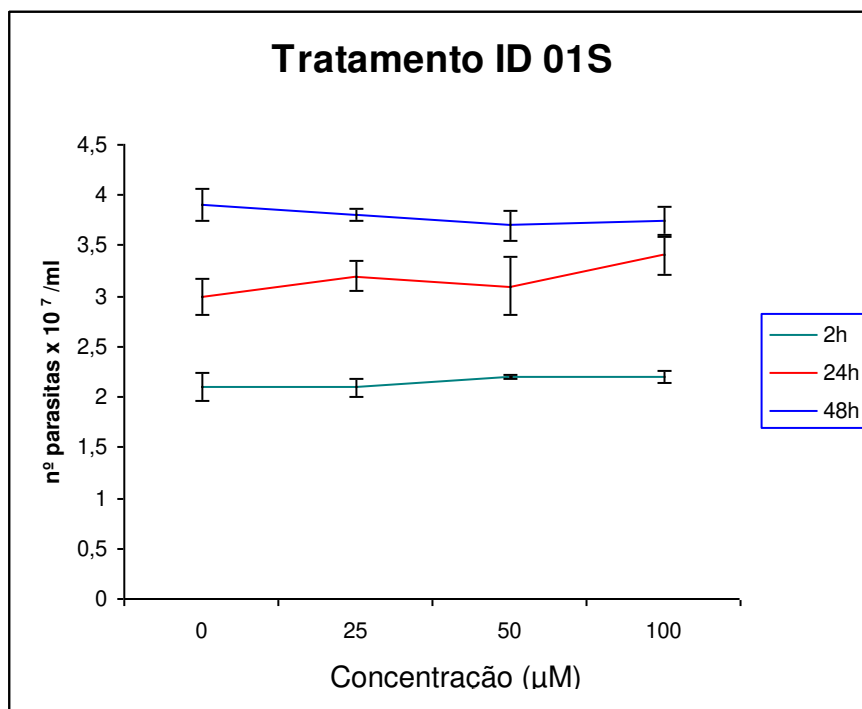
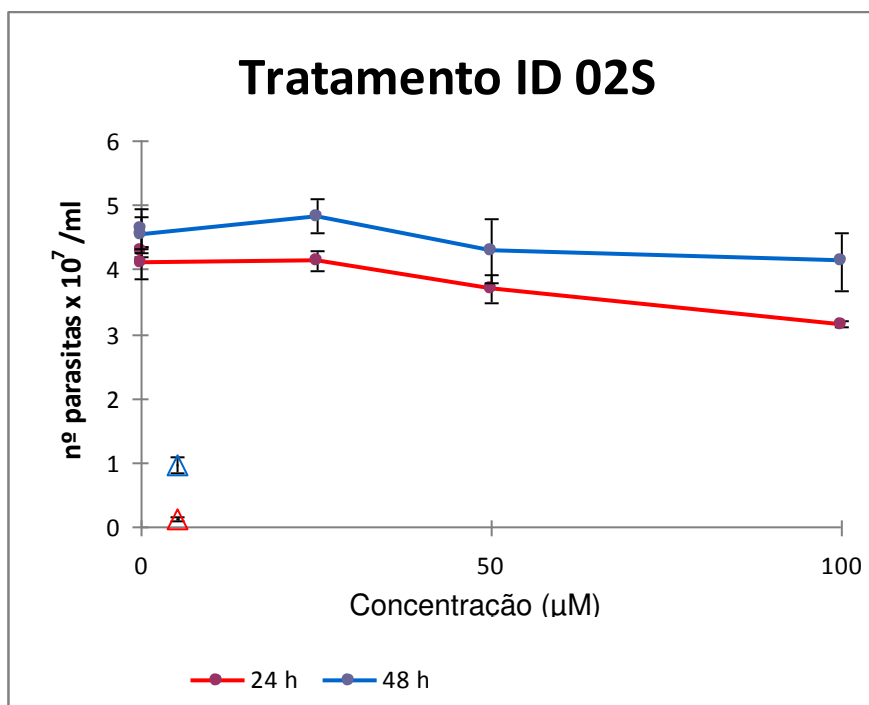


Figura 4. Efeito do composto ID 01S em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15% (0  $\mu$ M ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

A



B

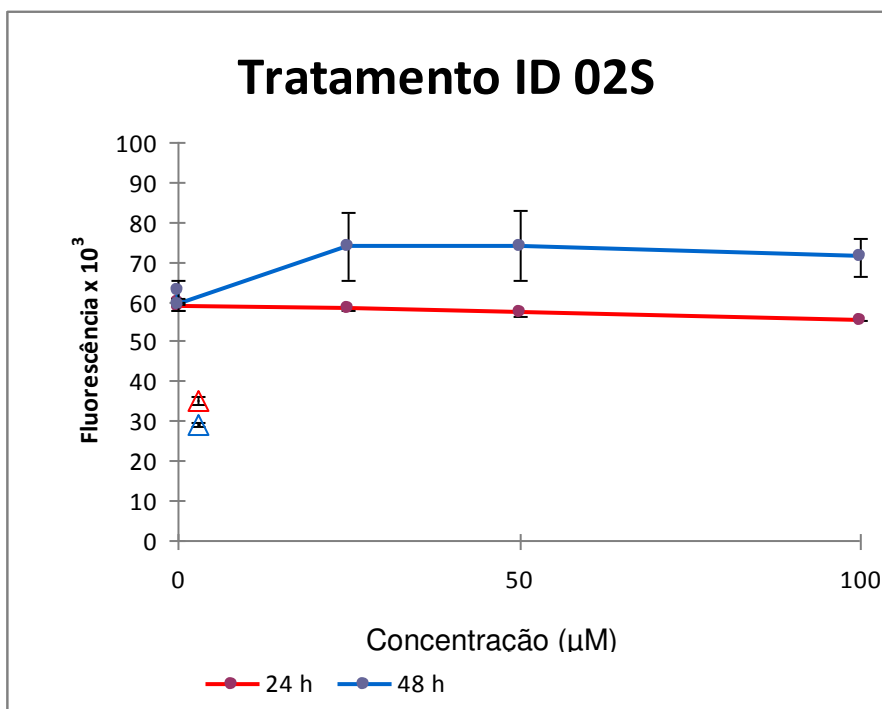


Figura 5. Efeito do composto ID 02S em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com o DMSO 0,15% (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu$ M durante 24 horas (triângulo vermelho) e 48 horas (triângulo azul).

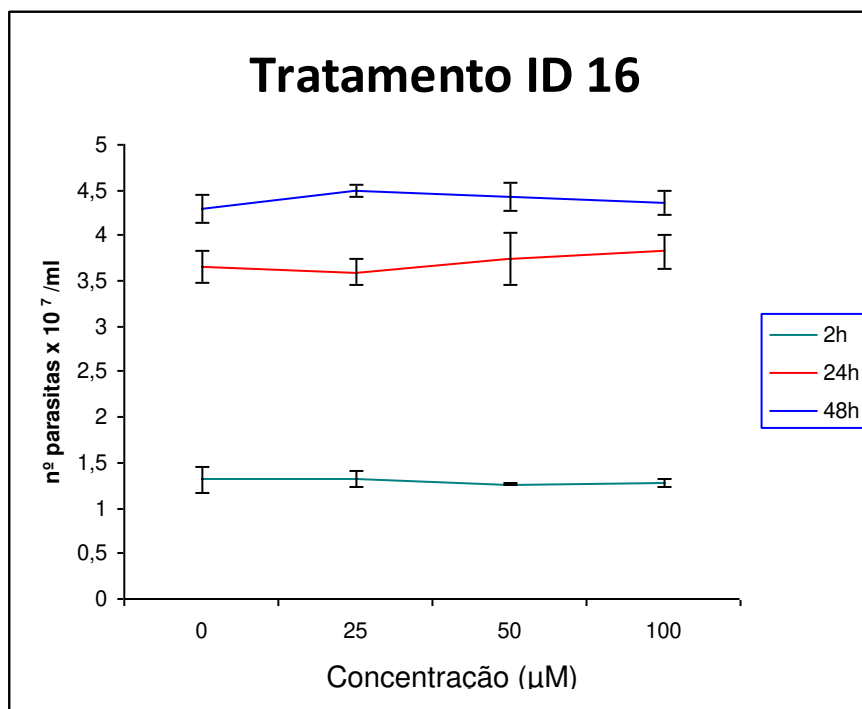
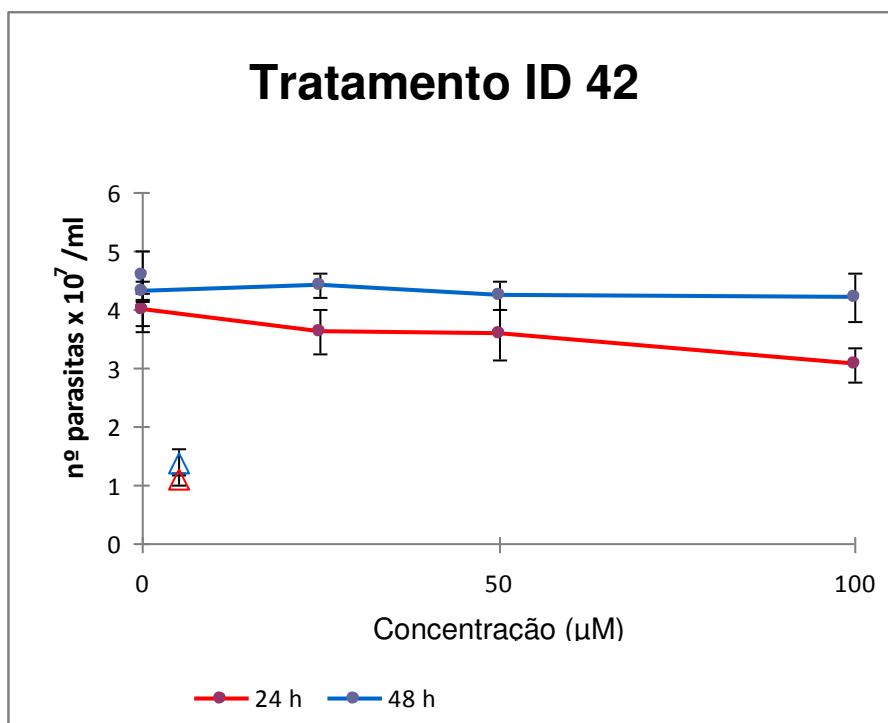


Figura 6. Efeito do composto ID 16 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15% (0  $\mu$ M ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

A



B

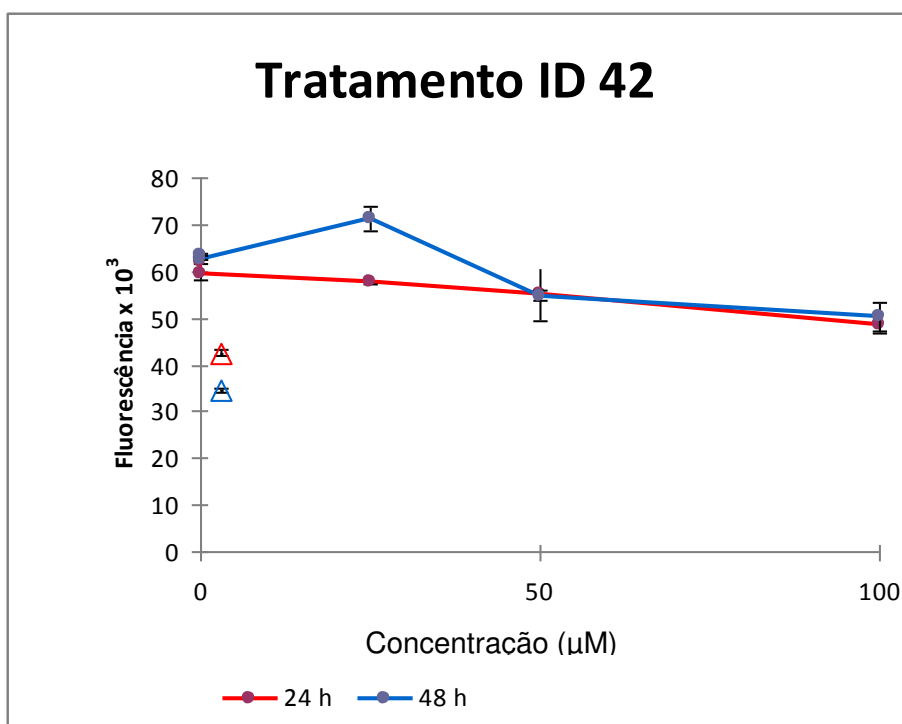


Figura 7. Efeito do composto ID 42 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 (0  $\mu\text{M}$ ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu\text{M}$  durante 24 horas (triângulo vermelho) e 48 horas (triângulo azul).

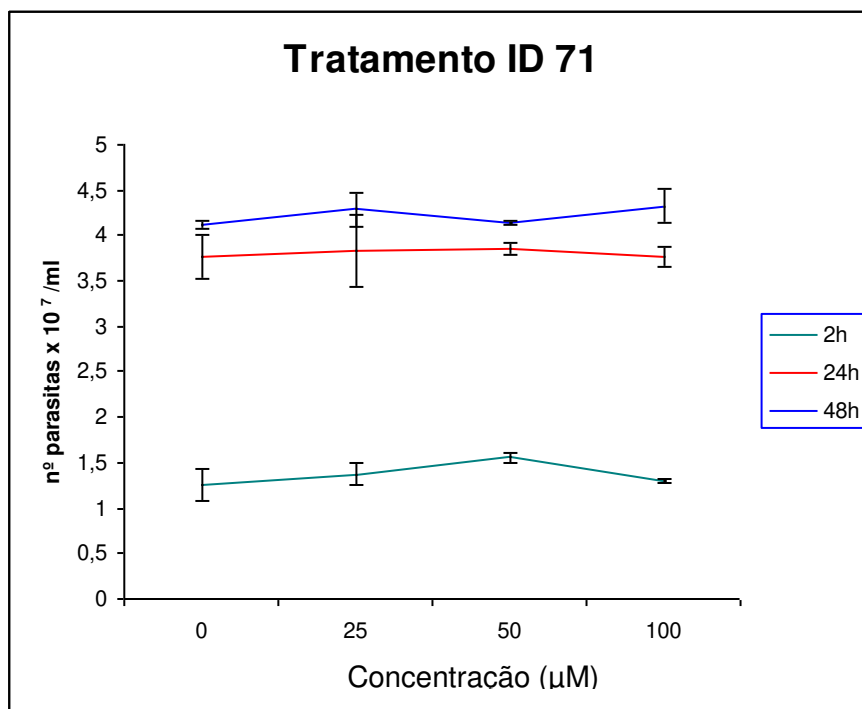


Figura 8. Efeito do composto ID 71 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

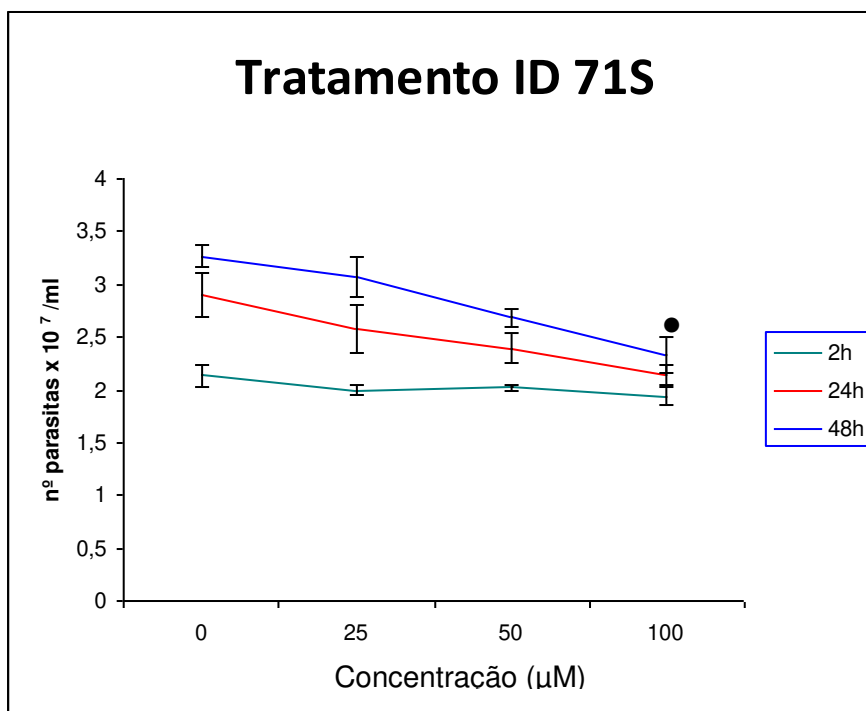


Figura 9. Efeito do composto ID 71S em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

- Tukey:  $p < 0,05$ .

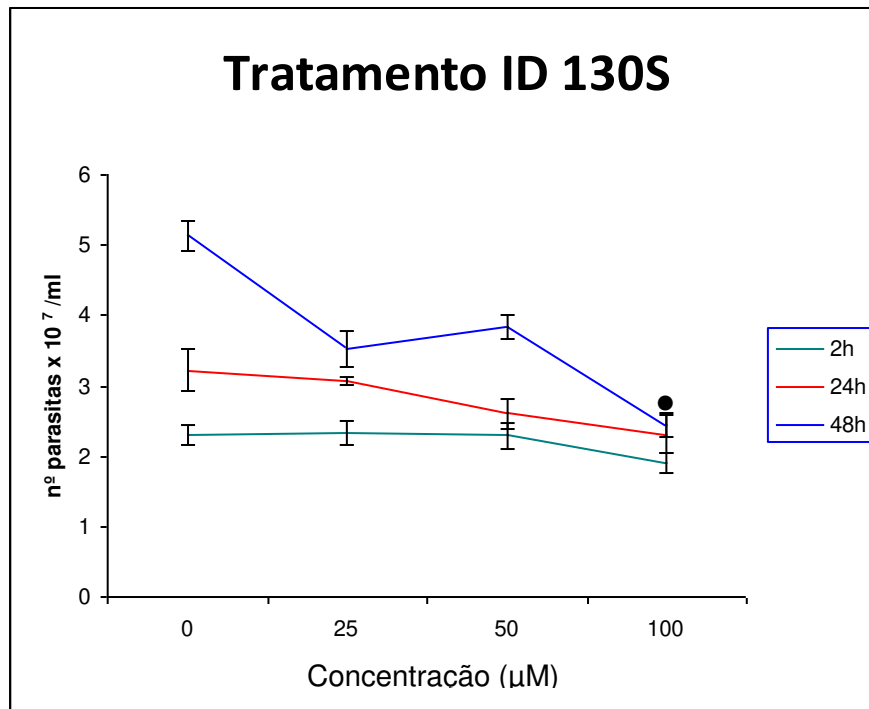


Figura 10. Efeito do composto ID 130S em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

- Tukey:  $p < 0,05$ .



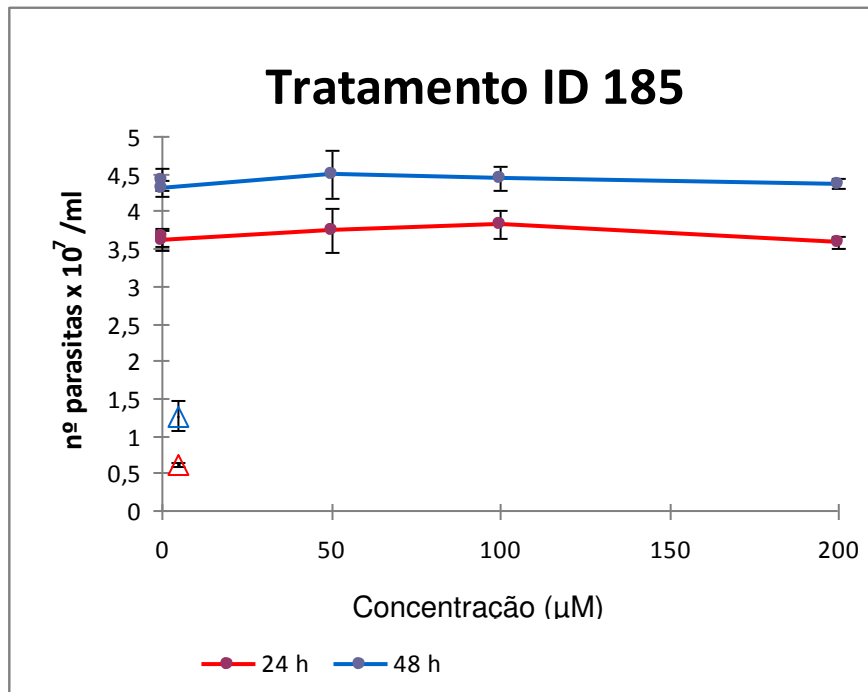


Figura 11. Efeito do composto ID 185 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0 µM ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. Anfotericina B 3 µM durante 24 horas (triângulo vermelho) e 48 horas (triângulo azul).

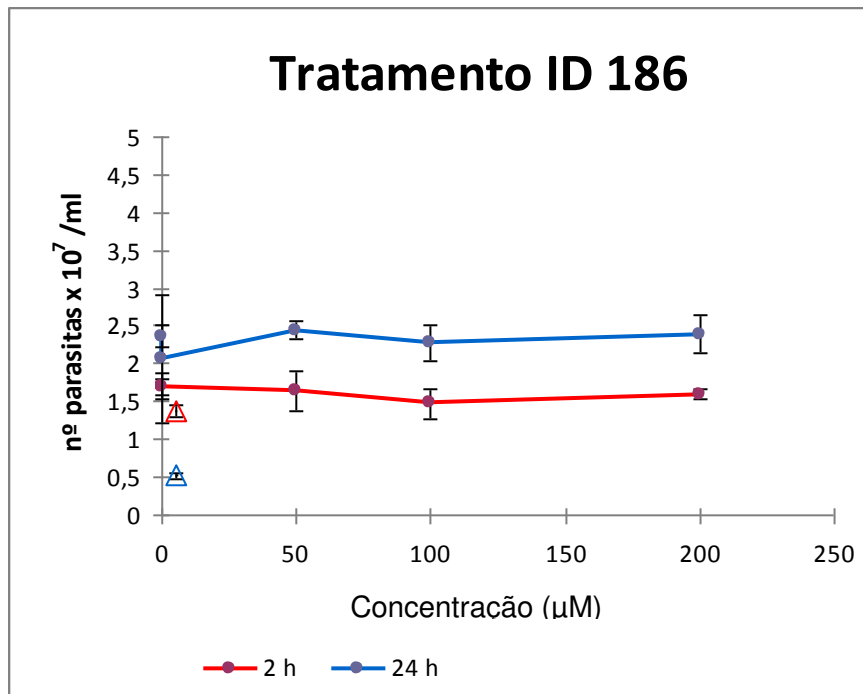
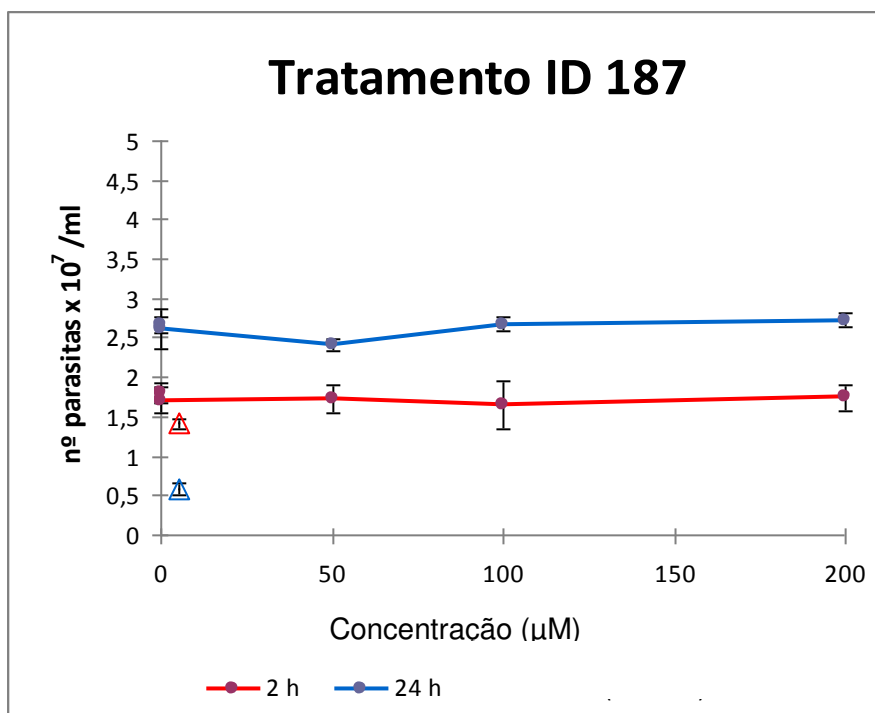


Figura 12. Efeito do composto ID 186 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. Anfotericina B 3  $\mu$ M durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

A



B

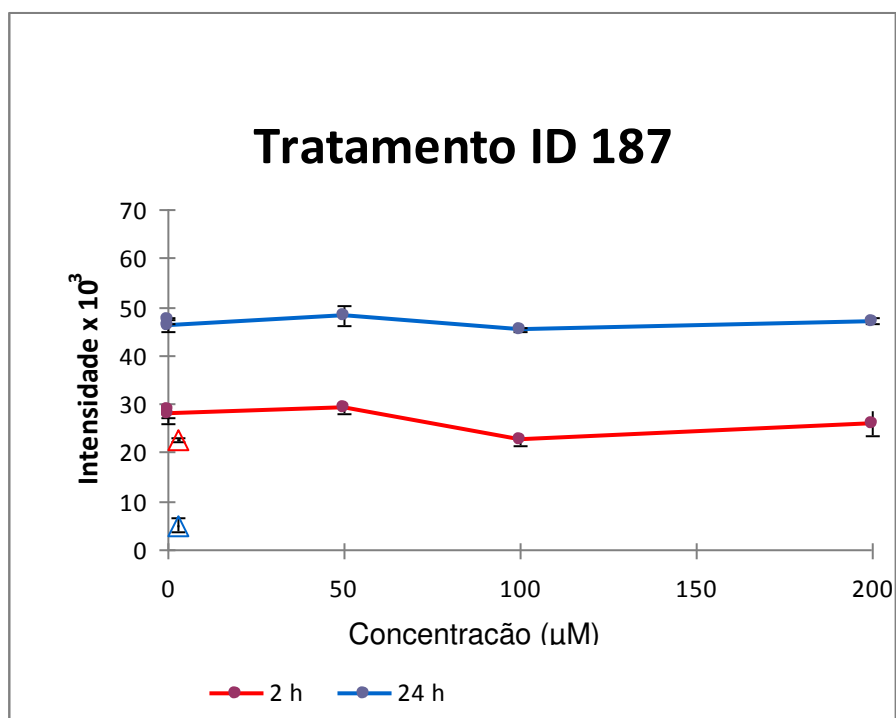
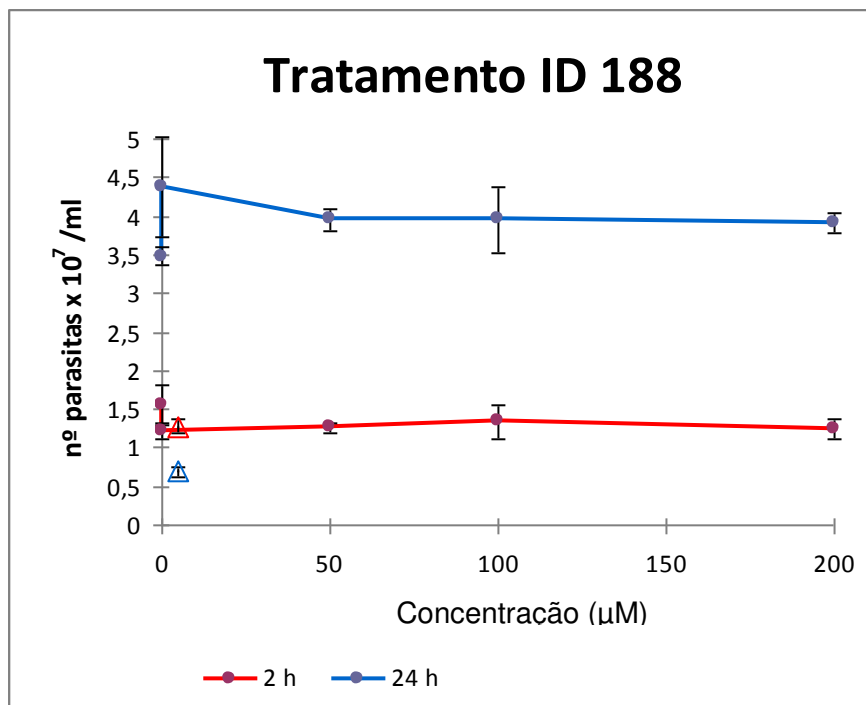


Figura 13. Efeito do composto ID 187 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu\text{M}$ ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3 $\mu\text{M}$  durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

A



B

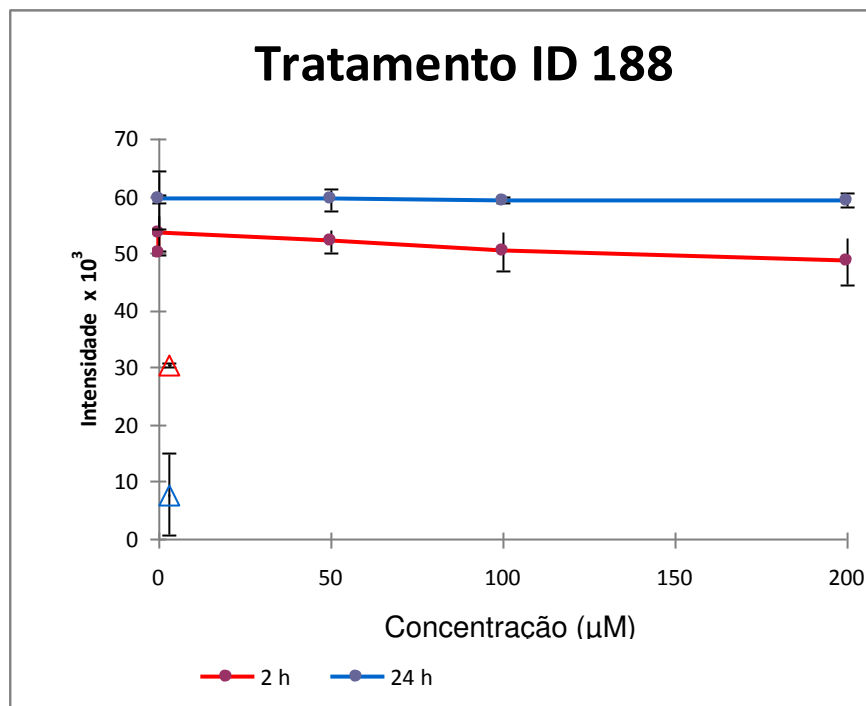


Figura 14. Efeito do composto ID 188 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % ( 0  $\mu\text{M}$  ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu\text{M}$  durante 2 horas (triângulo vermelho) e 48 horas (triângulo azul).

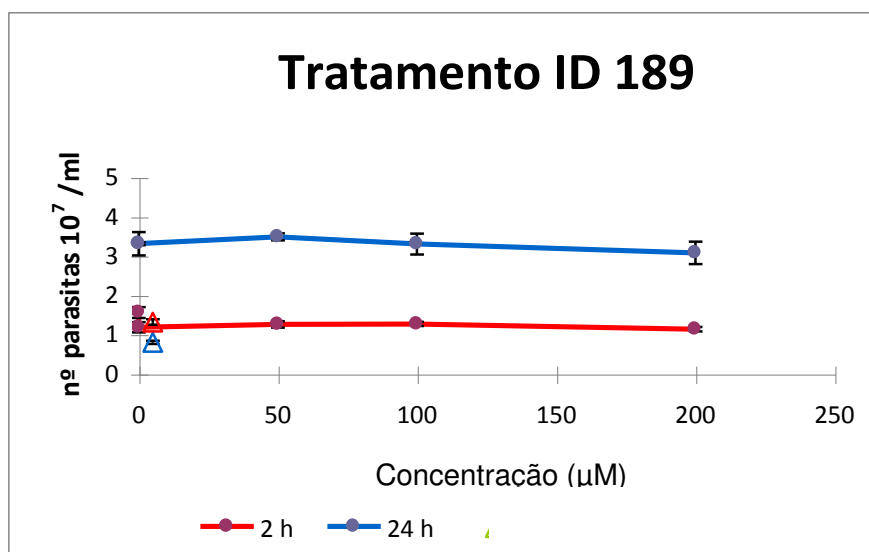
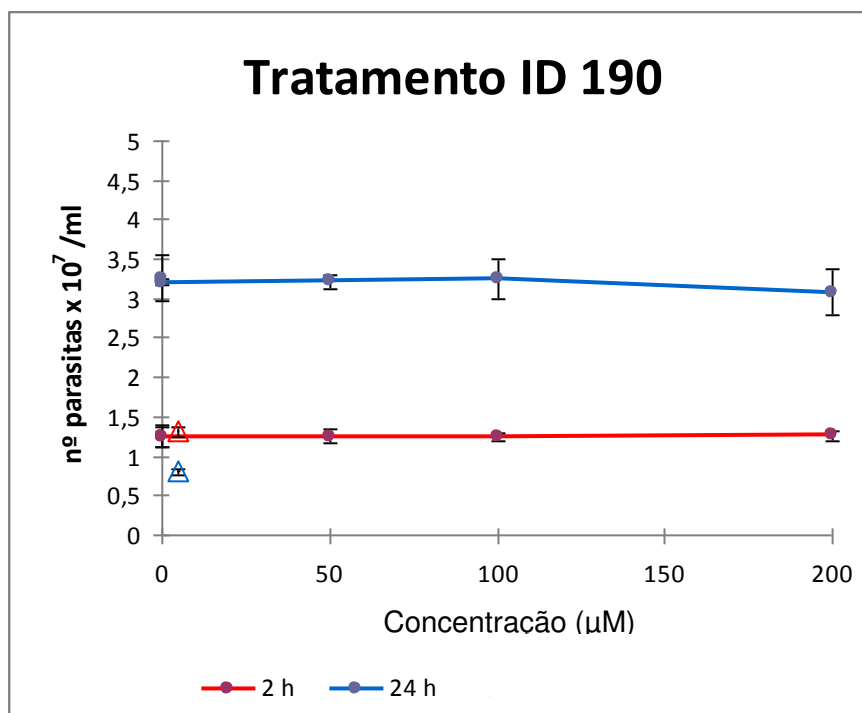


Figura 15. Efeito do composto ID 189 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico.

A



B

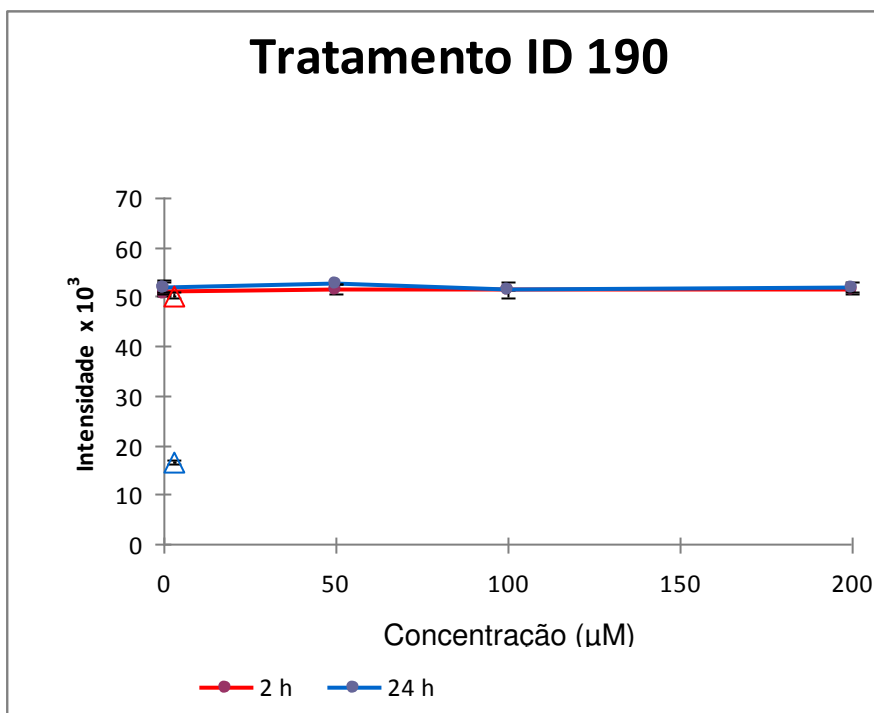


Figura 16. Efeito do composto ID 190 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu\text{M}$ ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu\text{M}$  durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

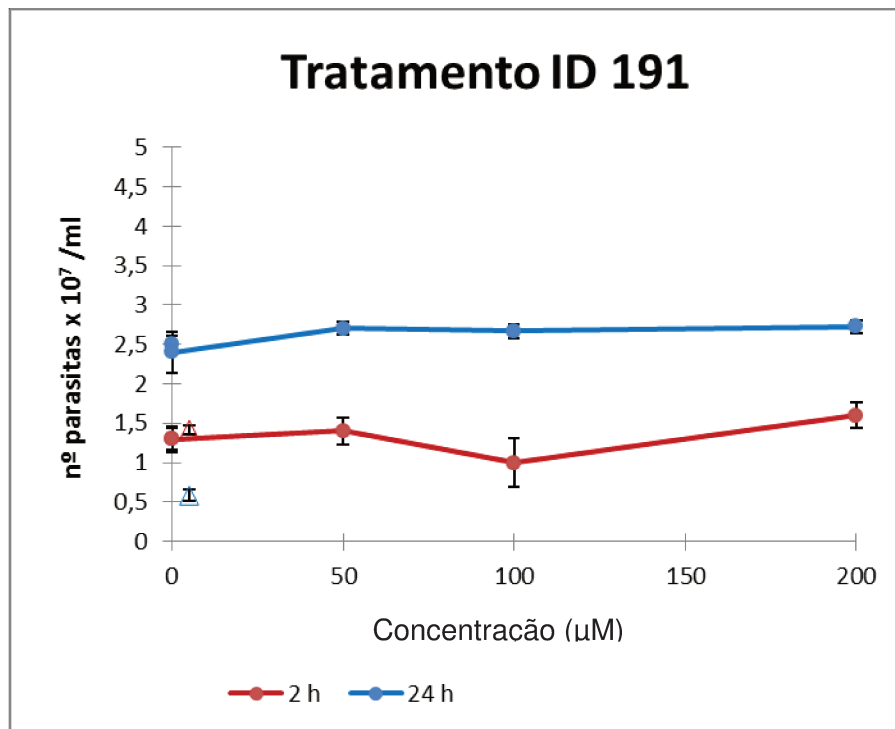
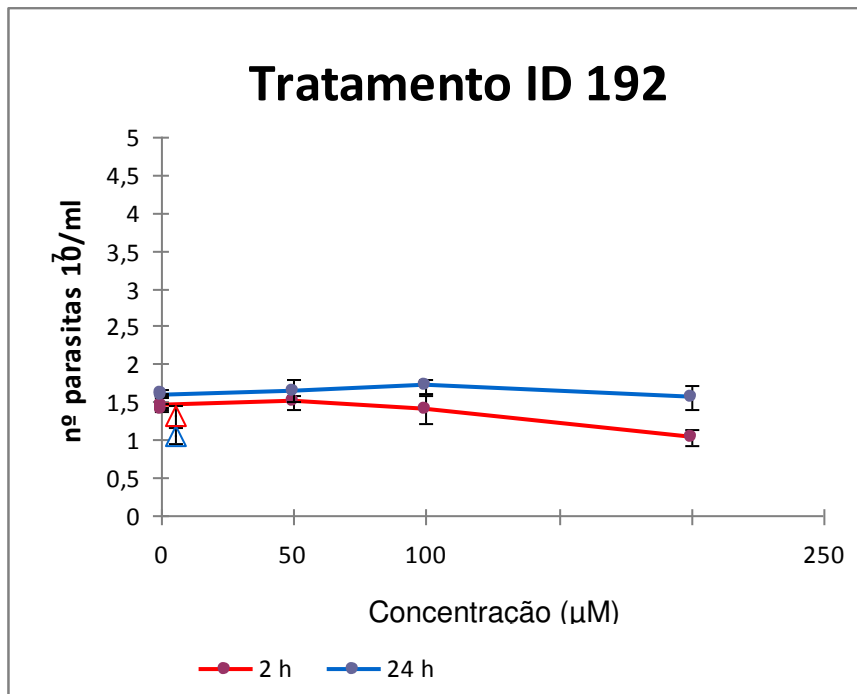


Figura 17. Efeito do composto ID 191 em promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. Anfotericina B 3  $\mu$ M durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

A



B

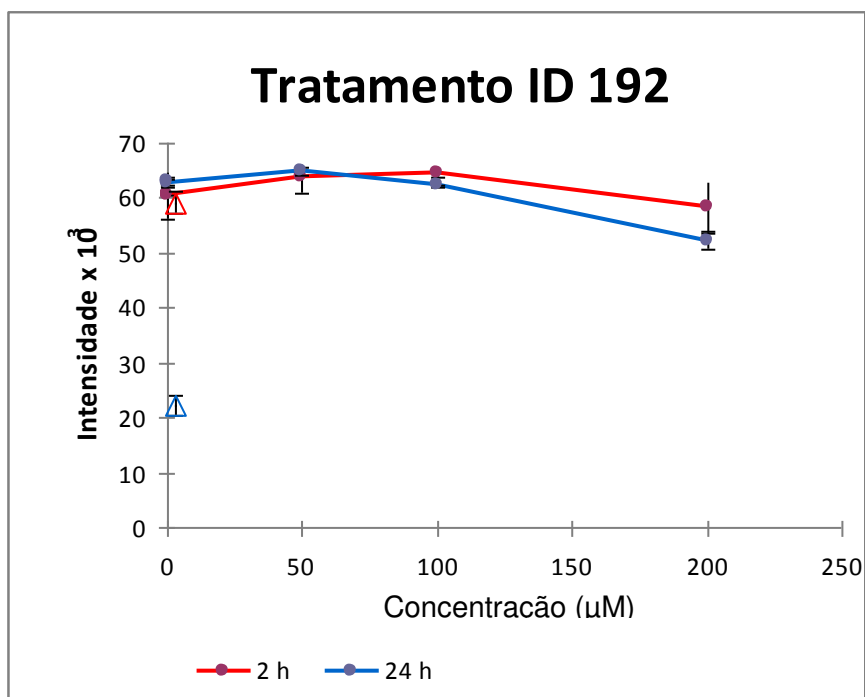
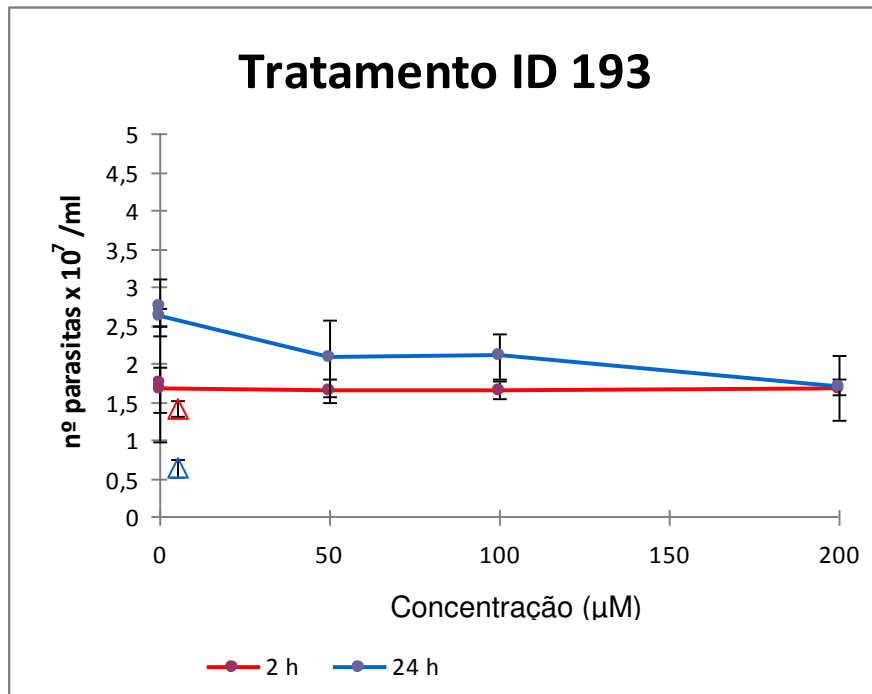


Figura 18. Efeito do composto ID 192 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15% (0  $\mu$ M) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu$ M durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).



A



B

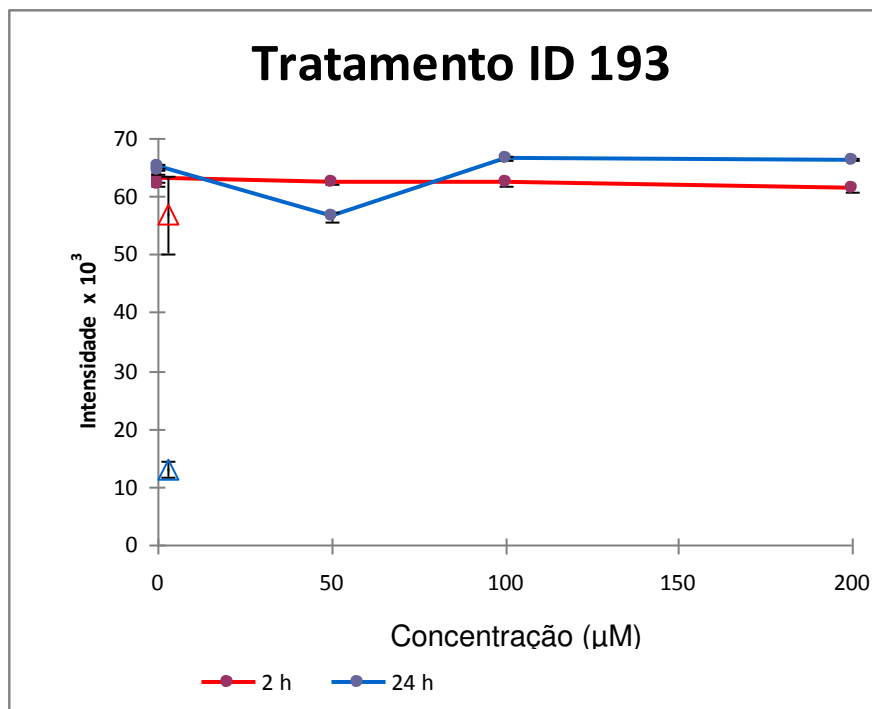
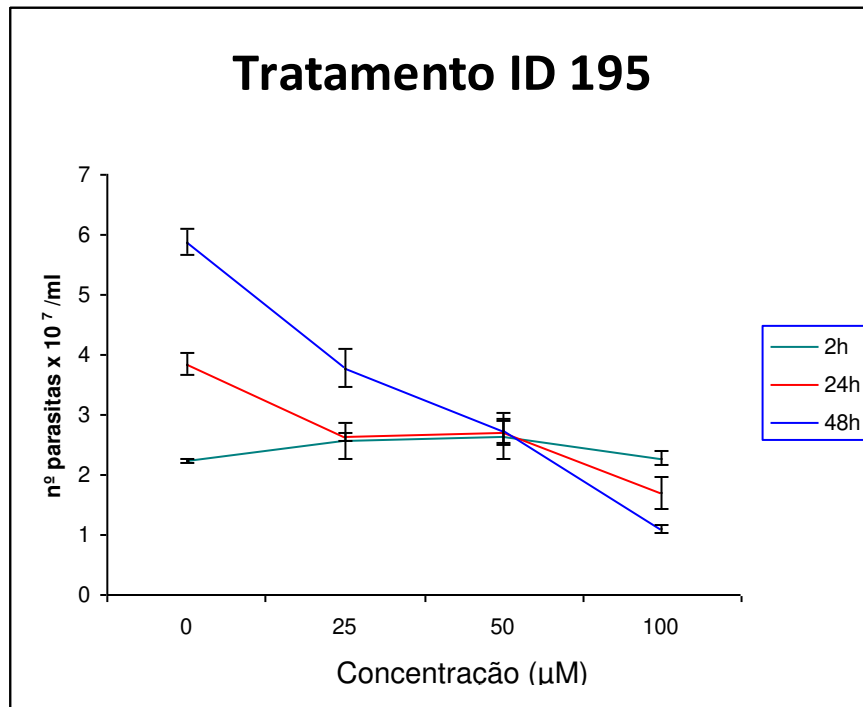


Figura 19. Efeito do composto ID 193 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3 µM durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

A



B

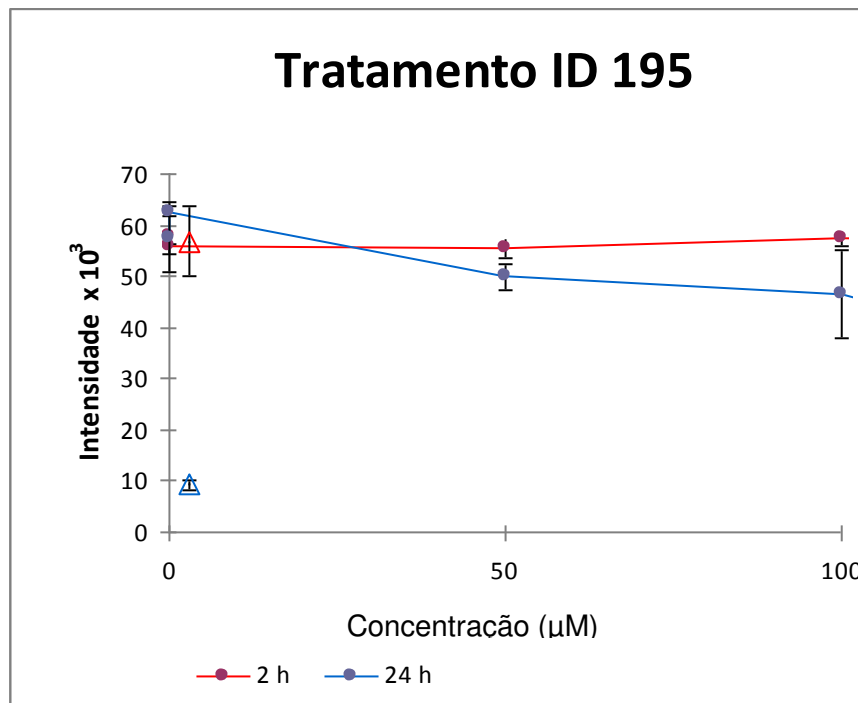


Figura 20. Efeito do composto ID 195 em promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Parasitas ( $10^7$ /poço) tratados com DMSO 0,15 % (0  $\mu\text{M}$ ) ou o composto em diferentes concentrações durante os tempos assinalados foram contados em microscópio óptico. (B) A fluorescência dos parasitas tratados foi avaliada em espectro-fluorímetro. Anfotericina B 3  $\mu\text{M}$  durante 2 horas (triângulo vermelho) e 24 horas (triângulo azul).

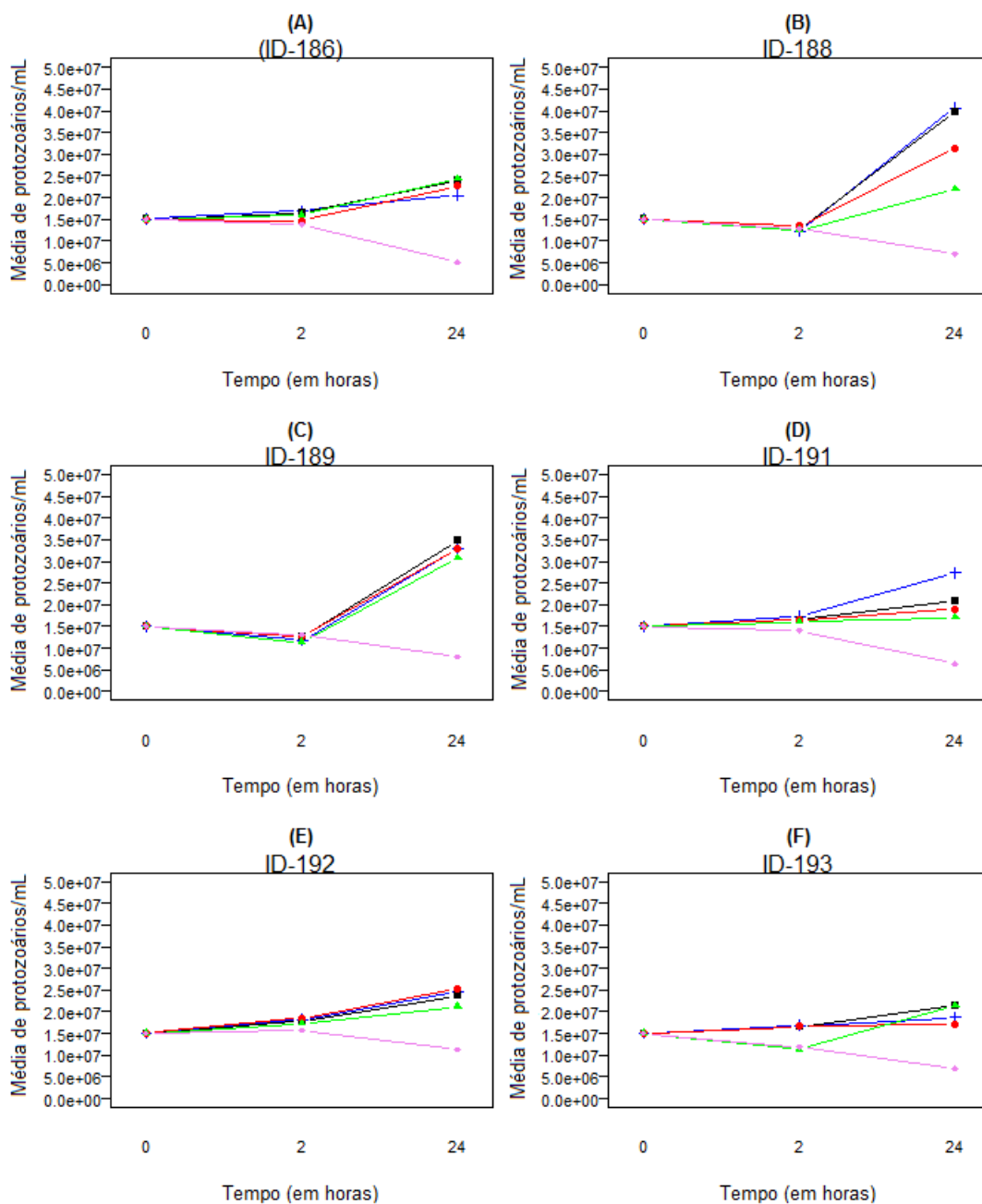


Figura 21. Gráficos de perfis de números de promastigotas de *L. amazonensis*. Parasitas ( $10^7$ /poço) não tratados ou tratados com os IDs assinalados durante 0, 2 e 24 horas. Os dados são semelhantes aos mostrados nas figuras 12 a 19. DMSO 0,15% (azul), 50 µM (preto), 100 µM (vermelho), 200 µM (verde), Anfotericina B 3 µM (rosa).

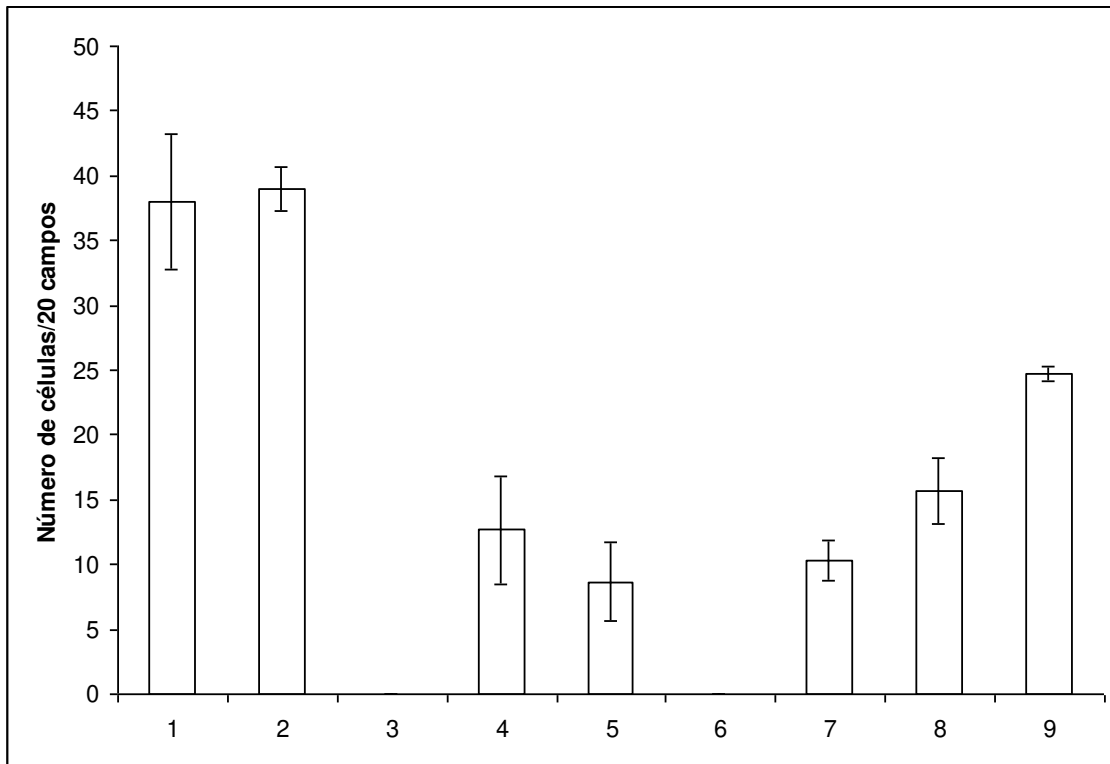
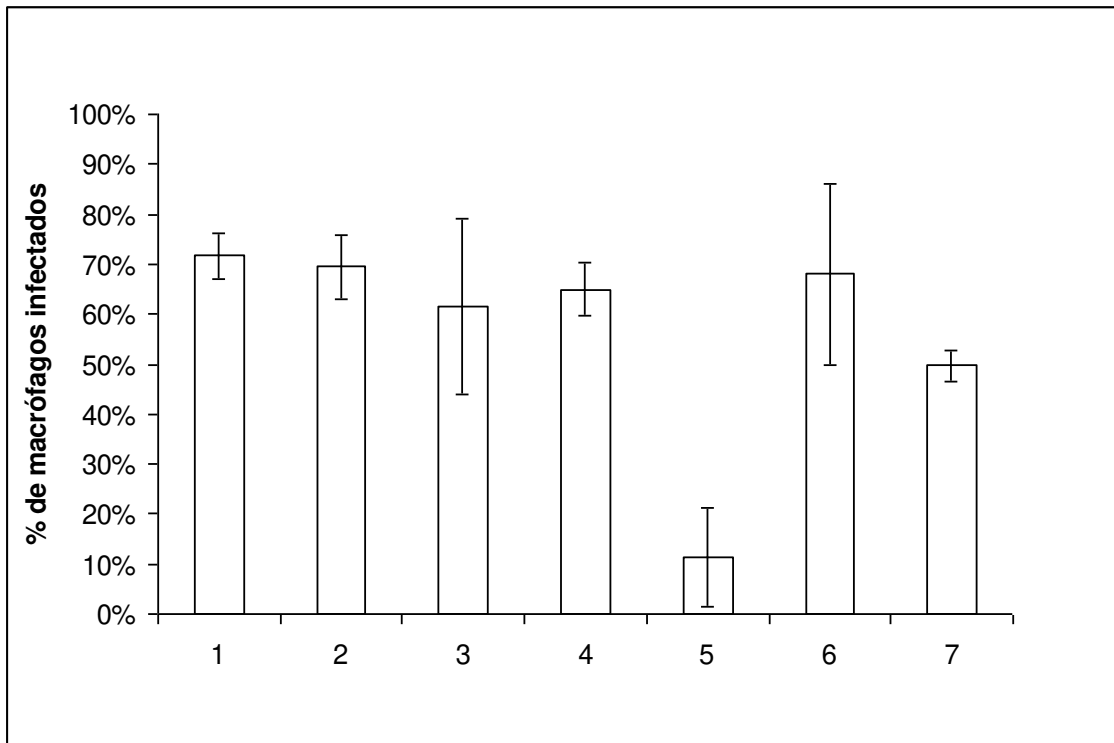


Figura 22. Efeito dos compostos em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos por lamínula foram infectados com amastigotas e tratados com: 1-meio, 2-DMSO 0,15%, 3-ID 130 450  $\mu\text{M}$ , 4-ID 130 225  $\mu\text{M}$ , 5-ID 130 112  $\mu\text{M}$ , 6-ID 71 450  $\mu\text{M}$ , 7-ID 71S 225  $\mu\text{M}$ , 8-ID 71S 112  $\mu\text{M}$ , 9-Anfoterina B durante 24 horas. O número de macrófagos (infectados ou não) foram contados em 20 campos.

A



B

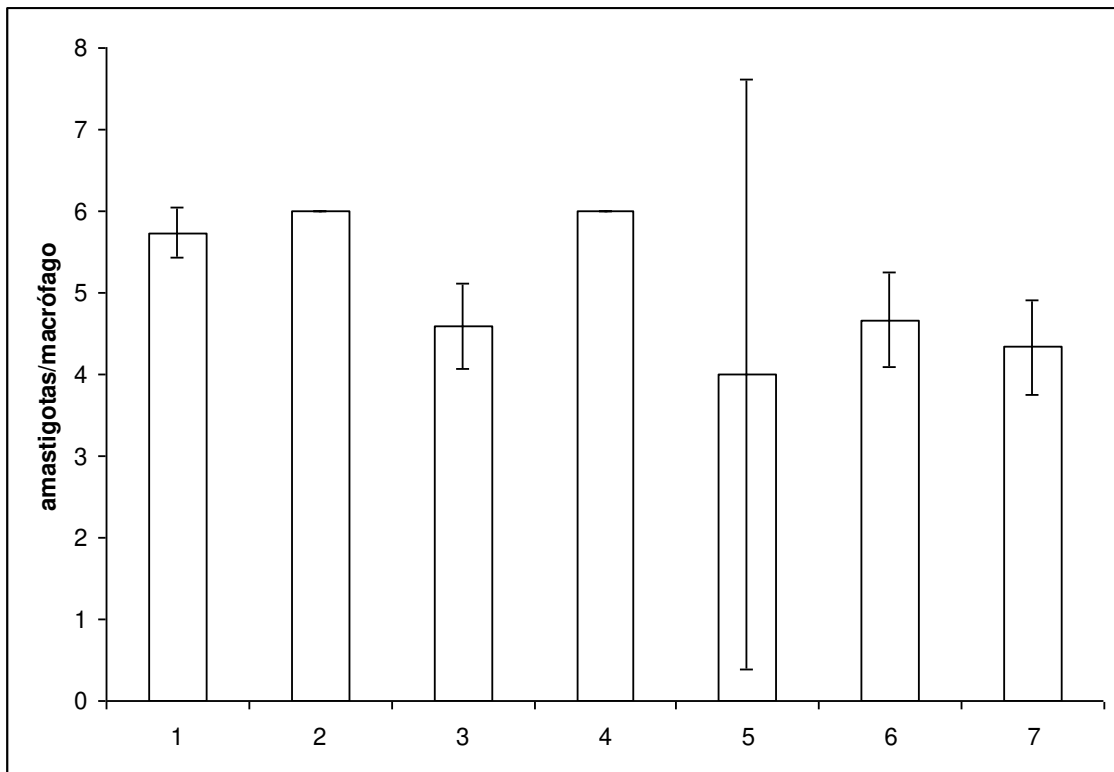


Figura 23. Efeito dos compostos em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos por lamínula foram infectados com amastigotas e tratados com: 1-meio, 2-DMSO 0,15%, 3- ID 71S 225  $\mu\text{M}$ , 4-ID 71S 112  $\mu\text{M}$ , 5- ID 130S 225  $\mu\text{M}$ , 6-ID 130S 112  $\mu\text{M}$ , 7-Anfoterina B, durante 24 horas. A % de macrófagos infectados (A) e amastigotas intracelulares (B) foram analisados em lamínulas coradas com Giemsa.

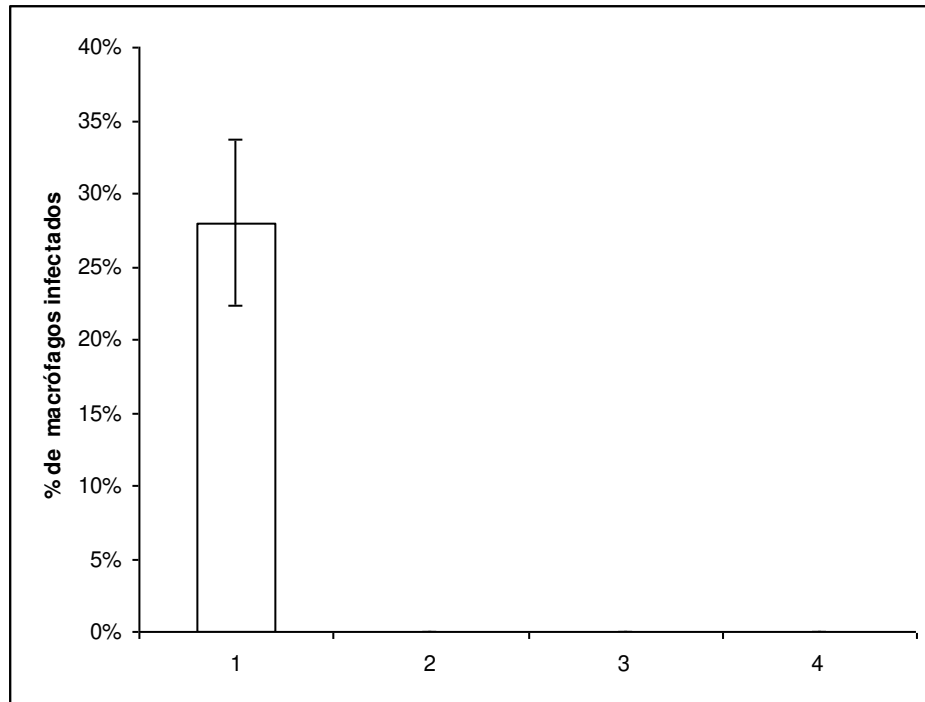
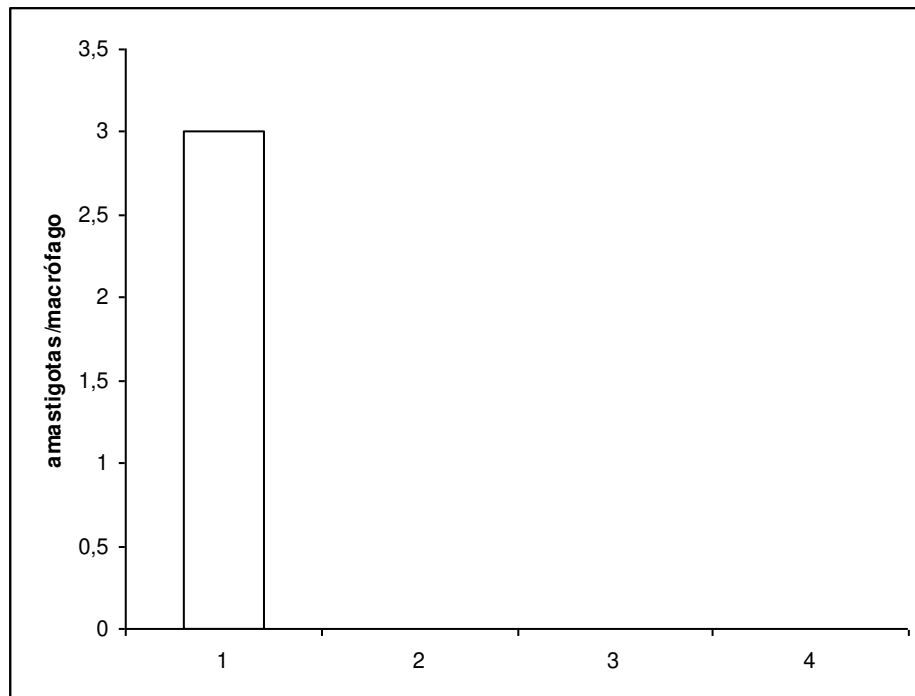
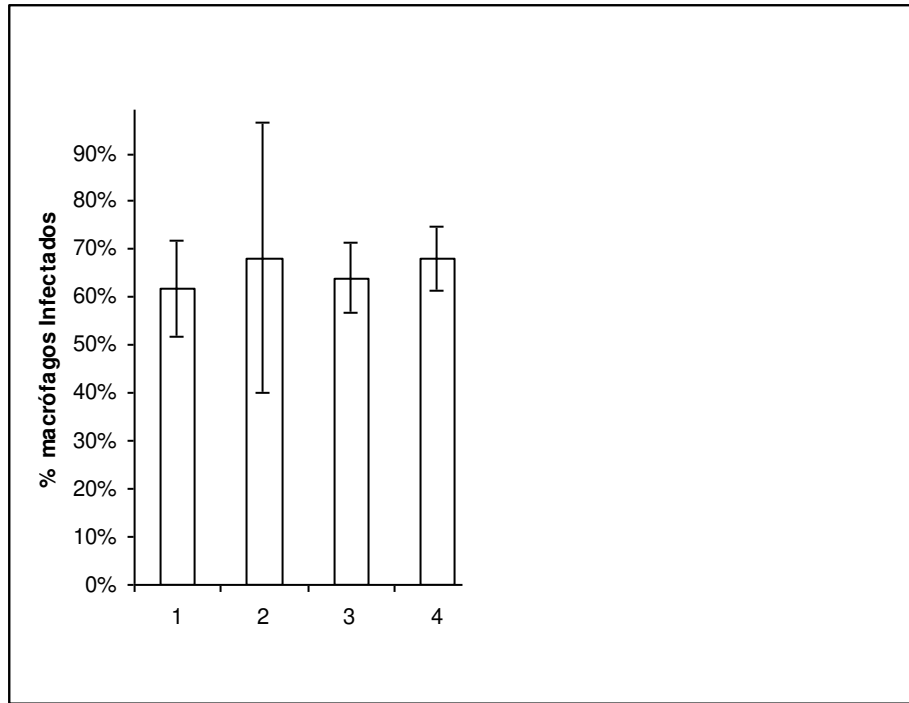
**A****B**

Figura 24. Efeito do composto em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos por lamínula foram infectados com amastigotas e tratados com: 1-DMSO 0,15%, 2- ID 195 450  $\mu\text{M}$  3-ID 195 225  $\mu\text{M}$ , 4-ID 195 112  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. A % de macrófagos infectados (A) e amastigotas intracelulares (B) foram analisados em lamínulas coradas com Giemsa.

A



B

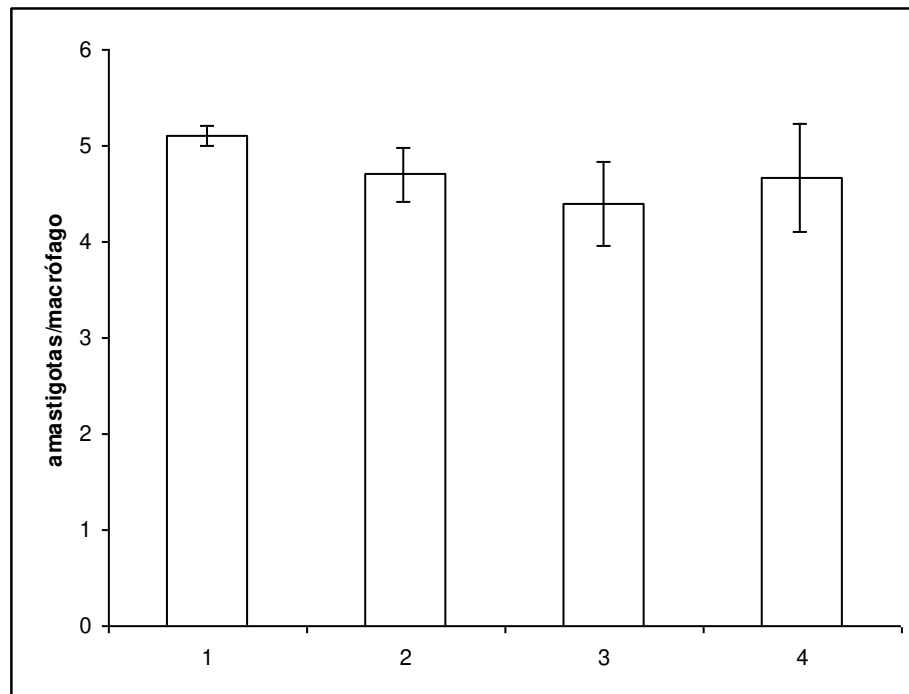


Figura 25. Efeito do composto em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos por lamínula foram infectados com amastigotas e tratados com: 1-DMSO 0,15%, 2- ID 195 56  $\mu\text{M}$  3-ID 195 28  $\mu\text{M}$ , 4-ID 195 14  $\mu\text{M}$ , durante 24 horas. A % de macrófagos infectados (A) e amastigotas intracelulares (B) foram analisados em lamínulas coradas com Giemsa.

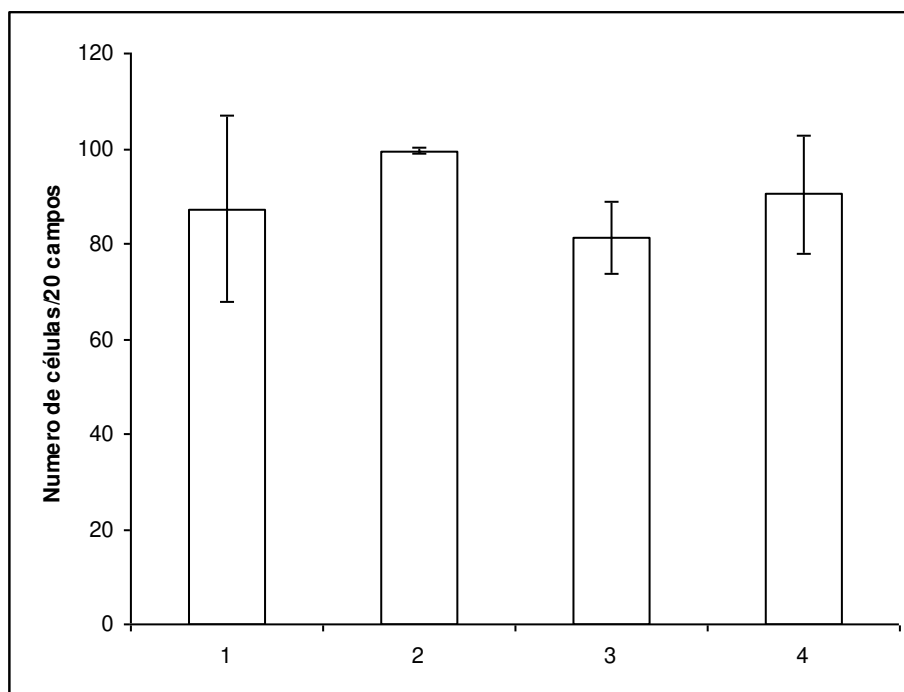


Figura 26. Efeito dos compostos em macrófagos peritoneais murinos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Cerca de  $5 \times 10^5$  macrófagos por lamínula foram infectados com amastigotas e tratados com: 1-DMSO 0,15%, 2-ID 195 56  $\mu\text{M}$ , 3-ID 195 28  $\mu\text{M}$ , 4-ID 195 14  $\mu\text{M}$ . O número de macrófagos (infectados ou não) foram contados em 20 campos



## 5 - DISCUSSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi testar compostos sintéticos de enzima do metabolismo no parasita *L. amazonensis*. Esses compostos são inibidores de enzimas, importantes no metabolismo de células eucariotas, e foram desenhados e desenvolvidos com métodos e ferramentas da Química Medicinal e Informática e sintetizado com base na análise das estruturas das enzimas e seus ligantes (ROCHA, 2010; PINHEIRO, 2012).

Os compostos sintéticos usados nesse trabalho inibem várias enzimas envolvidas no metabolismo, a saber: os IDS 187, 189, 190 e 191, inibem a enzima do complexo II da cadeia respiratória de *Saccharomyces*. O ID42 inibe a enzima cruzaina que é uma cisteína proteinase específica de *T. cruzi*. ID 188 inibe adenosina-deaminase de *Saccharomyces*. Os IDs 01S, 71, 71S, 130S e 195 inibem a diidroorotato desidrogenase, e ID 16 inibe a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase do *T. cruzi*. A ligação desses inibidores com as enzimas do complexo II da cadeia respiratória e adenosina-deaminase de *Leishmania* não foram estudadas. Mas esses inibidores das enzimas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase, tem afinidades ( $K_i$ ) pelas enzimas do *T. cruzi* em concentrações inferiores a 80  $\mu\text{M}$ , e são caracterizados pelo baixo peso molecular; motivo pelo qual avaliamos doses entre 25 e 200  $\mu\text{M}$ , pois nessa faixa de concentração deverá ocorrer ligação do inibidor (ID) com a enzima. Os inibidores da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase do *T. cruzi* foram inativos contra a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase humana, em concentrações variando entre 100 e 500  $\mu\text{M}$ , sugerindo que esses inibidores devem ter ação específica nos parasitas (ROCHA, 2010).

Considerando-se a similaridade nas sequências de aminoácidos das enzimas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase e diidroorotato desidrogenase de *T. cruzi* e *Leishmania*, e a importância também das outras enzimas do metabolismo para a sobrevivência de células eucariotas, é relevante testar os inibidores nos parasitas (CHELESKI et al., 2011). Os dados aqui mostrados indicam que do total de 17 compostos testados, 14 não apresentaram efeito em promastigotas de *L. amazonensis*. Não há dados na literatura com esses inibidores sintéticos de enzimas, em cultura de células, para a comparação com os resultados. Mas alguns compostos com ação comprovada, por exemplo, na enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, alguns complexos de rutênio, mostraram efeito tóxico em formas tripomastigotas do *T. cruzi*, após 24 horas de tratamento (SILVA et al., 2010). PINHEIRO e colaboradores também indica efeito leishmanicida de alguns inibidores da diidroorotato desidrogenase, mas não foram os inibidores utilizados em nosso trabalho (PINHEIRO et al., 2012). Os outros compostos nunca foram testados com o parasita.

Os compostos IDs foram dissolvidos em solvente DMSO, e esse não foi tóxico para os parasitas na concentração final de 0,15%, como já mostrado na literatura. Lima e colaboradores demonstraram que DMSO 0.1% não afetava culturas de promastigotas e amastigotas extracelulares de *L. amazonensis* (LIMA et al., 2009). Os testes para avaliar os IDs foram escolhidos porque possibilitam responder duas questões sobre os compostos a serem testados: IDs matam promastigotas? IDs impedem a proliferação dessa forma do parasita? Com essas respostas, é possível a seleção dos compostos para ensaios com amastigotas intracelulares. A contagem juntamente com outro dado quantitativo são sugeridos para esse tipo de análise (BERMAN, 1997; LIMA et al., 2009). Nesse trabalho utilizamos a *L. amazonensis* transfectada com o gene da GFP,

parasita semelhante ao não transfectado, em relação a morfologia, infectividade, capacidade proliferativa e de diferenciação (COSTA et al., 2011). Esse parasita possibilita a detecção da fluorescência, isto é, promastigotas íntegros são fluorescentes, enquanto que os poços de placas de culturas com parasitas morrendo ou, em menor número, tem fluorescência reduzida. Os dados mostrados na figura 3 confirmam essa observação e também os resultados de COSTA e colaboradores (2011). Assim, os ensaios usados neste trabalho dão indicação segura da ação dos compostos. Enquanto a toxicidade não foi observada em 14 IDs, a atividade leishmanioestática, isto é, a capacidade de inibir a proliferação, também não foi detectada. Considerando-se que há compostos ou intervenções que não matam microorganismos, mas impedem seu crescimento, avaliamos essa possibilidade. Por exemplo, GRANT e colaboradores mostraram que inibidores da quinase dependente da ciclina CRK3 inibem a proliferação de promastigotas de *L. mexicana*, causando alteração no conteúdo de DNA e o aparecimento de formas aberrantes nas culturas (GRANT et al., 2004. ARRAIS-SILVA 2005 a) e colaboradores demonstraram que exposição de promastigotas de *L. amazonensis* a oxigenação hiperbárica, dependendo do tempo, pode alterar a capacidade proliferativa dos parasitas.

As explicações para os resultados negativos com 14 dos IDs testados, em diferentes tempos, podem ser várias. Alguns dos compostos, tais como o ID 42 é inibidor da enzima cruzaina, expressa exclusivamente em *T. cruzi*, e assim não era esperada ação em *Leishmania*, que não tem a enzima. Inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo, mas com ligação nas moléculas de *Saccharomyces* poderiam ter algum efeito em *Leishmania*, que expressam também essas enzimas, mas com homologia não conhecida. Entretanto, os IDs não tiveram efeito, ou devido a não

similaridade química das enzimas de fungo e *Leishmania*, ou devido a incapacidade de alguns dos compostos de penetrarem na membrana do promastigota ou da organela que contém as enzimas. Os tempos selecionados, 2, 24 e 48 horas de tratamento, possibilitaram a análise de um possível efeito tardio nos parasitas. Alternativamente, pode-se sugerir que os compostos não foram tóxicos porque o metabolismo da glicólise, em fungo, *Leishmania* e *T. cruzi*, podem ser diferentes tanto na cinética enzimática como na estrutura química das várias enzimas, por exemplo; e esses inibidores não seriam tão efetivos em se ligar as enzimas dos promastigotas. Alternativamente pode-se considerar que, pelo fato desses compostos serem relativamente instáveis em pH acima de 7.0, (ROCHA, comunicação pessoal) sua atividade em culturas celulares com algumas mudanças no pH durante os dias de ensaio, possa ter contribuído para os resultados negativos de muitos IDs.

Os compostos que apresentaram efeito tóxico nos promastigotas foram IDs 71S, 130S e 195, apesar da análise estatística mostrar que somente os resultados referentes a ID 71S e ID 130S são significativos. Esses compostos são inibidores sintéticos da diidroorotato desidrogenase, enzima que tem peso molecular de aproximadamente 28 kDa, e pode ser citosólica ou localizada nas mitocôndrias. Esses resultados, mostrando efeito tóxico em promastigotas, eram inferidos, considerando-se que a enzima diidroorotato desidrogenase de tripanosomatídeos é uma proteína conservada em *Leishmania* em termos de estrutura e função e assumindo características similares em termos de maquinário metabólico. Os IDs 01S, 71 também são inibidores diidroorotato desidrogenase, mas não apresentaram efeitos tóxicos; pode-se sugerir que não foram competentes em penetrar na célula ou não se ligaram efetivamente com a enzima *in vivo*.

Em relação ao efeito tóxico dos IDs 71S, 130S e 195, observa-se um padrão dose-resposta; assim como o efeito do tempo nos tratamentos. O composto ID 71S foi tóxico após 24 horas de tratamento, mantendo-se assim às 48 horas de cultura (Figura 9), o ID 130S foi efetivo às 24 horas e o número de promastigotas foi reduzido também às 48 horas, sugerindo que além de matar os parasitas, os promastigotas sobreviventes não proliferaram com doses de 100  $\mu\text{M}$  (Figura 10). O ID 195 (50 e 100  $\mu\text{M}$ ) foi tóxico para os promastigotas às 24 horas de cultura e também teve efeito anti-proliferativo nos parasitas sobreviventes (Figura 20).

Após a seleção dos compostos tóxicos para promastigotas, foram realizados ensaios com macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*. Nesses experimentos o objetivo era avaliar a capacidade de penetração dos compostos nos macrófagos e nos vacúolos parasitóforos onde estão localizados os amastigotas. Esse modelo *in vitro*, é amplamente utilizado para análise de fármacos, atividade de citocinas, e ativadores de macrófagos (BERMAN, 1997, AYRES et al., 2008). Os dados mostraram que os compostos ID 130S e ID 71S reduziram a infecção das culturas de macrófagos, isto é, menos % de células infectadas foram contadas. Entretanto, os compostos foram tóxicos para os macrófagos; resultados semelhantes foram obtidos com ID 195. A explicação para esses resultados devem estar relacionadas à ligação efetiva desses inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase do macrófago de camundongo, que está localizada no citoplasma e nas mitocôndrias da célula, e assim, talvez mais acessível que a enzima do amastigota que está dentro do vacúolo parasitóforo. O ID 195 não foi tóxico para macrófagos e amastigotas em concentrações menores (56, 28, 14  $\mu\text{M}$ ), sugerindo que esse inibidor em baixas concentrações não penetra nas células. Vale salientar que Anfoterina B, fármaco usado no tratamento da

leishmaniose, apesar de reduzir a carga parasitária da cultura de macrófagos, também foi tóxica para as células, apesar de em menor grau quando se compara com os IDs, esses dados foram observados também por outros pesquisadores (AYRES et al., 2008). Mais estudos serão necessários para a síntese de novos inibidores que não apresentem efeitos tóxicos nas células hospedeiras da *Leishmania*.

## 6 – CONCLUSÕES

Os inibidores da Diidroorotato desidrogenase (*T. cruzi*), ID71S, ID130S e ID195, tiveram atividade leishmanicida em formas promastigotas.

Em formas amastigotas os inibidores ID 71S e 130S reduziram a porcentagem de macrófagos infectados nas concentrações de 225  $\mu$ M.

Em concentrações mais altas estes compostos (ID 71S, 130S e 195) foram tóxicos para os macrófagos, mas modificações químicas poderiam diminuir esta toxicidade dos inibidores.

Estudos com inibidores de enzimas ligadas ao metabolismo, assim como, testes com distintas formas do parasita (amastigota e promastigota) constituem ferramentas promissoras no tratamento da leishmaniose.

## 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. L. O.; SANTOS, B. J. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 86, n.3, p. 497-506, 2011.

ARRAIS-SILVA, W.W.; PAFFARO.V.A.Jr.; YAMADA, A.T.; GIORGIO,S. Expression of hypoxia-inducible facto-1 alpha in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*. Exp. Mol. Pathol., v. 78, n. 1, p 49-54, 2005 (a).

ARRAIS-SILVA, W. W.; COLHONE, M.C; AYRES., D. C.; SOUTO, P.C.S.; GIORGIO, S. Effects of hyperbaric oxygen on *Leishmania amazonensis* promastigotas and amastigotas. Parasitol. Int., v 54, p. 1-7, 2005 (b).

AWASTHI, A.; MATHUR,R.K.; SAHA, B. Immune responase to Leishmania infection. Indian J. Med. Res., v 119, n. 6, p. 238-258, 2004.

AYRES D. C., MARCUCCI M. C., GIORGIO S. Effects OF Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 102, n.2, p 215-220, 2007 (a).

AYRES, C.D. Avaliação da eficácia de diferentes compostos nos modelos in vivo da Leishmaniose sob diferentes condições de oxigênio. Campinas, 2007. 92-93. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – UNICAMP (b).



BALANÃ-FOUCE, R.; REGUEIRA, R. M.; CUBRÍA, J, C.; ORDÓNEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.*, v. 30, n.4, p. 434-440, 1998.

BARBIERI, C.L.; GIORGIO,S.; MERJAN, A. J.; FIGUEIREDO, E. N. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. *Infect. Immun.*, v 61, n.5, p. 2131-2137, 1993.

BARRAL, A.; COSTA, L.M.J. Leishmanias e a leishmaniose Tegumentar nas Américas. 1 ed. Salvador: Gráfica Contexto, 2011.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; McMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Journal Article*, v. 44, P. 536-546, 2001

BASTOS, M.M.; BOECHAT, N.; GOMES, A.T.P.C.; NEVES, M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S. Uso de Porfirinas em Terapia Fotodinâmica no Tratamento da Leishmaniose Cutânea. *Rev. Virtual Quim.*, v 3, n.4, p 257-267, 2012.

BOGLIOLO, L.; FILHO, B. G. Patologia. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BRESSI, C.J.; VERLINDE, J.M.C.; ARONOV, M.A.; SHAW, L.M.; SHIN, S.S; NGUYEN, N. L, SURESH, S.; BUCJNER.S.F.; VOORHIS, V. C.W.; KUNTZ, D.I.; HOL, J.G.; GEKB, H. M. Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae via structure-based drug design. J Med Chem. v 21; p 2080-2093, 2001.

CASTILHOS, P. Efeito da peçonha *Bothrops mojjeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania spp.* Uberlândia, 2008. 1-57. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia) – Universidade Federal de Uberlândia.

CHAGAS, P. A.; SOARES, P. B. M.; MULLER, H.A.; GARCEZ, M. L. Potencial anti-leishmania e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia Benth* (Fabaceae). Ver. Pan-Amaz. Saúde. v 1, p. 117-124, 2010.

CHELESKI, J.; FREITAS, F.R.; WIGGERS, J. H.; ROCHA, R,J.; ARAÚJI, U. P.A.; MONTANARI, A.C. Expression, purification and kinetic characterization of His-tagged glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. Protein Expression and Purification, v. 76, p. 190-186, 2011.

COLHONE, M C.; ARRAIS-SILVA, W W.; PICOLI, C,; GIORGIO, S. Effect of hypoxia on macrophage infection by *Leishmania amazonensis*. J. Parasitol., v. 90, n.3, p 510-515, 2004.

COSTA, S. S.; GOLIM, A, M.: BERGMANN-ROSSI, B.;COSTA, M. T.F.; GIORGIO,S.  
Use of Vivo and In Vitro Systems to Select *Leishmania amazonensis* Expressing Green  
Fluorescent Protein. Korean J Parasitol, v 49, p 357-364, 2011.

CUNHA, R. P; SILVA, R. M. L. A Urbanização da leishmaniose tegumentar americana  
no município de Campinas – SP (SP) e região: magnitude do problema e desafios.  
Anais Brasileiros de Dermatologia, v.82, n. 6, p.7 – 8, dez.2007.

CHELESKI, J. Novel insights for dihydroorotate dehydrogenase class 1a inhibitors  
discovery. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 45, n.12, p 5899-5909, 2010.

DUSCHAK, V.G.; COUTO, A.S. cruzipain, the Major Cysteine Protease of *Trypanosoma*  
*cruzi*: A Sulfated Glycoprotein Antigen as Relevant Candidate for Vaccine development  
and Drug Target. Current Medicinal Chemistry, v 16, n 24, p. 3174-3202, 2009.

DIRETORIA DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLOGICA. Guia de Orientação para  
Treinamento de Técnicos de Laboratório de Entomologia. Santa Catarina, SC. 2008.

FREITAS, R. F.; PROKOPCZYK, I.M; ZOTTIS, A; OLIVA, G.; ANORICOPULO. A. D.;  
TREVISAN, M.T.S.; VILEGAS, W.; SILVA, M.G.V.; MONTANARI, C.A. Discovery of  
novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde – 3- phosphate dehydrogenase inhibitors.  
Bioorg. Méd. Chem., v.17. n.6. 2476 – 2482, 2009.

GIORGIO, S.; BARÃO, S.C. Intracellular *Leishmania amazonensis* killing induced by the guanine nucleoside 8-bromoguanosine. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*. v. 40, n. 4, p. 237-240, 1998.

GRANT, M.K.; DUNION, H.M.; YARDLEY, V.; SKALTSOUNIS, L. A.; MARKO, D.; EISENBRAND, G.; CROFT, L. S.; MEIJER, L.; MOTTRAM, C. J. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 Cyclin-Dependent Kinase: Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity. *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY*, v. 57, n. 7, p. 3033–3042, 2004.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* v. 44, p 1-39, 1999.

HANNAERT, V.; PPERDOES, O.; MICHELS, P.A. Comparison and evolutionary analysis of the glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from different Kinetoplastida. *J Mol Evol.* v. 6, p 728-738, 1998.

HENRY, W.M.; BERGMAN, J.D.; DAVIES, C.D.; SARAIVA, N. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

KENNEDY, K,J.; BRESSI, J.C.; GELB,M.H. A disubstituted NAD<sup>+</sup> analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal gluceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 11, n. 2, p. 95-98, 2001.

KUCKELHAUS, S.C. Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator de necrose tumoral- $\alpha$  em camundongos infectados pela *Leishmania (L.) amazonenses*. Brasília, 2011. p 01-120. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Universidade de Brasília.

LEITAO, A. ; ANDRICOPULO, A. D. ; OLIVA, G. ; PUPO, M. T. ; MARCHI, A. A. ; VIEIRA, P. C. ; SILVA, M. F. G. F. ; FERREIRA, V. F. ; SA, M. M. ; MONTANARI, C. A. . Structure-Activity Relationships of Novel Inhibitors of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 14, p. 2199-2204, 2004.

LOFFLER, M.; JOCKEL, J.; SCHUSTER, G.; BECKER, C. Dihydroorotate-ubiquinone oxidoreductase links mitochondria in the bioynthesis of pyrimidine nucleotides. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 174, n. 1-2, p.125-129, 1997.

LIMA, C.B.C.; SILVA-ARRAIS, W.W.; CUNHA, R. O. L. R.; GIORGIO, S. A novel organotellurium compound (RT-01) as a new antileishmanial agent. *Korean J Parasitol*, v 47, p 213-218, 2009.

MARCONDES, B. C. *Entomologia Médica e Veterinária*. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. *Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana*. 2 Ed. Brasília: MS, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana /Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde. Brasília – 5ª ed. (revisada) – p. 1-62, 2000.

MIOT, A. H.; MIOT, B. D. L.; COSTA, B. L. A.; MATSUO, Y. C.; O'DWYER, H.L. Avaliação do efeito antiparasitário do omeprazol na prevenção do desenvolvimento de lesões cutâneas em hamsters Infectados por *Leishmania brasiliensis*. Anais Brasileiros de Dermatologia, v 80, p. 29-32, 2005.

MORAES, G. R.; LEITE, C. I.; GOULART, G. E. Parasitologia e Micologia Humana. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

NEVES, P. D.; FILIPPIS, T. Parasitologia Básica, 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

NEVES, P. D. Parasitologia Humana. 10 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

NEVES, P.D. Parasitologia Dinâmica. 3 ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

PINHEIRO, P.M. Planejamento de inibidores das enzimas diidroorotato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major*. Ribeirão Preto, 2012, p 01-169. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N.; MARZAL, P.C; JUNIOR, A. F. H.;TEMPONE, G.A. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. Química Nova. v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REY, L. PARASITOLOGIA, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

REY, L. Parasitologia. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

ROCHA, R. J.; Planejamento de Inibidores das enzimas Gliceraldeído-3-fosfato Desidrogenase e Diidroorotato Desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*. São Carlos, 2010. 201 p. Dissertação (Doutorado em Ciências). Universidade de São Carlos.

SAINT-MARC, C; PINSON, B.; COULPIER, F.; JOURDREN, L.; LISOVA. O.; DAIGANAN-FORNIER, B. Phenotypic consequences of purine nucleotide imbalance in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, v 2, p 529-538, 2009.

SANTOS, O. A.; NAKAMURA, U. T.; FILHO, D. P. B.; JUNIOR, V.F.V.; PINTO, C. A.; NAKAMURA, V. C. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. Journal of Ethnopharmacology v. 120, p 204–208, 2008.

SILVEIRA, T. F. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) na Amazônia. Brasil: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos. Gazeta Médica da Bahia. v 79, p 25-29, 2009.

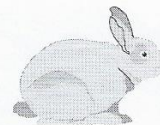
SOUZA, M. Assistência de Enfermagem em Infectologia. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2006.

SILVA, J.J et al. Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. J.Pharmacol, v. 2, p. 260-269, 2010.

Organização Mundial de Saúde. Disponível em <[www.who.int/leishmaniasis/](http://www.who.int/leishmaniasis/)> acesso: 19/07/2013.



ANEXO I – CÓPIA DO PROTOCOLO CEUA



CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA/Unicamp**

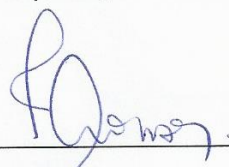
**CERTIFICADO,**

Certificamos que o projeto "**Avaliação de fármacos ativos contra o parasita *Leishmania amazonensis***" (protocolo nº **2641-1**), sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Selma Giorgio / Ademar de Mesquita Barbosa**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **26 de março de 2012**.

Campinas, 26 de março de 2012.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva